

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

ESTUDIOS CON RECONOCIMIENTO DE VALIDEZ OFICIAL

R.V.O.E.SEP- SES/21/114/04/059/2009



MONOGRAFÍA

ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*THYMUS VULGARIS*) APLICADO COMO CONSERVADOR EN UN PAN ARTESANAL (*FOCACCIA*)

Que para obtener el Título de

LICENCIADO EN GASTRONOMÍA

Presenta

Minia Mabell Hernández Longoria

PUEBLA, PUE.,

Mayo 2021



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

INTRODUCCIÓN	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS.....	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Aceites esenciales	8
Clasificación.....	10
Métodos de extracción.....	11
Tomillo (<i>Thymus Vulgaris</i>).....	15
Aceite esencial de tomillo.....	16
Propiedades antimicrobianas de aceite esencial de tomillo	20
Aplicación de aceite esencial fase vapor.....	21
Pan.....	23
Focaccia.....	24
Deterioro microbiano del pan.....	25
Plan de Investigación	27
Materiales y métodos.....	28

Aplicación	31
Evaluación	32
Resultados	33
Resultados sensoriales.....	34
Conclusiones	35
Referencias	36

INTRODUCCIÓN

La historia de la conservación de alimentos está estrechamente relacionada a la evolución humana, resultando fundamental para la supervivencia durante las travesías nómadas; así como posteriormente en los asentamientos. Dado que los alimentos se tomaban de la naturaleza a través de la recolección, la caza o la pesca, se vio la necesidad de guardar parte de las provisiones para prevenir una eventual escasez en caso de pérdidas de cosechas, conflictos bélicos o epidemias, lo que obligó a la humanidad a pasar de ser únicamente recolectora a convertirse en productora de alimentos y de ahí, a desarrollar técnicas rudimentarias de conservación que tenían como principios el aire, el sol, la sal, el fuego o el hielo y con lo cual, conseguían conservar por lapsos más o menos prolongados la vida útil de los alimentos.

De entre los alimentos producidos, el pan artesanal se convirtió en un elemento básico, elaborado bajo un proceso en el que la harina de trigo, el agua, la sal o el azúcar se mezclan en proporciones variables sometidas a fermentación mediante levadura y posterior horneado. Sin embargo, así como lo menciona Irene Pateras (2007), el pan es un producto perecedero, que es mejor cuando se consume "fresco". Desafortunadamente, el pan permanece realmente "fresco" solo unas pocas horas después de que sale del horno. Durante el almacenamiento se somete a una serie de cambios que conducen a la pérdida de su frescura organoléptica. Los factores que gobiernan la tasa de pérdida de frescura en el pan durante el almacenamiento se dividen principalmente en dos grupos: los atribuidos al ataque microbiano, siendo la fuente más común de deterioro del pan por crecimiento de moho y los que son resultado de una serie de cambios químicos o físicos lentos que conducen al progresivo endurecimiento de la miga.

Para entender un poco mejor sobre el deterioro microbiano del pan, Ponte y Tsen, (1978) explican que se debe a la contaminación posterior al procesamiento, debido a su inactivación térmica durante el proceso de horneado. El pan se contamina después de la cocción a partir de las esporas de moho presentes en la atmósfera que rodea los panes durante el enfriamiento, el corte, el envasado y el almacenamiento. El ambiente dentro de una panadería no es estéril porque los ingredientes secos, especialmente la harina, contienen esporas de moho y el polvo de la harina se esparce fácilmente por el aire. Se ha estimado que 1 g de harina contiene hasta 8000 esporas de moho. En algunas panaderías, un número similar de esporas se deposita en 1 m² de superficie cada hora (Doerry, 1990).

Para el caso del presente estudio que versa sobre la acción de preservación de los alimentos, se hará referencia particular a los efectos que el aceite esencial de tomillo ejerce sobre un producto típico de la panadería italiana como lo es la *Focaccia*. Estudios recientes han demostrado que las especies de *Thymus* tienen fuertes actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiparasitarias, espasmolíticas y antioxidantes (Stahl-Biskup & Saez, 2002). Dado que los aceites esenciales poseen naturalmente propiedades que retrasan los procesos de descomposición, dichos aceites serán adicionados en fase vapor para evaluar sus efectos antimicrobianos y su impacto en la preservación de la vida útil de los alimentos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El pan es un producto perecedero debido a su composición, por lo tanto, propenso a un deterioro microbiano, así como al envejecimiento propio del producto, ocasionando endurecimiento de la miga. El pan tiene un corto tiempo libre de cualquier agente microbiano y esto se debe a la exposición de calor durante el proceso de horneado al que anteriormente fue sometido.

Desafortunadamente existen muchos factores que propician al desarrollo de microorganismos, desde el proceso de enfriamiento, manejo inadecuado y su almacenamiento. El deterioro más común de este producto es la aparición de moho, siendo los más comunes los del género *Penicillium* y *Aspergillus* (Moore, 2008).

En la actualidad las grandes productoras de pan han desarrollado nuevas técnicas a beneficio de alargar la vida de los alimentos, ya que estos son susceptibles a un deterioro natural por hongos y bacterias. Actualmente nos encontramos ante una sociedad más consciente y preocupada sobre lo que realmente consumimos, por esta razón es importante utilizar nuevos métodos de conservación naturales que sustituyan aditivos sintéticos.

En este sentido, lo que se busca es utilizar conservadores naturales, basados en la investigación de las propiedades antifúngicas de los aceites esenciales que son extraídos de plantas, semillas y especias.

HIPÓTESIS

El aceite esencial de tomillo (*Thymus Vulgaris*) aplicado en fase vapor inhibe el crecimiento microbiano en el pan tipo *focaccia*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) al adicionarlo en fase vapor en pan artesanal tipo *focaccia*, para determinar el impacto sobre su vida en anaquel.

Objetivos Específicos

- Estandarizar la receta del pan tipo *focaccia*.
- Determinar las concentraciones de aceite esencial de tomillo a adicionar al pan.
- Aplicar el aceite esencial de tomillo por medio de fase vapor en las concentraciones previamente determinadas, en recipientes herméticos que contengan la *focaccia*.
- Monitorear la actividad anti fúngica del aceite esencial de tomillo mediante exposición en fase vapor en una *focaccia*.
- Realizar una evaluación sensorial de la *focaccia* expuesta al aceite esencial de tomillo en fase vapor, en las dos concentraciones probadas.

Aceites esenciales

Definición y características de los aceites esenciales

También llamados aceites aromáticos odoríferos, son líquidos aromáticos extraídos de diferentes partes de las plantas, por ejemplo, hojas, cáscaras, cortezas, flores, capullos, semillas, etc. Se pueden extraer de los materiales vegetales mediante varios métodos como la destilación al vapor, expresión, etc.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos

De acuerdo a Tongnuanchan y Benjakul (2014), los aceites esenciales poseen actividades antioxidantes y antimicrobianas, por lo que sirven como aditivos naturales en productos alimenticios. Pueden usarse como compuestos activos en materiales de embalaje, en los que las propiedades de esos materiales, en particular la propiedad de barrera al vapor de agua asociado con la hidrofobicidad en la naturaleza de los aceites esenciales, puede ser mejorado. Casi cualquier

parte de una planta puede ser la fuente del aceite, que podría extraerse y explotarse por completo para aplicaciones alimentarias u otras. Se han desarrollado continuamente tecnologías modernas para vencer la limitación de los métodos convencionales y mejorar la eficacia de la extracción. Debido a la creciente atención en los aditivos naturales, los aceites esenciales de varias plantas se han utilizado más ampliamente, especialmente junto con otras conservaciones bajo el concepto de "tecnología de obstáculos". Por lo tanto, los aceites esenciales pueden servir como aditivos alternativos o coadyuvantes de procesamiento como tecnología ecológica.

Características

Los aceites esenciales debido a su composición sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada.

Reyes, Palou & López (2012); mencionan tres características a las cuales los aceites esenciales atribuyen su poder antimicrobiano:

- Carácter hidrófilo o hidrófobo: se da una alteración y penetración en la estructura lipídica de la pared celular provocando desnaturalización y muerte de la célula.
- Compuestos químicos: actúan como agentes, interviniendo en la translocación de protones y la fosforilación del ATP.
- Tipo de microorganismo al que ataca: las bacterias Gram negativas poseen mayor susceptibilidad que las Gram positivas in-vitro.

Son aceptados como sustancias seguras (GRAS) por la Agencia de Drogas y Alimentos de E.E.U.U. (FDA) (Code of Federal Regulations, 2003).

Clasificación

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas.

Las Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente.

Los Bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.

Las Oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).

De acuerdo a su origen, los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos.

Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.

Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes.

Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.).

Métodos de extracción

Tongnuanchan y Benjakul (2014), mencionan que los aceites esenciales se pueden extraer de varias plantas con diferentes partes mediante varios métodos de extracción. La fabricación de aceites esenciales y el método utilizado para la extracción del aceite esencial dependen normalmente del material botánico utilizado. El estado y la forma del material es otro factor que se toma en consideración. El método de extracción es uno de los factores principales que determinan la calidad del aceite esencial.

Un procedimiento de extracción inadecuado puede provocar daños o alterar la acción de la firma química del aceite esencial. Esto da como resultado la pérdida de bioactividad y características naturales. En casos severos, pueden producirse decoloración, mal olor / sabor, así como cambios físicos como el aumento de la viscosidad. Deben evitarse esos cambios en el aceite esencial extraído.

Los aceites esenciales se pueden extraer mediante diferentes métodos como: prensado, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enflorado y con fluidos supercríticos.

En el prensado, el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para la extracción de esencias cítricas.

Extracción con solventes volátiles

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes como alcohol o cloroformo. Estos compuestos solubilizan el aceite esencial, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel

industrial resulta costoso por el alto valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias.

Método de enflorado

El material vegetal (generalmente flores) se pone en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (el concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

Método de extracción con fluidos supercríticos

Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo, CO₂). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas mientras que el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente, se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción.

Este procedimiento presenta varias ventajas: alto rendimiento, fácil eliminación del solvente (que además se puede reciclar), no se alteran las propiedades químicas de la esencia por las bajas temperaturas utilizadas para su extracción. Sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.

Destilación por arrastre con vapor de agua

La muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

Extracción Asistida por Microondas

El uso de hidrodestilación asistida por microondas extracción de Aceites esenciales e hidrolatos ha demostrado ser ambientalmente eficiente, ya que al emplearse agua como vehículo de extracción, se elimina el uso de solventes tóxicos y dañinos al medio ambiente, así como la degradación térmica ocasionada por el uso del vapor de agua para obtener los aceites esenciales y otros extractos; gracias a esto, el rendimiento del extracto es mayor mientras se mantiene la composición de los compuestos volátiles, se eliminan solventes tóxicos, la biomasa residual se puede compostar o bien convertir en una fuente energética como combustible y aminorar costos operativos disminuyendo el consumo energético en el tiempo.

Para entender mejor este proceso Golmakani y Rezaei (2008), describen este proceso en la cual el AE que se encuentra generalmente en bolsas (glándulas secretoras) que contienen diferentes cantidades de agua, son irradiadas por ondas que interactúan selectivamente con agua y causan calentamiento localizado. El resultado es un aumento repentino no uniforme de la temperatura hasta el punto de ebullición e incluso por encima, produciéndose una expansión en volumen dentro del sistema provocando la ruptura de las paredes. El contenido orgánico fluye libremente

hacia el solvente circundante, este proceso mejora la calidad de los AE y reduce los costos de operación.

La hidrodestilación asistida por microondas utiliza 3 formas de transferencia de calor dentro de la muestra: la irradiación, conducción y convección. Como resultado, produce calor con mayor rapidez dentro y fuera de las glándulas. Con hidrodestilación esta transferencia de calor solo puede ocurrir por conducción y convección, lo que la hace menos efectiva.

En los recientes años, la hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) es usada para la extracción de varios productos naturales de plantas como el *Cymbopogon Citratus*, ya que reduce el consumo de solventes necesarios para la extracción con una mejor eficiencia comparada con las técnicas convencionales, es una técnica relativamente novedosa que ofrece beneficios como una reducción considerable del tiempo y del consumo de energía.

La Extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica relativamente novedosa que ofrece ventajas ambientales, como el uso de menores cantidades de solvente, consumo de energía reducido, uso de solventes menos tóxicos y menor cantidad de productos de desecho permitiendo extracciones más selectivas y rápidas con recuperación similar o mejor, comparada con procesos de extracción convencionales y por tanto, constituye una alternativa para mejorar la calidad de los productos de extracción y disminuir su impacto ambiental.

Tomillo (*Thymus Vulgaris*)

El **tomillo** (*Thymus vulgaris*) es una planta aromática nativa de la región del mediterráneo (España, Italia, Francia, Grecia, etc.) perteneciente al género *Thymus* y a la familia *Lamiaceae*, esta planta es utilizada ampliamente en la medicina popular debido a sus propiedades medicinales actuando como antiespasmódico, antribroncolítico, antihelmíntico y diurético (Borugă et al., 2014).

Es de clima templado y originario de los países de la cuenca mediterránea occidental. Crece sobre suelos secos y soleados y resiste bien las heladas y sequías. Presenta una gran diversificación en subespecies y la Península Ibérica es una de las zonas más ricas en cuanto al número. Se trata de una planta aromática (su nombre genérico proviene del griego *Thym*, en alusión a su intenso y agradable aroma) de 10-40 cm de altura y muy ramificada (López Luengo, 2006).

Aplicaciones: El tomillo se utiliza habitualmente como condimento de uso culinario y en la elaboración de encurtidos. Favorece la conservación de los alimentos que se aliñan con él gracias a las propiedades antimicrobianas y a las antioxidantes en las que intervendrían el timol, el carvacrol, los flavonoides y los polifenoles.

Figura1. Tomillo Fresco (semillas vivas, 2021).



Aceite esencial de tomillo

Thymus vulgaris, presenta como componente mayoritario el timol y en algunas variedades su composición puede alcanzar valores hasta del 80% (Wianowska et al., 2009). Se comprueba además la presencia de carvacrol, gamma-terpineno y p-cimeno (precursor del timol). Tanto los aceites esenciales obtenidos de las especies de *Thymus*, como el timol, han sido reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica, razón por la cual se emplean industrialmente en la preparación de desinfectantes de uso humano, enjuagues bucales y otros agentes antimicrobianos utilizados a nivel doméstico (Winward et al., 2008; Kleinet et al., 2013).

Figura2. Aceite esencial de tomillo (Science Photo Library Limited ,2021).



Composición química del AE de Tomillo (*Thymus Vulgaris*)

Tabla 1. Composición química del aceite (Borugă et al., 2014).

Componente	RT	%
Timol	16.17	47.59
D-Limoneno	8.04	0.29
α - Thujene	5.39	1.06
β - Myrceno	6.97	1.53
α -Felandreno	7.53	0.33
Carene	7.77	3.76
β -Felandreno	8.26	0.21
P-Cimeno	8.46	8.41
Y-Terpineno	8.96	30.90
Terpinen-4-ol	12.55	0.46
β - Pineno	6.89	0.37
α -Pineno	5.63	1.07
Terpineol	9.48	0.47
Cariofileno	17.32	2.68
Ciclohexeno,1-metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenyl)	19.03	0.78
Tiempo de retención (RT) y composición (%)		

Borugă y colaboradores (2014), mencionan que debido a las propiedades que se le otorgan al AE proveniente del tomillo, las investigaciones sobre la composición química y las propiedades biológicas han incrementado y se ha descubierto que el rendimiento como la composición química del aceite dependen de diversos factores tales como el medio ambiente, la etapa en el ciclo de vida, la región y la parte de la planta de la cual se obtiene el extracto.

Numerosos estudios demostraron que el aceite esencial de tomillo es uno de los más potentes en relación con propiedades antimicrobianas, razón por la cual se emplean industrialmente en la preparación de desinfectantes y como conservantes en la industria alimentaria. El timol y carvacrol fueron algunos de los componentes más activos contra múltiples patógenos transmitidos por alimentos (Manou et al., 1998).

A continuación, se presentan algunos estudios donde se evaluó las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de tomillo específicamente en alimentos:

- Morales Castro (2015), estudiante de ingeniería en industrias alimentarias de la Universidad Nacional de Colombia en el año 2015 evaluó el uso del Aceite Esencial (AE) del tomillo como un aditivo alimentario, con el objetivo de otorgar efecto antimicrobiano contra la actividad de *Listeria monocytogenes*, prolongando la vida de anaquel del queso *Ricotta*, donde se encontró que el componente activo mayoritario es el Timol con un 30.97% donde se observó halo de inhibición. El efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes* demuestra que el AE de tomillo en concentraciones de 1.6% tiene efecto biocida y podría ser utilizado en la industria de alimentos por su efectividad.

- Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de tomillo como conservante natural, con el propósito de reducir la carga microbiana durante el almacenamiento de la pechuga de pollo. Los microorganismos de ensayo fueron *Salmonella spp* y microorganismos proteolíticos; In vitro. El tratamiento más efectivo frente *Salmonella spp* fue obtenido con concentración total, los ensayos mostraron que el aceite esencial de tomillo en el almacenamiento de la pechuga de pollo a temperatura de refrigeración (4°C) hasta 48 horas, fue el tratamiento más efectivo para reducir la contaminación bacteriana y la pérdida de las características de calidad de la carne, logrando dar un producto de mejor calidad y libre de contaminación. Por lo que se recomienda el uso de los aceites esenciales en carne de pollo como una alternativa natural a los antibacterianos sintéticos para controlar la contaminación de la misma.

Propiedades antimicrobianas de aceite esencial de tomillo

Las propiedades antibacterianas y antifúngicas del AE de tomillo se encuentran normalmente asociadas con la presencia de timol y carvacrol (monoterpenos) (Hudaib et al., 2002). El timol es el componente mayoritario en el AE, incluso en algunas variedades puede llegar a presentarse en un 80% (Alzate et al., 2009).

Jiménez Tamayo (2020), explica específicamente las características de los dos componentes principales del AE de Tomillo:

Timol ha sido reconocido como un efectivo antimicrobiano, capaz de romper la membrana interna de las bacterias, debido a que se adhiere a la misma hidrofóbicamente por puentes de hidrógeno, lo cual desestabiliza la membrana y aumenta la permeabilidad, provocando la pérdida de iones de K y ATP intracelular y por ende se llega a la muerte celular. Por su parte, al timol se le ha atribuido la capacidad de inhibir tanto el crecimiento como la germinación de esporas y en bacterias restringe la multiplicación celular.

Por otro lado, el **carvacrol** es un isómero del timol, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, su mecanismo de acción es semejante al del timol. Este componente interactúa con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, lo que causa la desestabilización de la misma, aumentando su fluidez y la permeabilidad.

Aplicación de aceite esencial fase vapor

Fase de vapor

La generación de vapores de los aceites esenciales se basa en crear una atmósfera o un microambiente dado por los propios aceites. Hasta el momento, no se ha encontrado una metodología estándar para evaluar la inhibición antimicrobiana por medio del contacto de los vapores de los aceites esenciales (Reyes-Jurado et al., 2012). Existen varios métodos utilizados por diferentes autores, los dos principales son:

- 1) Método de superposición, que es solo una variación simple del ensayo de difusión de disco y puede relacionarse al contacto directo de las películas en las superficies de los alimentos y
- 2) Método de la fase de evaporación donde los AE y los microorganismos se colocan por separado en algún entorno sellado y pueden estar relacionados con la inhibición microbiana a distancia sin contacto directo de la película con la comida contaminada (Ávila-Sosa et al., 2012).

Sin embargo, algunos métodos reportados por Reyes-Jurado et al. (2012), dentro de los cuales destacan:

- Uso de placas invertidas, consiste en inocular los agares con el microorganismo de prueba, una vez que se inocula el microorganismo la placa se invierte y sobre la tapa de la placa se coloca papel filtro, sobre el papel filtro se depositan los aceites esenciales y se mantiene una temperatura controlada. Su principio se basa en la rápida volatilización de los vapores los cuales entran en contacto con el microorganismo.
- Creación de una atmósfera a partir de aceites esenciales, técnica que consiste en utilizar una cámara de plástico con tapa transparente y sellada herméticamente, en su interior y en el centro se

coloca cierta concentración del aceite esencial y sobre este una rejilla donde se colocan los agares inoculados, las cámaras se mantienen a temperatura controlada y cerradas herméticamente, de tal manera que los vapores generados por los aceites esenciales entran en contacto con los microorganismos, y consecuentemente su evaporación en el interior del microambiente puede generar zonas de inhibición. El contacto de vapor es una alternativa cuando los AE y los microorganismos se colocan por separado en un entorno sellado y, por lo tanto, la inhibición microbiana se logra desde la distancia sin contacto directo del agente antimicrobiano con los alimentos (Velázquez-Núñez et al., 2013). Algunos estudios han informado que el vapor generado por los aceites esenciales tiene un mayor efecto antimicrobiano en comparación con los aceites esenciales en forma líquida aplicados por contacto directo (Reyes-Jurado et al., 2019). Dado que el efecto antimicrobiano de cada aceite esencial es diferente, su actividad antimicrobiana puede ser evaluada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración mínima requerida del aceite esencial que tiene la capacidad de detener o eliminar el crecimiento del microorganismo. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de tres características principales: por su carácter hidrófilo o hidrófobo, por sus componentes químicos y por el tipo de microorganismo al que se está atacando (Reyes-Jurado et al., 2019).

Asimismo, ha tomado relevancia la utilización de los aceites esenciales en fase vapor ya que su aplicación disminuye las alteraciones sensoriales del producto, sin perder sus propiedades antimicrobianas.

Pan

El pan es un alimento básico que está estrechamente relacionado con la vida diaria de las personas. Se prepara horneando una masa que consta de harina, leudantes y agua. El pan es popular en todo el mundo y es uno de los alimentos más antiguos, generalmente conocido como una fuente importante de carbohidratos en la pirámide alimenticia para garantizar que una persona pueda obtener la nutrición suficiente que necesita el cuerpo (Ibrahim, Salleh et al., 2015).

El pan es un alimento que se obtiene cocinando al horno la masa formada al mezclar con agua la harina de ciertos cereales, sobre todo la de trigo, masa a la que por lo general, se agrega levadura con el fin que se realice la fermentación y se produzca un alimento ligero y esponjoso, fácil de consumir y digestivo; el proceso se denomina PANIFICACIÓN (Mora y Ruano, 2012).

Tipos de pan

- Pan común:

Se define como el de consumo habitual en el día, elaborado con harina de trigo, sal, levadura y agua, al que se le pueden añadir ciertos coadyuvantes tecnológicos y aditivos autorizados.

- Pan especial:

Es aquel que, por su composición, por incorporar algún aditivo o coadyuvante especial, por el tipo de harina, por otros ingredientes especiales (leche, huevos, grasas, cacao, etc.), por no llevar sal, por no haber sido fermentado o por cualquier otra circunstancia autorizada, no corresponde a la definición básica de pan común. El objetivo es bien aumentar el valor nutritivo del pan o bien proporcionarle un determinado sabor. Su empleo da siempre panes especiales. Entre los más comunes: azúcares, leche, materias grasas, huevos, frutas, etc. Como ejemplos de pan especial tenemos: Pan de huevo, pan de leche, pan de miel y pan

de pasas, etc., son panes especiales a los que se añade alguna de estas materias primas, recibiendo su nombre de la materia prima añadida (Mesas et al., 2002).

Focaccia

La *focaccia* es un producto de panadería típico de muchas regiones italianas y presenta variantes según la zona productiva. Hoy en día, la *focaccia* es muy apreciada por sus propiedades sensoriales. La *focaccia* está hecha de unos pocos ingredientes simples: harina, agua, sustancias grasas (aceite o manteca de cerdo), levadura y sal, pero se pueden obtener una miríada de diferencias matizadas, cubriéndola antes de cocinarla, con tomate fresco, cebollas, papas, aceitunas, queso, etc. o aromatizándolo con hierbas (romero, salvia, orégano, etc.). El aceite de oliva, especialmente el aceite de oliva virgen extra, es un ingrediente esencial en muchos tipos de *focaccia*. La *focaccia* generalmente aparece como un pan plano circular, de una sola capa, aceitoso y cubierto de varias formas. Los pasos productivos de los distintos tipos de focaccia son: mezclar, amasar, fermentar, aplanar, fermentar y hornear. En el pasado, solo se realizaba un proceso productivo prolongado a base de masa madre; sin embargo, hoy en día, la levadura de panadería en compresas frescas se utiliza en la mayoría de las panaderías para preparar *focaccia*.

Figura3. Focaccia horneada (Gavin, 2020).



Deterioro microbiano del pan

Desde el punto de vista tecnológico, es un alimento muy complejo, ya que la velocidad con la que se presentan cambios físico-químicos en su estructura es muy rápida. El principal problema del pan es la pérdida de humedad de la miga (endurecimiento), ablandamiento de la corteza y cambio en su sabor, dichos fenómenos son conocidos como “envejecimiento”, causado fundamentalmente por la retrogradación del almidón (Badui, 2006). Además, debido a sus características físico-químicas el pan es susceptible de ser deteriorado por hongos, levaduras y bacterias. Si bien, el horneado es una etapa en donde se eliminan tanto mohos como levaduras, una vez que el producto ha salido del horno, su manipulación debe de ser bajo condiciones estériles, ya que la contaminación por mohos se produce a través del aire (Cauvain et al., 2007).

El envejecimiento del producto se suele manifestar por una serie de modificaciones fisicoquímicas (A_w , % HR, pH, acidez, etc.), que pueden ser debidas a reacciones entre algunos componentes químicos ocasionados por agentes de diversa naturaleza: la luz, enzimas, materiales de contacto, temperatura, etc. También puede ocurrir por algunas transformaciones debidas a la actividad metabólica de reacción que conlleva a la degradación de los alimentos. En general, el pan es un producto que se deteriora rápidamente ya que presenta cambios organolépticos, pérdida de humedad de la miga y endurecimiento. Adicionalmente, los microorganismos pueden crecer en el pan, presentando otro factor de deterioro decisivo en la vida útil de este alimento.

Deterioro causado por mohos

El deterioro que causan los mohos se conoce como "enmohecimiento", y se manifiesta con la aparición de manchas contrastantes en la superficie del pan. Los mohos que suelen encontrarse en el pan son por lo general varias especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* (Sahan, 2011) *Cladosporium*, *Fusarium* (Tarar et al., 2010), *Mucor* y *Eurotium*; de ellos, los géneros más comunes presentes en el enmohecimiento son ***Penicillium* y *Aspergillus*** (Moore et al., 2008).

El crecimiento de *Penicillium* es predominante, debido a su abundante producción de esporas y a su elevada presencia en el ambiente; la temperatura adecuada para su proliferación es a temperaturas bajas de 7 a 10 °C, mientras que la de ***Aspergillus* y *Eurotium*** es a temperaturas de 22 a 24 °C, de esta forma, la prevalencia de *Penicillium* se reduce, aumentando así la persistencia de los otros dos géneros mencionados (Gorcmen y Sahin, 1997).

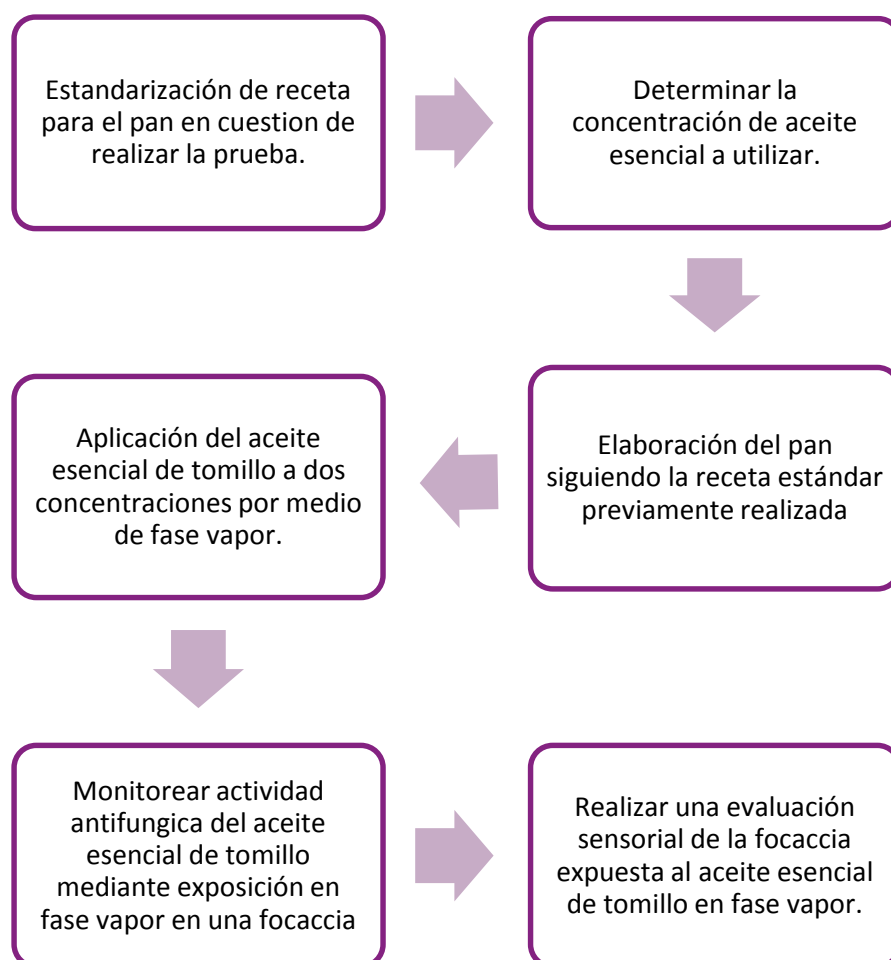
Dentro del género *Penicillium* se han encontrado otras especies, siendo *P. roqueforti* la especie más importante dentro de este género, caracterizada por producir esporas de coloración verdosa (Jay, 2000); además, es más resistente que otras especies.

Plan de Investigación

Basándose en los objetivos planteados anteriormente se presenta la siguiente planeación del proyecto:

Se hará una evaluación del aceite de tomillo utilizado como conservador mediante la inoculación en un pan artesanal (*focaccia*) a dos concentraciones, se utilizarán recipientes herméticos con una capacidad de 600 ml y una malla para evitar contacto directo con el producto a temperatura ambiente (20-22 °C), y se registrarán los datos en base a las características organolépticas resultantes y así verificar el grado de efectividad del aceite esencial.

Diagrama de flujo



Materiales y métodos

Materia Prima

Para la elaboración del pan se utilizó Harina de trigo fuerte, sal, agua, azúcar, levadura, aceite de oliva y ajo

Métodos

Para elaboración del pan la receta se estandarizó de la siguiente manera:

Porciones: 6 Tiempo de preparación:

Grado de dificultad: Fácil **Línea:** Entrada

Ingredientes:

Harina fuerte	320	g
Sal	4	g
Agua tibia	184	g
Aceite de ajo	32	mL
Azúcar	8	g
Levadura	12	g

Mise en place:

1. Pesar todos los ingredientes

Procedimiento:

1. Agregar en un bowl la levadura y el agua, mezclar hasta disolver la levadura.
2. Agregar el resto de los ingredientes en el bowl.
3. Comenzar con el proceso del amasado, con dos dedos se comienza a amasar desde el centro incorporando todos los ingredientes, hasta lograr que la masa se despegue de las paredes del bowl.
4. Una vez lista la masa, tapar con plástico el bowl y fermentar por 30 minutos hasta doblar su tamaño.
5. Colocar un poco de aceite de ajo en la base de un escoffier o charola y estirar cuidadosamente la masa en el recipiente evitando romper las burbujas logradas por la fermentación.
6. Agregar por encima de la masa un poco de aceite de ajo y dejar fermentar por 30 minutos más hasta doblar su tamaño
7. Hornear a 180 °C por 25 minutos
8. Enfriar

Diagrama de flujo

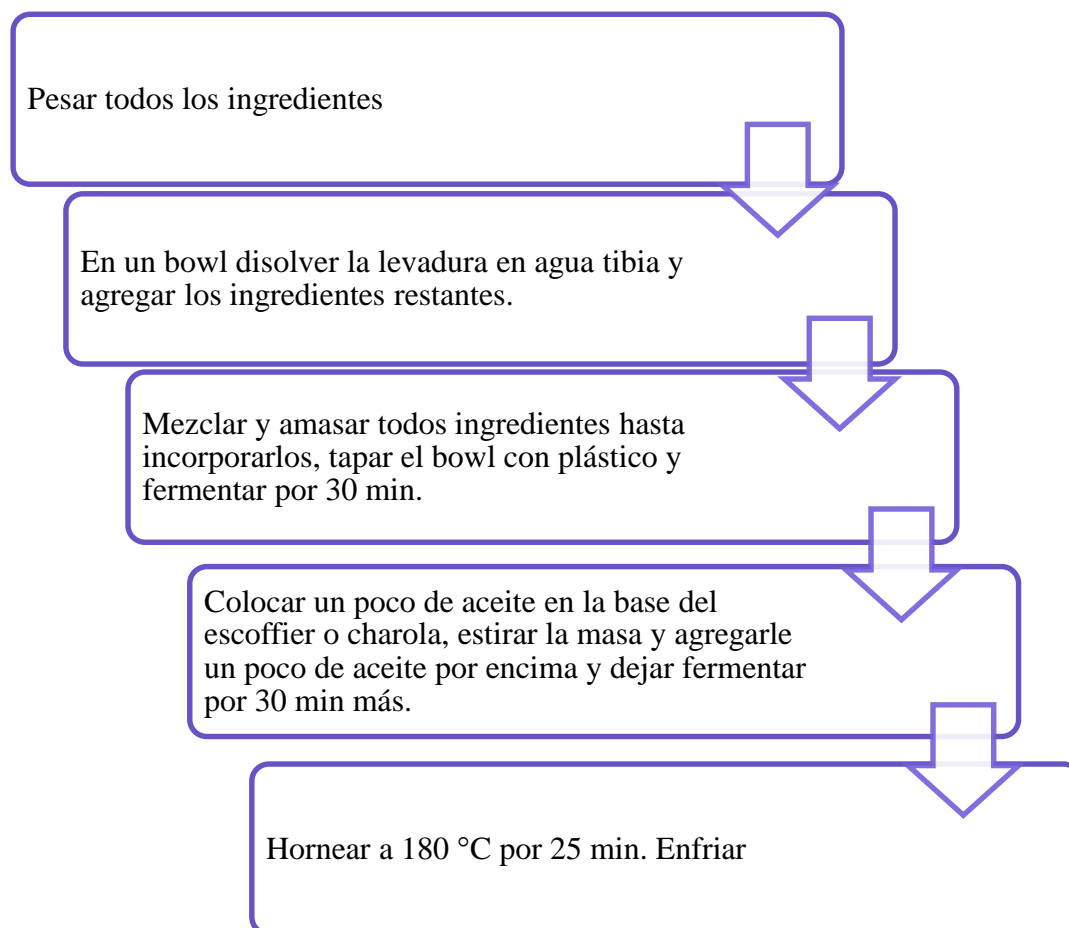


Figura 4 y 5. Preparación de la masa para focaccia y horneado. (Elaboración propia, 2021)



Aplicación

En el primer recipiente se colocó en la base una gota de aceite esencial de tomillo con una concentración de 0.3g después se colocó una rejilla de plástico y se procedió a colocar un trozo de 3x3x2 cm de *focaccia*. Para el segundo recipiente se repitió el proceso con la diferencia de colocar dos gotas de aceite esencial que equivale a 0.6 g. En ambos casos, se cerraron herméticamente los recipientes para iniciar con el proceso en fase vapor y por último, en el tercer recipiente se colocó únicamente el pan sin adicionar aceite esencial.

Finalmente se tuvieron en observación los tres recipientes de forma diaria durante los siguientes 10 días, registrando eventuales cambios físicos que indicaran un crecimiento microbiano.

Figura 6, 7 y 8. Focaccia en sus 3 concentraciones de aceite esencial de tomillo (elaboración propia, 2021).



Evaluación sensorial

Posterior a los 10 días de observación, se realizó nuevamente una focaccia con las mismas cantidades de ingredientes y mismo proceso de elaboración que la anterior; así como también se repite el proceso de inoculación con una y dos gotas de aceite a dos muestras de este pan colocados en recipientes independientes y cerrados herméticamente. A diferencia de la prueba inicial, en esta ocasión únicamente se dejaron ambas muestras expuestas a los vapores del aceite esencial de tomillo, por un tiempo de 24 horas, con la finalidad de impregnar el pan y así poder determinar la aceptación del producto en cuanto sabor y olor.

Resultados

El pan se mantuvo en recipientes herméticamente cerrados para contener los vapores emitidos por el aceite a una temperatura ambiente de 18° a 22°C.

Se monitoreo por 10 días para evaluar crecimiento de hongo, teniendo resultados como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 2. Registro del crecimiento de hongo en pan tipo *focaccia* agregado con aceite esencial de tomillo en fase vapor durante 9 días (elaboración propia,2021).

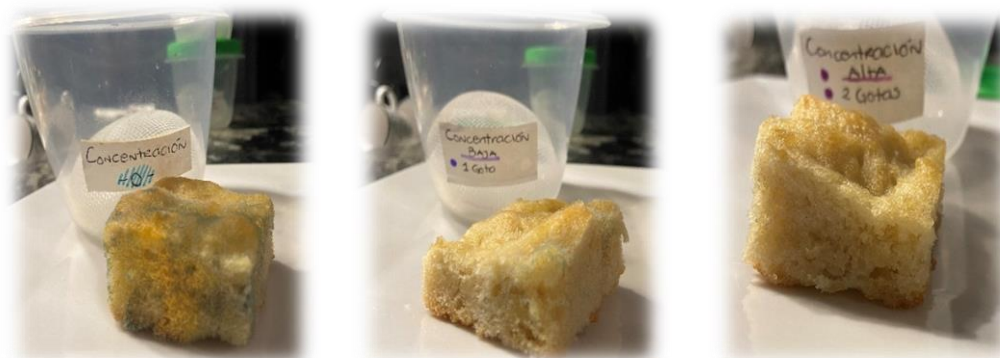
	Control	Concentración 0.3 g	Concentración 0.6 g
Día 1	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Día 2	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Día 3	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Día 4	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios
Día 5	Crecimiento	Sin cambios	Sin cambios
Día 6		Sin cambios	Sin cambios
Día 7		Crecimiento	Sin cambios
Día 8			Sin cambios
Día 9			Crecimiento

Con base a lo observado en la tabla 2, se demostró que a partir del día 5 comenzó crecimiento fúngico en la muestra de pan sin exposición de vapores del aceite esencial.

El día 7 a partir de la exposición de vapores de aceite esencial de tomillo comenzó crecimiento fúngico en la muestra de pan con concentración de 0.3 g

Para el día 9 se obtuvo crecimiento en la muestra con concentración de 0.6 g, esto se debió a mayor cantidad de aceite esencial de tomillo, teniendo como resultado 4 días más en comparación de la prueba sin exposición de vapores y 2 días más en comparación con la muestra de concentración de 0.3 g.

Figura 9,10 y 11. Crecimiento fúngico en pan focaccia en sus 3 concentraciones (elaboración propia, 2021).



Resultados sensoriales

En la evaluación sensorial se pidió el apoyo de 6 jueces no entrenados quienes probaron el pan en sus dos concentraciones después de las 24 horas y estos fueron los comentarios vertidos por los jueces.

Tabla 3. Registro de evaluación sensorial en pan tipo *focaccia* agregado con aceite esencial de tomillo durante 24 horas en fase vapor (elaboración propia, 2021).

Juez 1	En cuanto al sabor me pareció rico, es notable el sabor del tomillo al igual que en el aroma, es un pan que va muy bien con el tipo de aceite esencial que se empleó, la textura es buena en las dos concentraciones.
Juez 2	En la concentración alta, me pareció fuerte en sabor y aroma, es aceptable pero me agradó más en la concentración baja y la textura es buena en las dos concentraciones.
Juez 3	El pan me pareció muy rico, es un pan perfecto para poder ser saborizado con aceite esencial de tomillo, su aroma es un poco fuerte en la concentración alta.
Juez 4	A mi parecer tiene la cantidad adecuada de aceite esencial de tomillo, se siente el sabor y su aroma sin ser muy invasivo en boca, la textura es buena en sus dos concentraciones.
Juez 5	Mi experiencia probando el pan fue buena, es un sabor que se puede encontrar en una focaccia elaborada inicialmente con tomillo como especia aunque en aroma fue más notorio, la textura es buena.
Juez 6	La focaccia me gusto más en la concentración baja, ya que se siente a la perfección el sabor del tomillo así como su aroma y creo que es suficiente, la textura del pan es buena e igual en sus dos concentraciones.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas fueron satisfactorios. Se pudo comprobar que los componentes presentes en el aceite esencial de tomillo cumplieron la función anti fúngica. Las 2 concentraciones tuvieron diferentes resultados y esto se debe a la cantidad de aceite esencial agregada en fase vapor. Como resultado se obtuvo que a mayor concentración mayor tiempo de vida para el producto.

Es importante decir que el aceite esencial no inhibe la aparición de hongos sólo retrasa el proceso de descomposición, siendo esta la finalidad del estudio del aceite esencial de tomillo utilizado como conservador.

En el aspecto sensorial, se pudo apreciar el aroma y el sabor del tomillo, pero al ser un pan comúnmente especiado no afecta en su ingesta. Se hizo una prueba únicamente por 24 horas para así poder tener resultados sensoriales que después fueron degustados y teniendo como conclusión una buena aprobación y aceptación.

Como se observa en la tabla 2, los resultados sensoriales fueron positivos ya que los jueces consideraron que el aceite esencial de tomillo en fase vapor mejoró y resalto a las cualidades sensoriales son obstante un juez detecto que la concentración alta de 0.6 g era un poco intensa en el caso del pan sin embargo en todos los casos la concentración baja equivalente a 0.3 g resulto en propiedades aceptables.

El uso de aceite esencial de tomillo podría ayudar como una alternativa de conservador permitiendo disminuir e incluso eliminar el uso de aditivos de origen sintético en determinados productos que no interfieran en las características organolépticas.

Referencias

Álvarez, M. R., Meléndez, L. A., & Cosío, S. M. R. (2017). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas.

Antonio, D. C. (2020). Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Tomillo en Fase Vapor sobre el Crecimiento de mohos de los géneros *Alternaria*, *Penicillium* y *Geotrichum*.

Bastidas Clemente, Y., & Llacua Chávez, L. F. (2016). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las flores de la especie vegetal mastuerzo (*tropaeolum majus* L.) frente al crecimiento del microorganismo *penicillium* sp.

Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, 7(SpecIss 3), 56.

Tabla 1. Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014).

Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, 7(Spec Iss 3), 56.

Cauvain, S. (2015). Bread: the product. In *Technology of breadmaking* (pp. 1-22). Springer, Cham.

Gavin, (2020) focaccia

<https://www.jessicagavin.com/rosemary-focaccia-bread/>

Gonzalez Ramirez, A. T. (2019). Elaboración de pan especial con adición de pasta de cacao, con característica de un alimento funcional-Pucallpa.

Golmakani MT, Rezei K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.* 2008;109(84):925-30.

Guizado Urrutia, E., & Limachi Viamonte, C. (2020). Estudio de la cinética de extracción de aceite esencial de Pacha salvia (*Lepechinia meyenii*) por hidrodestilación asistida por microondas.

Ibrahim, U.K., Salleh, R., & Maqsood-Ul-Haque, S.N. (2015). Bread towards Functional Food: An Overview.

Ibrahim, U. K., Salleh, R. M., & Maqsood-ul-Haque, S. N. S. (2015). Bread towards functional food: an overview. *International Journal of Food Engineering*, 1(1), 39-43.

Jiménez Tamayo, J. M. (2020). Evaluación de la actividad antifúngica in vivo del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en diferentes concentraciones contra *Colletotrichum acutatum* en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) (Bachelor's thesis).

Moore, M. M., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2008). Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, 226(6), 1309-1316.

Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod.*, 59(1), 77-79.

Meghal, A., Desai.,y JigishaP. 2012. Separation science and Technology. *Food Chem.*47: 1963-1970.

Moore, M. M., Dal Bello, F., & Arendt, E. K. (2008). Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *European Food Research and Technology*, 226(6), 1309-1316.||

Morales Castro, A. F. (2015). Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta. Departamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos.

Ortega Lozano, A. B. (2018). Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC: 12600 (Bachelor's thesis).

Ordoñez Ávila, A. (2020). Evaluación del efecto inhibitorio de mezclas binarias de aceites esenciales en fase de vapor contra *Salmonella* Serovar Montevideo en condiciones in vitro (Bachelor's thesis).

Pallas, Á. D. J. G., Cruz, I. J. L., Antonio, W. C., & Toto, J. G. MONTAJE DEL EQUIPO HIDRODESTILACIÓN ASISTIDO POR MICROONDAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DEL *CYMBOPOGON CITRATUS*.

Pasqualone, A., Delcuratolo, D., & Gomes, T. (2011). Focaccia Italian flat fatty bread. In *Flour and breads and their fortification in health and disease prevention* (pp. 47-58). Academic Press.

Quiles Beses, J. M. (2019). Reducción de la contaminación por hongos toxigénicos y micotoxinas en alimentos mediante el uso de isotiocianatos.

Reina, F. D., Roche, L. A., Bianchi, M. A., Languasco, J. M., & Della Rocca, P. (2016). Análisis químico de las especias: tomillo y salvia.

Rincón Mejía, C. A., Castaño Osorio, J. C., & Ríos Vázquez, E. (2012). Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(2), 160-171.

Solís Campoverde, P. N. (2012). 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. (Bachelor's thesis).

Science Photo Library Limited, (2021)

<https://www.sciencephoto.com/media/836227/view/essential-oil-of-thyme-thymus-vulgaris->

Semillas vivas, (2021) Tomillo

<https://www.semillasvivas.bio/es/semillas-aromaticas-perennes/8159-semillas-de-tomillo.html>

Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.