

**Efecto antimicrobiano, fisicoquímico y sensorial del aceite esencial de *Mentha
Spicata* (Hierbabuena) incorporado en la formulación del queso Dip**

Elaborado por:

Jhon Milciades Morales Castro

Asesora:

MSc. Claudia Lorena Betancur

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería ECBTI

Pregrado Ingeniería de alimentos

Medellín, Octubre de 2020

Resumen Analítico Especializado RAE

| | |
|--------------------------------------|--|
| Título | Efecto antimicrobiano, fisicoquímico y sensorial del aceite esencial de <i>Mentha Spicata</i> (Hierbabuena) incorporado en la formulación del queso Dip. |
| Modalidad de trabajo de grado | Proyecto aplicado |
| Línea de investigación | Ciencia y Tecnología de los alimentos |
| Autor | Jhon Milciades Morales Castro 8156219 |
| Institución | Universidad nacional abierta y a distancia UNAD |
| Fecha | Julio de 2020 |
| Palabras clave | Conservante natural, Concentración mínima inhibitoria, Hierbabuena, Queso Dip. |
| Descripción | Este documento presenta los resultados del trabajo de grado realizado en la modalidad de Proyecto aplicado, bajo la asesoría de la Magister Claudia Lorena Betancur, inscrito en la línea de investigación Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Escuela de ciencias básicas, tecnología e ingeniería ECBTI y que se realizó en el Nodo Occidente CEAD Medellín, Estudiando el uso como aditivo antimicrobiano alimentario del aceite esencial de Hierbabuena extraído de muestras cultivadas en el corregimiento de Santa Helena del municipio de Medellín, Antioquia. |
| Fuentes | Ansari, K., & Goodarznia, I. (2012). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from spearmint (<i>Mentha spicata</i> L.) leaves by using Taguchi methodology. <i>The Journal of Supercritical Fluids</i> , 67, 123–130. http://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.011 . |

| | |
|-------------------|--|
| | <p>Benites, Julio. Bravo, Felipe. Rojas, Mauricio. Feuntes, Rose. Moiteiro, Cristina. Venancia, F. (2011). Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and plant material, 2(12602), 2009–2011.</p> <p>Ciro Gelmy. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. <i>Vitae</i>, 17(2), 149-154.</p> <p>Ramírez, L. S., Isaza, J. H., Veloza, L. Á., & Stashenko, E. (2009). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> de diferentes orígenes de Colombia Antibacterial activity of <i>Lippia origanoides</i> essential oils from different Colombian regions, 17(December), 313–321.</p> <p>Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. <i>Ra Ximhai</i>, 7(1), 153–170.</p> |
| Contenidos | <p>Portada</p> <p>RAE Resumen analítico especializado</p> <p>Índice general</p> <p>Índice de tablas, figuras, imágenes y fotografías</p> <p>Introducción</p> <p>Objetivos</p> <p>Marco teórico</p> <p>Aspectos metodológicos</p> <p>Resultados</p> <p>Discusión de resultados</p> <p>Conclusiones y recomendaciones</p> |

| | |
|---------------------|--|
| | Bibliografía |
| Metodología | <p>Primera etapa: se realizó en tres fases</p> <p>Fase I: Obtención del Material Vegetal</p> <p>Fase II: Extracción de Aceites Esenciales</p> <p>Fase III: Caracterización de Aceites Esenciales</p> <p>Segunda etapa: Determinación del efecto antimicrobiano del AE de <i>Mentha Spicata</i> (Hierbabuena), sobre los microorganismos patógenos <i>E. coli</i> y <i>Aspergillus N.</i> A través del método de difusión de agar para establecer el crecimiento en placa. Posteriormente se determinará la concentración mínima inhibitoria mediante la prueba CMI colorimétrica por diluciones, con microplatos de 96 pozos.</p> <p>Tercera etapa: Inclusión del aceite esencial al producto y analisis: determinada la concentración adecuada del AE de <i>Mentha Spicata</i> (Hierbabuena) para ser incorporado en la formulación del Queso Dip, tomando como referencia el porcentaje máximo de adición permitidas al usar conservantes en los derivados lácteos y los resultados de concentración mínima inhibitoria.</p> <p>Cuarta etapa: Análisis Sensorial por Aproximación Multidimensional</p> |
| Conclusiones | Se obtuvo aceite esencial de Hierbabuena <i>Mentha spicata</i> cultivada en el corregimiento de Santa helena municipio de Medellín, Antioquia, empleando |

| | |
|--|---|
| | <p>la metodología de extracción por arrastre con vapor obteniendo un rendimiento de 1,82%, por medio del análisis cromatográfico se identificó que el componente con mayor abundancia relativa es el mentol, la actividad bactericida del aceite esencial para la bacteria E. Coli se presenta en la concentración de 1024ppm y no presenta sobre Aspergillus Niger. Dado que la concentración mínima inhibitoria es acorde con la normatividad vigente en cuanto a los porcentajes de adición en alimentos como aditivos conservantes, fue adicionado en la formulación y elaboración del queso Dip, el producto final fue evaluado mediante un análisis sensorial por aproximación multidimensional</p> |
| <p>Referencias bibliográficas</p> | <p>(Albarracin <i>et al.</i>, 2006). (Benites <i>et al.</i>, 2011). (Cadillo, 2014). (CODEX STAN 192, 1995). (Correa y Fonseca, 2004). (Estrada, 2010). (Gallegos <i>et al.</i>, 2007). (Pedraza & Henao, 2008). (Ramírez <i>et al.</i>, 2009). (Solís, 2011). (Vásquez & Alenguer, 2001).</p> |

Índice General

| | |
|--|----|
| Resumen Analítico Especializado RAE..... | 2 |
| Índice general, tablas, figuras, imágenes y fotografías..... | 6 |
| Introducción..... | 11 |
| Justificación..... | 14 |
| Definición del problema..... | 16 |
| Objetivos..... | 18 |
| Marco Teórico y conceptual..... | 19 |
| Aspectos metodológicos..... | 26 |
| Resultados obtenidos..... | 29 |
| Discusión de resultados..... | 42 |
| Conclusiones y recomendaciones..... | 44 |
| Bibliografía..... | 45 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Caracterización de algunas especias aromáticas..... | 22 |
| Tabla 2. Datos obtenidos extracción aceite esencial de Hierbabuena | 33 |
| Tabla 3. Participación de los componentes del AE de hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>). .. | 36 |
| Tabla 4. Halos de inhibición del AE de hierbabuena contra <i>E. Coli</i> | 37 |
| Tabla 5. Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas. | 40 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Extractor de aceites esenciales por arrastre con vapor. | 24 |
|--|----|

Índice de Imágenes

| | |
|--|----|
| Imágen 1. Gráfica resultados caracterización Cromatográfica..... | 34 |
| Imágen 2. Identificación de compuestos con mayor abundancia relativa..... | 35 |
| Imágen 3. CMI Aceite esencial Hierbabuena contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739..... | 38 |
| Imágen 4. CMI Aceite esencial Hierbabuena contra <i>Aspergillus niger</i> ATCC 0392..... | 38 |
| Imágen 5. Gráfica perfil sensorial por aproximación multidimensional..... | 40 |

Índice de fotografías

| | |
|--|----|
| Fotografía 1. Vista panorámica cultivos especies aromáticas..... | 30 |
| Fotografía 2. Invernadero Hierbabuena por semanas de siembra..... | 30 |
| Fotografía 3. Lote muestra obtenida de Hierbabuena..... | 30 |
| Fotografía 4. Muestra de Hierbabuena 7 semanas objeto del estudio..... | 31 |
| Fotografía 5. Montaje equipo Hidrodestilación..... | 31 |
| Fotografía 6. Muestra en recipiente de arrastre con vapor. | 32 |
| Fotografía 7. Montaje Embudo de decantación para separación del aceite esencial..... | 32 |
| Fotografía 8. Aceite esencial obtenido..... | 33 |
| Fotografía 9. Siembra en agar con discos de papel filtro..... | 37 |
| Fotografía 10. Halo de inhibición, Control negativo y Control positivo..... | 37 |
| Fotografía 11. Foto del queso Dip con AE de <i>Mentha spicata</i> | 41 |

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos, son un cuadro sintomático ocasionado por la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos patógenos o sustancias químicas. Estos contaminantes presentes en los productos alimenticios se encuentran en presentes a causa de fallas de calidad e inocuidad en las etapas de fabricación, manipulación, almacenamiento, transporte y distribución. (Correa y Fonseca, 2004)

La ciencia y tecnología de los alimentos se ha dedicado a investigar y desarrollar métodos y técnicas que permitan asegurar la inocuidad y seguridad en diferentes productos alimenticios, con el objeto de evitar la presencia de microorganismos patógenos.

Los métodos y tecnologías para el control en materia de inocuidad son: La irradiación, el tratamiento térmico, la refrigeración del producto terminada, las tecnologías emergentes, el desarrollo de empaques y el uso de conservantes. Actualmente se estudia el uso de conservantes naturales (biocidas), dentro de estas sustancias en desarrollo se encuentran los aceites esenciales.

La marcada tendencia mundial respecto el consumo de alimentos sanos sin aditivos sintéticos y con interesantes potenciales nutraceuticos y funcionales, ha direccionado a la ciencia y tecnología de los alimentos para desarrollar de productos innovadores que otorguen funcionalidad tecnológica, beneficios en la calidad microbiológica y la conservación de los mismos. Los compuestos de origen natural han sido empleados con el objetivo de incrementar las cualidades sensoriales y eliminar

del mercado de aditivos alimentarios las sustancias químicas que son cuestionadas en materia de salud pública como son los aditivos conservantes de origen sintético.

El uso de los aceites esenciales como una alternativa para el control microbiológico en diferentes matrices alimentarias, presenta una alternativa viable con alto potencial dados los estudios recientes que arrojan un espectro amplio de actividad funcional, bactericida y su biodegradabilidad comparada con los conservantes sintéticos más usados en la industria de alimentos (García, Martínez, Ortega, & Castro, 2010).

El efecto biocida del aceite esencial en una matriz alimentaria consiste en el mecanismo de acción sobre la membrana microbiana incrementando la fluidez y la pérdida de iones, que conlleva a reducir significativamente la magnitud del pH, que ocasionan el colapso y la muerte celular (Solís, 2012).

Los aceites esenciales han sido estudiados con fines de control microbiológico en diferentes productos como los extractos, jugos de fruta, derivados cárnicos, productos de panificación y confitería. La autoridad Europea en materia de seguridad alimentaria ha registrado diversos aceites esenciales como saborizantes por su uso seguro e inocuo; su homólogo para América (FDA) los han considerado como sustancias GRAS recomendando su uso como seguro, recibiendo su aprobación como aditivos alimentarios. (Sauceda, 2011).

Los desarrollos reportados en la literatura respecto al uso de aceites esenciales en derivados lácteos son escasos, los estudios actuales se refieren a investigaciones con aplicación desarrolladas en derivados cárnicos y de la panificación.

Se evidencia la importancia y necesidad de emprender nuevos estudios y desarrollos referentes al uso de aceites esenciales como fuente natural de conservantes para el control e inhibición de microorganismos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, en especial en el área de los derivados lácteos, reduciendo así el riesgo asociado a la contaminación microbiológica y obteniendo características sensoriales y/o tecnológicas que proporcionen valor agregado a los productos.

Dando respuesta a la necesidad que tiene la industria de los alimentos en investigar y desarrollar conservantes de origen natural para diversos productos alimenticios, partiendo del hecho de que los aceites esenciales son sustancias permitidas y previamente estudiadas para este fin, se ha identificado como un producto de alta comercialización a los quesos de coagulación mixta como un producto de alto potencial de estudio dado su alto aporte nutricional y biológico y la pertinencia en materia de legislación vigente respecto al uso permitido de aditivos alimentarios conservantes en su formulación.

Dado lo anterior, se planteó como trabajo aplicado una extracción del aceite esencial de Hierbabuena (*Mentha Spicata*) empleando el método de arrastre por vapor de agua o hidrodestilación simple, para estudiarlo y determinar el efecto antimicrobiano del mismo con el propósito de su uso como aditivo conservante biocida en el queso Dip.

Justificación

El presente proyecto aplicado busca contribuir a la economía de la Agroindustria a través del aprovechamiento integral de materias primas locales abundantes, consideradas poco relevantes pero con un gran potencial como son las plantas aromáticas; estudiar el carácter antimicrobiano del aceite esencial extraído de la *Mentha Spicata* (Hierbabuena) y su posible aplicación en alimentos de alto riesgo en salud pública como es el queso Dip, permitirá “innovar” en el campo de los aditivos naturales, aportando un nuevo ingrediente, que pretende prolongar la vida útil fisicoquímica, sensorial y microbiológica del producto reduciendo pérdidas y generando un significativo valor agregado al producto final.

La pertinencia y necesidad de desarrollar el presente proyecto radica en el aporte a la Agroindustria local, especialmente a los cultivadores de hierbas y especias aromáticas, las cuales son uno de los sectores seleccionados como eslabones prioritarios en la política nacional de desarrollo y cierre de brechas tecnológicas, estos subsectores presentan poco conocimiento científico de sus plantas y una necesidad de desarrollo de tecnologías para los diferentes eslabones de la cadena, desde la selección de las especies vegetales a trabajar, utilización integral del material vegetal apto y no apto para exportar para obtener nuevos productos innovadores.

Alcanzando satisfactoriamente los resultados esperados del proyecto, se podrá prolongar la vida útil sensorial y microbiológica del queso Dip empleando ingredientes naturales, generando un gran impacto económico para el sector productivo, reduciendo pérdidas, generando un significativo valor agregado y por ende incrementando las ganancias para un producto de alto consumo.

Los resultados obtenidos, podrán introducirse al sector productivo mediante un

modelo de transferencia tecnológica de nuevo conocimiento “Universidad-Empresa-Estado”. Actualmente institutos de investigación pertenecientes al sector productivo privado como Grupo Nutresa en sus diferentes unidades de negocio e instituciones públicas como Colciencias, se encuentran desarrollando iniciativas de este tipo para impactar comunidades de sectores productivos específicos agropecuarios buscando desarrollar productos sanos con alto valor agregado y componente innovador.

Definición del problema

El Queso tipo Dip, es un derivado Lácteo tipo untable producido por coagulación mixta, de alta demanda en el mercado, es un producto que facilita la sinergia sensorial con hierbas, especias y es versátil como acompañante de diversos productos muy posicionadas en la mentalidad gourmet de consumo actual.

Estudios realizados sobre la calidad y contaminación microbiológica en quesos, reportan la presencia de los microorganismos: Coliformes totales y Fecales, *Aspergillus niger* y *Staphylococcus aureus* (Gallegos *et al.*, 2007).

Según estos estudios, el deterioro de la calidad nutricional y fisicoquímica de este tipo de derivado lácteo es causado por la presencia de los microorganismos *E. Coli ssp.* y *Aspergillus niger*, los cuales tienen ampliamente demostrada una actividad patógena sobre los consumidores.

La formulación y producción del queso tipo Dip, contempla en su flujograma de proceso etapas con tratamientos térmicos, aplicación de buenas prácticas de manufactura (BPM) y uso regulado de aditivos antimicrobianos, todo ello con el fin de prevenir la presencia y desarrollo de estos microorganismos patógenos en el producto final con destino de consumo masivo. Actualmente, en la formulación del Queso Dip se emplean aditivos biocidas de origen sintético, los más empleados son el Sorbato de Potasio y el Benzoato de Sodio; según la regulación internacional contemplada, el Codex Alimentarius expedido por OMS en 1995, estos pueden ser usados en una cantidad no superior al 0.1%.

Actualmente, el uso de compuestos sintetizados químicamente viene siendo cuestionado por la autoridades y consumidores por sus impactos sobre la salud al ser

consumidos de manera prolongada, es por ello que se presenta una marcada tendencia hacia la alimentación más sana y natural, adicionalmente a esta tendencia saludable, diferentes estudios han asociado aditivos sintéticos a patologías cancerígenas y teratogénicas por su toxicidad residual, lo cual es actualmente una preocupación para las autoridades sanitarias a nivel mundial como la Food and Drug Administration (FDA), quienes coordinan estudios sobre consecuencias en materia de salud por consumo de estos aditivos y han comenzado a vigilar estrictamente e incluso como en la Unión Europea a restringir el uso de estos aditivos cuestionados por efectos adversos en salud.

Reemplazar aditivos conservantes y antimicrobianos tradicionales de origen sintético, se ha convertido en una prioridad para la industria alimentaria; las tendencias en investigación, desarrollo e innovación en alimentos de los últimos años se refieren al diseño y formulación de productos más sanos con actividad bioactiva y funcional, encaminados a un mercado creciente de consumidores preocupados por la salud donde se destaca el uso de plantas aromáticas para obtener sustancias bioactivas.

¿Cuál es el efecto antimicrobiano, fisicoquímico y sensorial del aceite de *Mentha spicata* sobre el queso tipo Dip?

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto antimicrobiano, fisicoquímico y sensorial del aceite esencial extraído de la *Mentha Spicata* (Hierbabuena) empleado como conservante en el Queso Dip.

Objetivos específicos

Analizar el aceite esencial de *Mentha Spicata* (Hierbabuena) extraído usando método de arrastre con vapor y caracterizar el aceite esencial obtenido por medio de Cromatografía de Gases con acople a Espectrómetro de Masas (CG-EM).

Determinar el efecto biocida del aceite esencial de *Mentha Spicata* (Hierbabuena) sobre los microorganismos de interés *E. Coli* y *Aspergillus Niger*.

Establecer la formulación de un Queso Dip empleando el aceite esencial de *Mentha Spicata* (Hierbabuena) como aditivo conservante de origen natural.

Caracterizar las propiedades microbiológicas, sensoriales y fisicoquímicas del Queso Dip adicionado con el aceite esencial.

Línea de Investigación

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Marco Teórico y conceptual

Enfermedades Transmitidas por ingesta de Alimentos Contaminados

Las ETAs o enfermedades transmitidas por alimentos son cuadros clínicos de carácter sintomáticos que son ocasionados por el consumo de alimentos o agua con presencia de microorganismos patógenos o sustancias tóxicas. (Orberá R., 2004).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son ampliamente reportadas por las autoridades sanitarias y tienen un importante impacto negativo en materia de salud pública y en la economía global, la persistencia de las ETAs se atribuye a factores como la geo demografía, cultura y economía. (Gandhi & Chikindas, 2007).

Para la región de Latinoamérica, la OPS como organización directora, ha trabajado con los países del hemisferio, buscando una respuesta efectiva respecto al tema de las enfermedades transmitidas por alimentos, buscando crear y fortalecer los programas nacionales de vigilancia y control de alimentos. No obstante, se han evidenciado debilidades en la implementación de dichos programas, especialmente en cuanto a la notificación y seguimiento de los brotes y el análisis de datos obtenidos para direccionar a las autoridades sanitarias en cuanto a la identificación del tipo de microorganismos patógenos causantes de diferentes cuadros clínicos y así evitar que se sigan presentando (Kopper et al., 2009).

En Colombia las ETAs son catalogadas por las autoridades sanitarias como un grave problema de salud pública, dado que se han reportado y registrado un incremento en el reporte anual de brotes de enfermedades, se resalta que a partir del año 2010 se ha visto un incremento gradual, destacando una importante participación de los casos por parte del departamento de Antioquia (Marina, 2010).

Tecnologías para la prevención de ETAs

Los diferentes sistemas de calidad adoptados en el mundo con el ánimo de garantizar la inocuidad de los alimentos, han establecido y regulado diversos métodos para evitar la contaminación microbiana, estas directrices básicamente han descrito diferentes metodologías y tecnologías. Dentro de los métodos de control microbiológico y de calidad más utilizados se destacan: las tecnologías para aplicar tratamientos térmicos, el almacenamiento en condiciones de refrigeración, el desarrollo de empaques y atmosferas modificadas y el uso de conservantes químicos.

Métodos empleados para tratamiento térmico

Los microorganismos patógenos: bacterias y levaduras son eliminados a temperaturas cercanas a los 100 grados Celsius, algunos bacilos capaces de esporular presentan resistencias al calor. Los tratamientos térmicos generalmente deben acompañarse de otras medidas de control, para evitar la presencia de patógenos en el producto final. Dentro de los tratamientos térmicos más empleados actualmente se encuentra la pasteurización y la esterilización. (Forsythe, Hayes, Pérez, & Scott, 2002).

Aditivos conservantes y biocidas químicos

El control microbiológico ejercido por estas sustancias tiene como fundamento la reducción del pH y la actividad acuosa del producto al cual han sido adicionados. En este grupo de aditivos conservantes se destacan los siguientes compuestos permitidos para su uso en alimentos: benzoatos, acetatos, sorbatos, propionatos, y antibióticos.

Estos compuestos tienen un efecto bactericida que destruye los microorganismos patógenos o actúan fundamentalmente como inhibidores que se conocen como bacteriostáticos del crecimiento microbiano.

El uso de los aditivos conservantes está regulado por las autoridades sanitarias mundiales y nacionales, referente a las concentraciones permitidas en Colombia, solo se puede añadir un conservante hasta el 0.1% en la formulación de una matriz alimentaria. (Sauceda, 2011).

Sustancias naturales de conservación

Las plantas mediante su metabolismo secundario tienen la capacidad de sintetizar sustancias aromáticas, que son fenoles y terpenos, dentro de esta mezcla de compuestos obtenidos por diferentes metodologías de extracción y purificación se destacan los aceites esenciales provenientes de las especias aromáticas, diferentes estudios a partir de estos compuestos se han encontrado actividad inhibitoria sobre bacterias y hongos (Acevedo et al., 2007).

Los aceites esenciales poseen una demostrada funcionalidad como: farmacológicos, antioxidantes y biocidas, adicionalmente son más biodegradables que otras sustancias como antibióticos y conservantes de uso tradicional en alimentos (Ríos & Recio, 2005).

Mecanismo de acción bactericida de los aceites esenciales

El fenómeno bioquímico o mecanismo es el de incrementar la permeabilidad de la membrana microbiana, permeando la membrana citoplasmática ocasionando la pérdida de iones, esto conduce a la disminución del pH, así mismo, se ha demostrado la inhibición en la síntesis de ATP y la replicación de ADN, eventos que conllevan a la muerte celular. (Ben Arfa *et al.*, 2006).

Algunos estudios del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales sobre microorganismos patógenos y su caracterización se pueden observar en la tabla 1.

| Planta | | Código (parte usada) | Lugar de procedencia | Compuestos mayoritarios, cantidad relativa (%) | | | | | |
|---------------------|---------------------------|----------------------|--|--|--------------------|-----------|------|--|-----|
| Nombre común | Nombre científico | | | Sustancias | I _{R-DBS} | SDE | MWHD | | |
| Orégano común | <i>Origanum vulgare</i> | OC (hojas) | Cultivo experimental CENIVAM | Carvacrol | 1317 | 62,0 | 53,7 | | |
| | | | | γ -Terpineno | 1068 | 9,5 | 10,6 | | |
| | | | | <i>p</i> -Cimeno | 1035 | 7,5 | 8,6 | | |
| | | | | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 1440 | 4,7 | 6,6 | | |
| Orégano cimarrón | <i>Lippia origanoides</i> | LOF (flores) | Cultivo experimental CENIVAM | Carvacrol | 1317 | 42,5 | | | |
| | | | | <i>p</i> -Cimeno | 1035 | 9,8 | | | |
| | | | | γ -Terpineno | 1068 | 8,9 | | | |
| | | | | Timol | 1298 | 6,7 | | | |
| | | LOH (hojas) | Cultivo experimental CENIVAM | Carvacrol | 1315 | ---- | 44,4 | | |
| | | | | Timol | 1294 | ---- | 14,3 | | |
| | | | | Carvacrol + Timol | 1318 | 53,2 | ---- | | |
| | | | | γ -Terpineno | 1068 | 8,2 | 10,0 | | |
| | | | | <i>p</i> -Cimeno | 1035 | 10,1 | 9,5 | | |
| Tomillo | <i>Thymus vulgaris</i> | TOM (hojas) | Cultivo experimental CENIVAM | Timol | 1298 | 35,8 | 34,0 | | |
| | | | | <i>p</i> -Cimeno | 1035 | 19,5 | 17,7 | | |
| | | | | γ -Terpineno | 1068 | 9,7 | 6,8 | | |
| | | | | Carvacrol | 1315 | 4,3 | 5,7 | | |
| Orégano de Castilla | <i>Lippia micromera</i> | ODC (hojas) | Mercado local | Timol | 1298 | 29,4 | 24,7 | | |
| | | | | <i>p</i> -Cimeno | 1035 | 8,4 | 19,2 | | |
| | | | | Metil-timil-éter | 1236 | 14,3 | 16,5 | | |
| | | | | γ -Terpineno | 1068 | 14,3 | 4,8 | | |
| | | | | | | Carvacrol | 1315 | | 3,5 |
| | | LM (hojas) | Cultivo experimental CENIVAM | Timol | 1298 | 34,1 | | | |
| | | | | Metil-timil-éter | 1236 | 13,8 | | | |
| | | | | γ -Terpineno | 1068 | 9,6 | | | |
| Eucaliptol | 1036 | | | 6,6 | | | | | |
| | | | | <i>p</i> -Cimeno | 1035 | 6,3 | | | |
| Orégano rastrero | OR (hojas) | Mercado local | Mentona | 1171 | 36,0 | | | | |
| | | | Pulegona | 1254 | 33,5 | | | | |
| | | | Timol + <i>trans</i> -Anetol + Carvacrol | 1293 | 6,9 | | | | |
| | | | <i>iso</i> -Mentona | 1177 | 4,1 | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Mejorana | <i>Origanum majorana</i> | MEJ (hojas) | Cultivo experimental CENIVAM | Terpinen-4-ol | 1189 | 25,9 | | | |
| | | | | γ -Terpineno | 1068 | 11,6 | | | |
| | | | | Linalol + <i>cis</i> -4-Tujanol | 1102 | 10,3 | | | |
| | | | | α -Terpineno | 1023 | 8,1 | | | |
| | | | | <i>cis</i> -Piperitol | 1189 | 6,0 | | | |
| | | | | Sabineno | 979 | 5,8 | | | |

Tabla 1. Caracterización de algunas especies aromáticas (Acevedo 2007)

Fundamentos de los Aceites Esenciales

Los AEs son productos químicos derivados del metabolismo secundario de las plantas y están presentes en diferentes partes de las mismas, especialmente en las hojas.

Son mezclas de componentes volátiles que poseen una fracción de hidrocarburos polimetilénicos conocidos como terpenos, junto con otros compuestos casi siempre oxigenados como mezclas complejas de aldehídos, cetonas, ésteres y terpenos, con alta solubilidad en alcohol y característica apolar. Esta composición química atribuye a los aceites esenciales un aroma característico y les reviste interés tecnológico en las industrias farmacéuticas y alimenticias. (García *et al.*, 2010).

Metodologías para la extracción de los aceites esenciales

Para obtener el aceite esencial contenido en la muestra en fresco de material vegetal, se han reportado diferentes técnicas y métodos dentro de las cuales se destacan: el enfleurage, el arrastre con vapor de agua y la extracción por fluidos supercríticos empleando gas carbónico, estas técnicas se han empleado para cada estudio dependiendo de las necesidades. (Martínez M., 2003).

El método más utilizado para obtener aceites esenciales es la destilación simple: hidrodestilación y el arrastre por vapor, técnicas sencillas y económicas.

El método de extracción por arrastre con vapor es una técnica que consiste en tomar una muestra vegetal fresca, la cual es depositada en una cámara sometida a un flujo constante de vapor saturado; El aceite esencial es arrastrado y posteriormente condensado, para ser recolectado en un embudo de decantación donde es separado de la fracción acuosa. Esta metodología reporta altos rendimientos y pureza del aceite obtenido. (Peredo, García, & López, 2009).

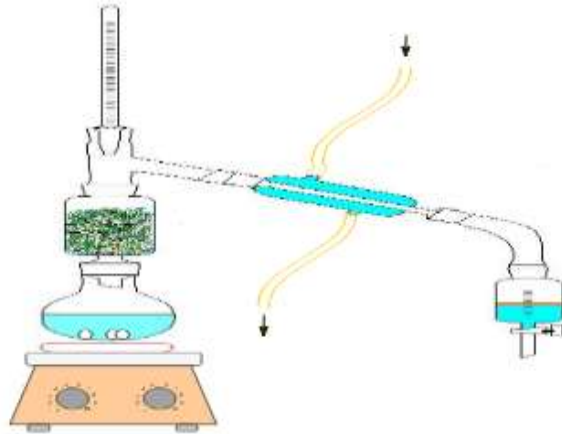


Figura 1. Extractor de aceites esenciales por arrastre con vapor (Martínez, 2003)

Caracterización de los Aceites esenciales

Los estudios realizados sobre composición química de aceites esenciales pretenden identificar los componentes individuales mediante técnicas analíticas que abarcan el aislamiento y la purificación de las sustancias.

Dentro de estas técnicas analíticas se destaca la cromatografía de gases, una tecnología que permite la separación de mezclas; una vez separados los compuestos se pueden detectar e incluso cuantificar individualmente. (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Acoplado a la cromatografía se emplea la espectrometría de masas, por medio de la cual se puede identificar cualquier sustancia pura. (Gutiérrez & Droguet, 2002).

Métodos implementados para la identificación de actividad biocida en los AEs

Metodología de halos de inhibición

Es un estudio fundamentado en la difusión en disco de papel filtro, este método permite identificar si hay inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos patógenos a estudiar, se utilizan cajas de Petri inoculadas con el MO a evaluar; se emplean los siguientes métodos para la incorporación del AE: en un disco de papel filtro o un pozo en medio de la placa.

La actividad antimicrobiana es observable y se mide por el diámetro en la zona de inhibición que rodea el disco y se registra en milímetros (Cano, Bonilla, & Roque, 2008).

La sustancia antimicrobiana difunde desde el disco de papel impregnado hacia el medio produciendo un perímetro de inhibición en la cual una concentración específica inhibe el crecimiento poblacional de la bacteria que se estudia.

Hierbabuena

La variedad *Mentha spicata* es una especia aromática originaria de Asia, pertenece a la familia Lamiaceae, que puede llegar a medir hasta 30 centímetros de altura, tiene Hojas verdes oscuras y ovaladas con un marcado aroma a menta, es una planta perenne, catalogada como su arbusto, como la mayoría de las especias aromáticas es el tallo erecto con hojas enteras. (Fuentes, 2005).

Aspectos Metodológicos

Primera etapa:

La primera etapa del proyecto se realizó en tres fases: la obtención de material vegetal, la extracción del aceite esencial y su respectiva caracterización:

Fase I: Obtención del Material Vegetal:

El material vegetal se obtuvo en el corregimiento de Santa Helena, Municipio de Medellín, Oriente Antioqueño Cercano, Este material será verde y fresco de corte reciente cosechado a siete semanas de cultivado, se acopiaran 1 kilogramos para cada sesión de extracción, este material será acondicionado mediante limpieza y separación de tallos

Fase II: Extracción de Aceites Esenciales:

Se empleó el método de arrastre con vapor porque es la técnica más económica y de fácil montaje, se reportan óptimos rendimientos en la literatura a bajo costo. En esta fase se realizó el montaje y la optimización del método de extracción del AE en las instalaciones de la UNAD CEAD Medellín.

El montaje requiere de tres componentes básicos: generador de vapor, tanque de extracción y condensador, además de tres variables importantes como: tiempo de secado del material, tiempo de extracción, presión de vapor, temperatura de destilación y eficiencia del condensador. Con un buen control de los factores anteriormente mencionados se han alcanzado rendimientos en la extracción de AEs en el rango de 0.15% al 1% expresado en volumen (mL)/100 (g).

Fase III: Caracterización de Aceites Esenciales:

Posterior a la extracción se realizó la caracterización química del aceite esencial, con la finalidad de determinar sus componentes bioactivos, esto se logró usando la técnica Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masa (CG-EM). La identificación de las sustancias se basó en un análisis comparativo de sus espectros de masas con el banco de datos.

Segunda etapa: Determinación del efecto biocida

La segunda etapa del trabajo se centró en determinar el efecto biocida del AE de *Mentha Spicata* (Hierbabuena), sobre los microorganismos de interés: *E. coli spp* y *Aspergillus Niger*, cepas que fueron adquiridas en laboratorio de referencia para la prueba CMI, se empleó el método de difusión de agar para estimar el grado de inhibición o crecimiento de los microorganismos. Se usó para la incorporación del AE el método en disco de papel filtro. El efecto biocida del AE se estableció observando y midiendo el diámetro de la zona o halo de inhibición alrededor del disco de papel filtro impregnado. (Kalemba & Kunicka, 2003).

Estandarización para implementar el método en disco de papel filtro y CMI

Para la muestra control y la muestra testigo, se emplearon dos de los aditivos conservantes más comunes en la industria láctea para la formulación de un queso Dip: Sal de sodio del ácido benzoico y sal de potasio del ácido sorbico en concentración 0.01%, acorde con la dosis establecida por la resolución 4125 de 1991.

Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria mediante la prueba CMI colorimétrica por diluciones, ensayos con cepas de *E. Coli* y *Aspergillus Niger*, con microplatos de 96 pozos (Ciro Gelmy, 2010).

El crecimiento de la bacteria se comparó con una muestra control y una muestra testigo.

Tercera etapa: Inclusión del aceite esencial al producto y análisis

En esta etapa del proyecto hallada la concentración adecuada del AE de *Mentha Spicata* (Hierbabuena) para ser incorporado en la formulación del Queso Dip, para lo cual se tomó como referencia el porcentaje máximo de adición permitidas al usar conservantes en los derivados lácteos y los resultados de concentración mínima inhibitoria. Además, se evaluó el momento y modo de inclusión de este aditivo, tomando los tres momentos cruciales del proceso de fabricación del Queso Dip, con el fin de lograr estandarizar el momento del proceso de elaboración adecuado para adicionar el AE; el modo de inclusión se realizó basándose en los análisis de difusión de los AEs.

Cuarta etapa: Análisis Sensorial por aproximación Multidimensional

Los análisis sensoriales se realizaron con el objetivo de conocer la preferencia, aceptación y grado de satisfacción de los posibles consumidores determinando la posible diferencia entre los caracteres sensoriales propios del producto. El conjunto de pruebas, utilizadas para la valoración de los caracteres sensoriales de un queso Dip se distribuye en tres grupos: hedónicas, discriminantes y descriptivas (Goñi et al., 2009). Se realizó una prueba discriminativa, para la cual se contrataron por servicios técnicos la prueba por jueces entrenados. Los análisis sensoriales: color, olor, sabor y textura se diseñaron con una prueba de Perfil Sensorial por aproximación multidimensional según los parámetros establecidos en la NTC 3932 y GTC 165, para determinar cambios en la calidad sensorial del producto con diferentes niveles de adición del AE. Se diseñó una prueba hedónica, en la cual los panelistas determinaron la aceptación del Queso Dip con AE de Hierbabuena.

Resultados obtenidos

1. Primera etapa:

La primera etapa del proyecto se ha realizado en tres fases: la obtención de material vegetal, la extracción del aceite esencial y su respectiva caracterización:

1.1. Obtención del Material Vegetal:

Características del material obtenido:

Este material recolectado de la especie Hierbabuena (*Mentha spicata*) es verde y fresco, condiciones fenotípicas aptas para exportación, de corte reciente cosechada a siete semanas de cultivado, se acopian 6 Kilogramos para emplear 1 kilogramo en Seis sesión programadas para la extracción del aceite esencial. Este material será acondicionado mediante limpieza y separación de tallos.



Fotografía 1. Vista panorámica cultivos especies aromáticas. Morales J.



Fotografía 2. Invernadero Hierbabuena por semanas de siembra. Morales J.



Fotografía 3. Lote muestra obtenida de Hierbabuena 7 semanas. Morales J.



Fotografía 4. Muestra de Hierbabuena 7 semanas objeto del estudio. Morales J.

1.2. Proceso de extracción del aceite esencial:

Se utilizó el método de arrastre con vapor de agua porque es la técnica más económica y de fácil montaje, el equipo empleado se visualiza en la fotografía número 5, se realizaron doce sesiones de extracción que duraron 45 minutos cada una.



Fotografía 5. Montaje equipo Hidrodestilación. Morales J.

Admisión de la muestra al equipo de extracción:

Se emplearon 1000 gramos de muestra aproximadamente tras la adecuación del material vegetal según se reporta en la tabla 1.



Fotografía 6. Muestra en recipiente de arrastre con vapor. Morales J.



Fotografía 7. Montaje Embudo de decantación para separación del aceite esencial.
Morales J.



Fotografía 8. Aceite esencial obtenido. Morales J.

1.3. Caracterización del aceite esencial:

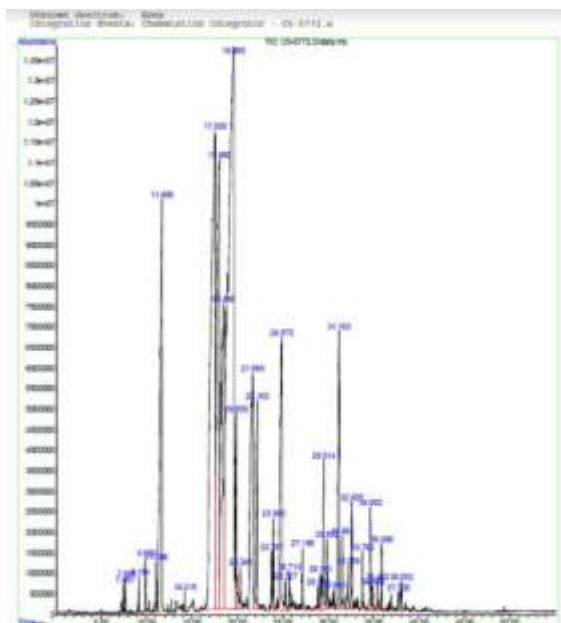
Se realizó la caracterización química del aceite esencial, con la finalidad de determinar sus componentes bioactivos empleando la técnica de Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masa (CG-EM). La identificación de las sustancias será basada en un análisis comparativo de sus espectros de masas con el banco de datos.

Tabla 2. Datos obtenidos extracción del aceite esencial de Hierbabuena

Cálculo de rendimiento extracción (%):

Volumen obtenido AE (ml) * densidad (0,9 g/ml) / Masa muestra (g) * 100

| Sesión de extracción Nro. | muestra peso en fresco (g) | temperatura de trabajo (°C) | Presión cilindro (PSI) | Tiempo empleado (min) | AE obtenido (mL) | Calculo del rendimiento (%) |
|--|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| 1 | 946 | 95-100 | 30 | 45 | 1,9 | 1,80 |
| 2 | 1103 | 90-95 | 30 | 45 | 2,3 | 1,87 |
| 3 | 990 | 94-98 | 30 | 45 | 2,0 | 1,81 |
| 4 | 1032 | 97-100 | 30 | 45 | 2,1 | 1,83 |
| 5 | 988 | 92-98 | 30 | 45 | 2,0 | 1,82 |
| 6 | 1040 | 95-98 | 30 | 45 | 2,2 | 1,90 |
| 7 | 930 | 96-100 | 30 | 45 | 1,9 | 1,83 |
| 8 | 1030 | 94-98 | 30 | 45 | 2,1 | 1,83 |
| 9 | 984 | 97-99 | 30 | 45 | 2,0 | 1,82 |
| 10 | 1000 | 98-100 | 30 | 45 | 2,0 | 1,80 |
| 11 | 1100 | 96-100 | 30 | 45 | 2,2 | 1,80 |
| 12 | 1040 | 97-99 | 30 | 45 | 2,1 | 1,81 |



Imágen 1. Grafica resultados caracterización Cromatográfica

La identificación individual de los compuestos se estableció según los espectros de masas, usando la base de datos que presente una mayor probabilidad de coincidencia en las bases de datos NISTO2.L y NIST5A.L mayores a 90%.

La siguiente información es generada por el software MSD 100CHEM Station. En esta se identifican:

- (1) Numero de pico, (2) Tiempo de retención, (3) Porcentaje de área, (4) Base de datos e identificación tentativa, (5) referencia en las bases de datos NIST, (6) Numero CAS del compuesto y (7) Probabilidad de coincidencia.

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: Chemstation Integrator - C5-0772.e

| PK# | RT | Area% | Library/ID | Ref# | CAS# | Qual |
|-----|--------|-------|---|---------------------------|---|----------------|
| 1 | 7.479 | 0.16 | C:\Database\NIST98.L Cyclohexanol, 3-methyl- Cyclohexanol, 3-methyl- cis-3-Methylcyclohexanol | 114615 24662 24617 | 000591-23-1 000591-23-1 005454-79-5 | 96 90 64 |
| 2 | 7.699 | 0.12 | C:\Database\NIST98.L 1S-.alpha.-Pinene .alpha.-Pinene 1R-.alpha.-Pinene | 40167 40169 40147 | 007785-26-4 000088-56-8 007785-70-8 | 96 95 94 |
| 3 | 9.188 | 0.14 | C:\Database\NIST98.L Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethy 1-2-methylene-, (1R)- .beta.-Pinene Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethy 1-2-methylene-, (1S)- | 117797 117803 39661 | 018172-67-3 000127-91-3 018172-67-3 | 95 94 94 |
| 4 | 9.884 | 0.40 | C:\Database\NIST5a.L 3-Octanol 3-Octanol 5-Ethyl-3-methylhept-1-en-4-ol | 13205 13192 27118 | 000589-98-0 020296-29-1 286424-80-4 | 53 50 50 |
| 5 | 11.082 | 0.44 | C:\Database\NIST98.L Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl) | 120737 | 000535-77-3 | 95 |

Imagen 2. Identificación de compuestos con mayor abundancia relativa

Tabla 3. Participación de los componentes del AE de hierbabuena (*Mentha spicata*).

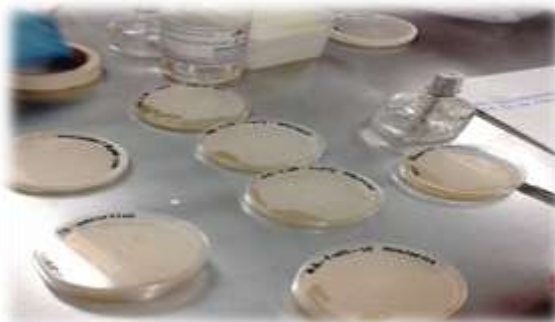
| Tiempo de cosecha | Componentes mayoritarios | Tiempo de retención (min) | Abundancia relativa (%) |
|-------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 7 semanas | Menthol | 19.582 | 75.96 |
| | Carvotanacetone | 21.67 | 5.90 |

2. Segunda etapa: Determinación del efecto antimicrobiano

La segunda etapa del trabajo se concentró en determinar el efecto biocida del AE de *Mentha Spicata* (Hierbabuena), sobre la actividad patógena los microorganismos objeto del estudio.

Los microorganismos de referencia empleados en el estudio son: *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Aspergillus niger* ATCC 0392.

2.1. Estudio del grado de inhibición del crecimiento de microorganismos:



Fotografía 9. Siembra en agar con discos de papel filtro. Morales J.



Fotografía 10. Halo de inhibición Control negativo, Control positivo y. Morales J.

Tabla 4. Halos de inhibición del AE de hierbabuena sobre *E. Coli*.

| | Caja 1 | Caja 2 | Caja 3 |
|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Concentración empleada AE | (mm) | (mm) | (mm) |
| 14 μL | 13 | 11 | 12 |

| | |
|---|---|
| Caja de Petri control negativo | No se observa crecimiento del MO. |
| Caja de Petri control positivo | Se observa crecimiento del microorganismo de forma uniforme y completa. |

2.2. Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite esencial:

Para la evaluación de la CMI del aceite esencial de Hierbabuena, fue utilizado el método colorimétrico de microdilución.

La prueba se efectuó en dos micro platos de 96 pozos con fondo plano. Inicialmente, se realizaron diluciones seriadas del aceite esencial en diferentes concentraciones hasta 8192 partes por millón.

Se realizó la siembra en los pozos de una fila a los cuales se le adicionó el medio para cultivo: caldo MH. Una alícuota de los microorganismos, en crecimiento exponencial, se diluyó hasta una absorbancia similar al patrón de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), suspensión microbiana que fue utilizado inocular los microplacas. La incubación de los microplatos se realizó a 37° C durante 4 h. Como controles de la prueba se implementó el control del medio de cultivo con el inóculo, el control del medio de cultivo estéril y el control del diluyente.

Cada una de las muestras fue evaluada por triplicado.

Transcurridas 4 horas después de la incubación se adicionó bromuro MTT en una concentración de 0.8 mg / mL a cada pozo y las placas se incubaron a 37 grados

Celsius por una hora, tiempo necesario para que los microorganismos metabolicen el MTT.

Un cambio de color a un azul nos demuestra visualmente el crecimiento del MO.



Imagen 3. CMI Aceite esencial Hierbabuena contra *Escherichia coli* ATCC 8739



Imagen 4. CMI Aceite esencial Hierbabuena contra *Aspergillus niger* ATCC 0392.

Tabla 5. Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas.

| ACEITE ESENCIAL | MICROORGANISMO | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>) | <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | <i>Aspergillus niger</i> ATCC 0392 |
| | 1024 | * |

* No presento actividad antimicrobiana en los rangos de 8 a 8192 ppm
(0.08– 8.192 %)

3. Tercera etapa: Inclusión del aceite esencial al producto y análisis

Elaboración y Análisis Sensorial del queso Dip

El queso Dip fue elaborado usando leche pasteurizada y homogenizada con una acidez titulable de 0,16% de ácido láctico según la norma vigente con una adición de crema de leche del 20% sobre la base de la formulación en gramos, el queso untable se obtuvo por medio de coagulación mixta a 35 grados Celsius usando bacterias ácido lácticas y cuajo de origen fúngico, luego de desuerado se procedió a adicionar el aceite esencial en concentración de 1024 ppm acorde con la normativa de aditivos conservantes, posteriormente se empaco en estéril y almaceno en condiciones de refrigeración.

Se envió muestra para realizar la prueba sensorial mediante un perfil por aproximación multidimensional, la evaluación por parte de jueces entrenados se registran en la gráfica 1. La calidad del queso Dip fue establecida como media - alta, la nota de sabor que resalta es refrescante con alta intensidad. La característica física predominante fue la yesosidad del queso, cabe anotar que esta característica no se le

atribuye a la adición de AE, esta se atribuyen los insumos empleados en la formulación del queso Dip.

Los aspectos físicos y de apariencia general son los característicos del queso Dip. Se evidencia la pérdida parcial de notas lácteas, sobresale la nota herbal, lo cual es atribuible a la adición del AE de hierbabuena.

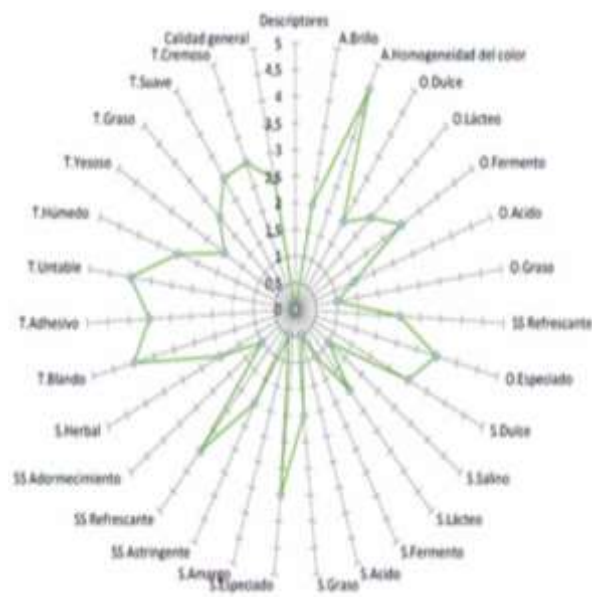


Imagen 5. Gráfica perfil sensorial.



Fotografía 11. Foto del queso Dip con AE de hierbabuena

Discusión de resultados

Proceso de extracción

Trabajos realizados para extraer de especias aceites esenciales empleando la metodología de arrastre con vapor reportan rendimientos de 1.3%. (Martinello & Pramparo, 2005).

Mediante la implementación de la metodología de destilación simple con vapor de agua se reportan rendimientos de 1.35% (Cerpa, 2007).

Los rendimientos y pureza obtenidos en las sesiones de extracción se encuentran acordes con lo reportado en la literatura, donde se expresan rendimientos desde 0.5 hasta el 2% de aceite esencial.

Se puede afirmar que empleando para el estudio la metodología de arrastre con vapor, los porcentajes en cuanto a rendimientos de extracción son menores al 1,96%, se exceptúan resultados de experimentos a partir del clavo de olor donde se reportan altos contenidos de aceites esenciales empleando la misma metodología. (Ribeiro, 2001).

Estudio del aceite esencial extraído

El cromatograma obtenido del análisis CG-EM efectuado al aceite esencial de hierbabuena ilustra al Mentol como componente mayoritario con una abundancia relativa de 75.96% como se ilustra en la tabla 6.

A este compuesto se le puede atribuir la nota menta como característica de olor y sabor en el producto final y se supone la mayor responsabilidad en el efecto biocida.

Actividad inhibitoria sobre microorganismos de estudio

El aceite esencial de hierbabuena presento actividad antimicrobiana frente al microorganismo patógeno *E. coli*. Los resultados de la metodología de la inhibición en placas de petri en la tabla 4, donde se evidencia esta actividad. En la imagen 3 y la imagen 4, se relacionan los resultados encontrados en la prueba de CMI, donde se observa actividad bactericida en 1024 ppm como concentración mínima sobre *E. coli*. y no se presenta inhibición de crecimiento sobre *Aspergillus niger*.

Análisis sensorial del producto con el aceite esencial aplicado

Los resultados arrojados al someter la muestra a un estudio sensorial, se pueden apreciar en la Imagen 5. Se estableció para el queso Dip una calidad general media - alta, aunque hay pérdida parcial de notas lácteas, sobresaliendo atributos sensoriales como el herbal producido por la adición del AE de hierbabuena es una evaluación de aceptación positiva dado el alto impacto de los aceites esenciales en matrices alimentarias.

En investigaciones relacionadas con los derivados lácteos adicionando AE de tomillo en quesos y en bebidas lácteas con aceites esenciales de clavo de olor y la canela, estos resultados demostraron que las características organolépticas son afectadas significativamente, lo cual refuerza que la sinergia y matiz sensorial de sabor y olor del mentol en quesos tipo Dip es prometedora.

Conclusiones y recomendaciones

La especia aromática Hierbabuena (*Mentha Spicata*) cultivada en el corregimiento de Santa Helena Antioquia, cosechada con 7 semanas al corte fue seleccionada en cuanto al tiempo para la extracción del aceite esencial por ser esta la edad óptima para su comercialización y/o exportación dada su plenitud de características físicas y biológicas, respecto a los rendimientos de extracción se puede afirmar que no obstante el uso de la metodología de extracción del aceite esencial por arrastre con vapor cuyo rendimiento y pureza es inferior a técnicas analíticas como la extracción por fluidos supercríticos, se obtuvieron rendimientos y pureza acordes con los reportados en el estado del arte; En cuanto al análisis de componentes se encontró como el componente de mayor abundancia en el aceite esencial extraído el menthol; El efecto bactericida sobre el microorganismo patógeno *E. Coli ssp* en su concentración mínima inhibitoria es 1024ppm y no hay actividad biocida sobre el microorganismo *Aspergillus Niger*. La formulación del queso Dip y su elaboración se realizó bajo las condiciones de proceso ceñidos a la normatividad vigente y la muestra sometida a la evaluación sensorial permite recomendar el uso del aceite esencial estudiado como aditivo antimicrobiano de origen natural para el queso tipo Dip.

Los resultados sugieren como recomendación general el desarrollo de otros estudios, para cubrir un amplio espectro de microorganismos patógenos empleando el aceite esencial de hierbabuena y a su vez estudiar los Aes provenientes de otras especias aromáticas que se cultivan en la región de Antioquia con alto potencial de aprovechamiento de residuos agroindustriales provenientes de esta cadena productiva.

Bibliografía

- Albarracín, F., Sarmiento, P., Carrascal, A., & Mercado, M. (2006). Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *BISTUA*, 4(2), 30–41.
- Ansari, K., & Goodarznia, I. (2012). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using Taguchi methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 67, 123–130. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.03.011>.
- Benites, Julio. Bravo, Felipe. Rojas, Mauricio. Feuntes, Rose. Moiteiro, Cristina. Venancia, F. (2011). Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and plant material, 2(12602), 2009–2011.
- Ciro Gelmy. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, 17(2), 149-154.
- De Melo, M., Silvestre, A., & Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115–176. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>
- Estibaliz, M., & López, M. (2008). Estimación de la incidencia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Colombia en la década 1996-2006. *Tesis de Pregrado En Microbiología Industrial. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá DC*, 148 p.

- Flores, M. C. (2010). Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso: análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo. Universidad de Chile. Retrieved from http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2010/qf-flores_mc/html/index-frames.html.
- Garcia, C., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales, 86–96.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982–989. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.058>
- Lamiales: Lamiaceae. (1998). *Diversidad Vegetal- Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales Y Agrimensura*, 121–126.
- Jaramillo, A. (2003). *Plantas medicinales en los jardines de las veredas mancilla, la tribuna, pueblo viejo y tierra morada (Facatativa Cundinamarca)*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Kalemba, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829. <http://doi.org/10.2174/0929867033457719#sthash.Ci5z20d0.dpuf>
- Karimia A., J. Hadiana, M. Farzaneha, and A. Khadivi-Khubb. 2014. Phenotypic diversity and volatile composition of Iranian *Artemisia dracunculoides*. *Industrial Crops and Products* 65, 315-323. Doi: www.elsevier.com/locate/indcrop
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C., & Dubey, N. (2014). Antifungal,

antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.027>.

Lawless, H., & Heymann, H. (1998). *Sensory evaluation of food. Principles and practices*. New York: Chapman & Hall. Retrieved from http://books.google.com.au/books?id=btr7vejpdwac&pg=pr3&hl=es&source=gb_s_selected_pages&cad=2#v=onepage&q&f=false.

Marina, T. (2010). *Incidencia ETA*. Instituto Nacional de Salud (INS). Protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos y DSSA, 2010. Secretaria de Salud Medellín.

Martinez, A., Ospina, F., Valencia, G., & Jimenez, N. (2003). *Manual de Practicas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica 2003*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Medellín. Colombia.

Mesa, Ana Cecilia. Montiel, Jehidys. Martínez, Catalina. Zapata, Bibiana. Pino, Nayive. Bueno, Juan Gabriel. Stashenko, E. (2007). Actividad in vitro anti- *Candida* y anti-*Aspergillus* de aceites, (33), 247–249.

Mira, B., Blasco, M., Berna, A., & Subirats, S. (1999). Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, 14(2), 95–104. [http://doi.org/10.1016/S0896-8446\(98\)00111-9](http://doi.org/10.1016/S0896-8446(98)00111-9).

Morales, A., Higuera, J., & Cadena, E. (2014). Efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre *Listeria monocytogenes*. *Revista Facultad*

Nacional de Agronomía ISSN 0304-2847, 67, Suplemento.

Muñoz, A., Castañeda, M., Blanco, K., Cardenas, C., Reyes, J., Kouznetsov, V., & Stashenko, E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol, (33), 125–128.

Pumaylle, K. O., Ricardo, L., Quiroz, P., Liz, D., Luján, B., Justino, R., & Paz, S. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd Extraction, characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wed, 3, 291–302.

Ramírez, L. S., Isaza, J. H., Veloza, L. Á., & Stashenko, E. (2009). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia Antibacterial activity of *Lippia origanoides* essential oils from different Colombian regions, 17(December), 313–321.

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

Salud, M. (1986) Resolución 02310. Por el cual se reglamenta el Título V Alimentos de la Ley 09 de 1979 en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos. (1986). Colombia.

Salud, M. (1991). Colombia. Abril 5: Por el cual se reglamenta el Título V Alimentos de la Ley 09 de 1979 en lo Resolución 4125 concerniente a los conservantes utilizados en Alimentos.

Sánchez, F. (Universidad N. de C.). (2006). II Segundo Congreso Internacional De Plantas Medicinales Y Aromáticas Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. In F. (Universidad N. de C.) Sánchez (Ed.), Extracción De Aceites

Esenciales. Experiencia Colombiana. Bogota D.C.

Solís, P. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de Orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como Potenciales Bioconservadores en Carne de Pollo.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.
<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>.

Vásquez, O., & Alenguer, A. (2001). Extracción y Caracterización del Aceite Esencial de Jengibre (*Zingiberofficinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 42, 38–42.