

# Conservación de Pan Artesanal Ezequiel y Pan Superbueno Usando Aceite Esencial de Clavo de Olor (*Eugenia caryophyllus*)

Pilco Quesada, Silvia<sup>1</sup>; Quito Vidal, Moisés<sup>2</sup>; Quispe Condori, Sócrates<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos (CITAL), <sup>2</sup>Centro de Investigación en Ciencias de Alimentos (CICAL), <sup>3</sup>Centro de Investigación en Ingeniería de Alimentos (CIIAL), EAP Ingeniería de Alimentos, Universidad Peruana Unión. socrates@upeu.edu.pe

## Resumen

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar la vida en anaquel del pan artesanal Ezequiel (CITAL) y pan de molde comercial Superbueno (Productos Unión), usando aceite esencial del clavo de olor (*Eugenia Caryophyllus*) como antimoho. El aceite esencial fue obtenido por el método de hidrodestilación, con un rendimiento de 15 % (m/m). Del análisis microbiológico del pan Superbueno (pan comercial) se identificaron una cepa de levadura y dos mohos que corresponden al género *Penicillium*. Del pan Ezequiel se identificaron tres cepas aisladas de mohos, la cepa blanca corresponde al género *Penicillium*, y dos cepas de género no identificado. La aplicación del aceite esencial a las seis cepas aisladas fueron a tres concentraciones (10  $\mu$ l, 12.5  $\mu$ l y 15  $\mu$ l). Los resultados mostraron la ausencia de mohos hasta un período de incubación de 57 días. Finalmente, se comparó la efectividad del aceite esencial de clavo de olor con un antimoho comercial (Pangermex, aceite esencial de cítricos), aplicándose en forma de spray al pan Ezequiel. El aceite esencial de clavo de olor presenta la misma capacidad inhibitoria que el antimoho comercial por un período de 10 días.

**Palabras clave:** clavo de olor, aceite esencial, panes, vida en anaquel, capacidad antimicrobiana.

## Abstract

The objective was to evaluate the shelf life of handmade Ezekiel bread (CITAL) and commercial loaf bread Superbueno (Productos Union) using essential clove oil (*Eugenia Caryophyllus*) as an anti-mold. The essential oil was obtained by the hydrodistillation method, with a yield of 15% (m/m). From the microbiological analysis of Superbueno bread (commercial) one strain of yeast and two molds were identified, which correspond to the genus *Penicillium*. From the Ezekiel bread three isolated strains of mold were identified, the white strain corresponds to the genus *Penicillium*, and two strains of unidentified genus. The application of essential oil to the six isolated strains was applied at three concentrations (10  $\mu$ l, 12.5  $\mu$ l y 15  $\mu$ l). The results showed the absence of molds up to an incubation period of 57 days. Finally, a comparison was done of the effectiveness of essential clove oil as a commercial anti-mold (Pangermex, essential citrus oil), applying it in spray form to the Ezekiel bread. The essential clove oil presents the same inhibitory capacity as the commercial anti-mold for a period of 10 days.

**Key words:** clove, essential oil, bread, shelf life, antimicrobial capacity.

## Introducción

Los productos industrializados de la panificación son perecibles por naturaleza y requieren protección de los contaminantes durante su preparación, almacenamiento y distribución. Conservar el pan

luego del horneado es una preocupación constante del panadero, porque éste se convierte en un cultivo óptimo de los hongos, por ser aerobios y necesitar de oxígeno para desarrollarse y reproducirse en la corteza del pan. Entre los mohos más frecuentes del pan de molde podemos citar al *Rhizopus nigricans*,

*Mucor mucedo*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* y *Neurospora sitophila* (Tejero 2003).

Con el propósito de evitar esta contaminación y prolongar la vida útil del producto, diversos aditivos pueden ser adicionados, sin embargo, existen cuestionamientos en relación a su uso (Burt 2004). Por ejemplo, uno de los conservantes más usados en la industria panificadora es el propionato de calcio, que en grandes cantidades puede presentar problemas en el pan, porque además de inhibir el crecimiento de los hongos, disminuye la actividad de las levaduras, retardando la generación de CO<sub>2</sub>, alcohol y esencias aromáticas (DaSilva 2007). Adicionalmente, el propionato ha recibido severas críticas en relación a su capacidad de producir efectos toxicológicos en el ser humano.

Por consiguiente, es necesario el reemplazo de los conservantes sintéticos por sustancias naturales, tales como los aceites esenciales (Oussalah y otros 2005). Los aceites esenciales pueden ser extraídos desde diversas plantas, usando cualquiera de los siguientes métodos: prensado, enfleurage, hidrodestilación, extracción por solventes orgánicos y extracción con fluidos supercríticos (Martínez 2001).

Decker y otros (2005) presentaron una revisión sobre el uso potencial de agentes antimicrobianos naturales como “preservantes secundarios”, donde muestran que los aceites esenciales extraídos de las plantas son ideales para la conservación de los alimentos, ya que reportaron un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra una gran cantidad de contaminantes y de bacterias patógenas.

Dentro de las diferentes plantas con propiedades antimicrobianas encontramos al clavo de olor. Los brotes de clavo de olor son obtenidos a partir de la flor de *Eugenia caryophyllus*. Esta especie es nativa de Amboyna y de la Isla de Moluccan – Indonesia (Bravo 2003). Existen tres tipos de aceites esenciales de clavo de olor, el primero es extraído del brote y es el más comercial de todos, el segundo viene de las hojas y por último del tallo.

El contenido de aceite volátil de los brotes es de 15 a 20 %, y está compuesto principalmente por eugenol (85 – 95 %).

Entre sus propiedades funcionales podemos mencionar su capacidad de ser carminativa y estimulante,

alivia los vómitos, las flatulencias y las náuseas. En general, son usados para estimular el aparato digestivo. Es un analgésico muy suave que se emplea para mitigar el dolor de muelas. La capacidad antimicrobiana del aceite esencial de clavo de olor (eugenol) fue evaluada en *Aeromonas hydrophilla* aisladas de pollo cocido (Hao y otros 1998).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad antimicrobiana del aceite esencial del clavo de olor en cepas aisladas del pan artesanal Ezequiel y pan industrial Superbueno.

## Materiales y Métodos

### Materia prima

Brotes de Clavo de olor (*Eugenia caryophyllus*) comprados en el mercado Central de Lima, los cuales fueron cultivados en Brasil. Para las extracciones, el material fue molido y tamizado. La humedad se determinó usando el equipo Aqualab (Decagon Devices, modelo 3TE, Canadá).

### Extracción por hidrodestilación

La extracción del aceite esencial fue realizada usando el aparato Schilcher acoplado con manta de calentamiento (TECNAL, modelo TE – 2761315, Brasil). Sesenta gramos de clavo de olor molido fueron depositados en el balón, junto con 750 ml de agua destilada y 25 perlas de vidrio. En la temperatura de ebullición, el vapor de agua + aceite esencial salen del balón, para luego condensar. La mezcla cae en el tubo colector, llenando lentamente el tubo. Cuando la mezcla alcanza el nivel máximo del tubo colector, el agua retorna dentro del balón. El aceite esencial de *Eugenia Caryophyllus* posee mayor densidad que el agua y éste desciende hasta la parte inferior del tubo colector (Bravo 2003). La separación del aceite esencial fue completada a través de la congelación. Las extracciones fueron realizadas por triplicado. El rendimiento global del aceite esencial fue calculado gravimétricamente.

### Preparación del agar

Fue preparado el Agar Papa Oxitetraciclina (APOX - 96 % de solución de papa blanca, 2 % Glucosa y 2 % Agar) y depositadas en placas petri (placas APOX).

### Aislamiento de cepas

Los cultivos fueron preparados usando 10 g de cada muestra de pan contaminado del tipo Superbueno

y Ezequiel junto con 90 ml de solución salina peptonada (SSP). Fueron realizados dos diluciones. Cada solución (0.1 ml) fue inoculada en las placas de APOX. Las muestras fueron incubadas por 14 días a temperatura ambiente. Las cepas más representativas fueron aisladas y fue realizado el Test de Cámara Húmeda, a fin de identificar las cepas. Cada cepa aislada fue propagada en tubos inclinados con APOX e incubadas por 10 días a temperatura ambiente.

### Test in vitro

Para la evaluación de la capacidad antimicrobiana se usaron panes recién procesados (sin spray antimoho), proporcionados por Productos Unión (pan Superbueno) y pan Ezequiel (Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos - CITAL). Para la inoculación de las cepas aisladas se pesó 10 g de pan previamente esterilizado a una temperatura de 121 °C por 15 minutos a una presión de 20 psia. Los cuales fueron incubados por 14 días a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras incubadas fueron licuadas con 90 ml de SSP. Se tomó de esta solución 0.1 ml y fue depositada en una placa petri con APOX, sucesivamente se inoculó el aceite esencial del clavo de olor a tres diferentes concentraciones (10  $\mu$ l, 12.5  $\mu$ l y 15  $\mu$ l) y con tres repeticiones cada una de ellas. Las muestras fueron observadas por un período de 57 días a 21 °C y en oscuridad.

### Comparación de efectividad del aceite esencial del clavo de olor con el antimoho de aceite esencial de cítricos llamado comercialmente Pangermex

Fue preparado el spray antimoho del aceite esencial de cítricos utilizando 83 % de alcohol, 15 % de agua, 1.7 % de esencia de vainilla, 0.3 % Pangermex. El spray del aceite esencial del clavo de olor fue preparado de manera similar a las concentraciones de 0.01 %, 0.0125 % y 0.015 %.

Las cuatro soluciones fueron aplicadas a las muestras en estudio. Las aplicaciones fueron realizadas por triplicado en fin de verificar la eficacia.

### Resultados y Discusión

El rendimiento del aceite esencial del clavo de olor fue 15 %  $\pm$  0.5 %.

### Aislamiento de cepas

En la figura 1 se muestran las cepas aisladas de las muestras de los dos tipos de panes. En el pan Ezequiel (grupo A) fueron identificadas colonias blancas (perteneciente al género *Penicillium*), verdes y melones (mohos no identificados). En el pan Superbueno (grupo B) se encontraron tres tipos de colonias: negras, verdes/blancas (ambas pertenecientes al género *Penicillium*) y blancas (levadura).

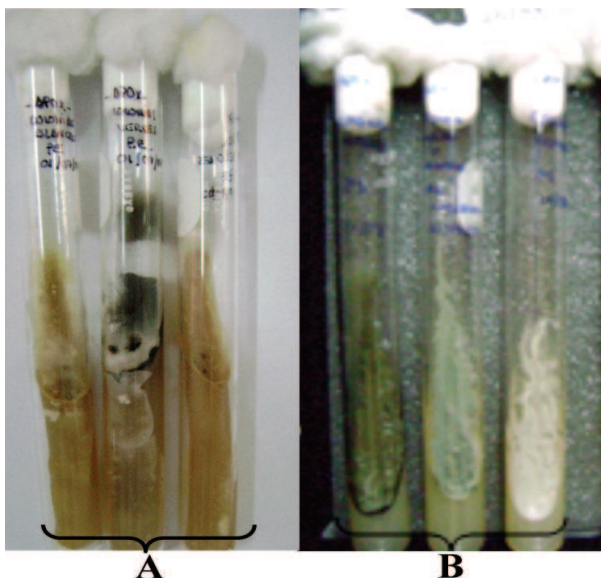


Figura 1 - Cepas aisladas a partir de pan Ezequiel y pan Superbueno

En la figura 2 se presentan los análisis de cámara húmeda de las cepas aisladas del pan Ezequiel (co-

lonias blancas, verdes y melones) y Superbueno (colonias verdes, negras y verdes/blancas).

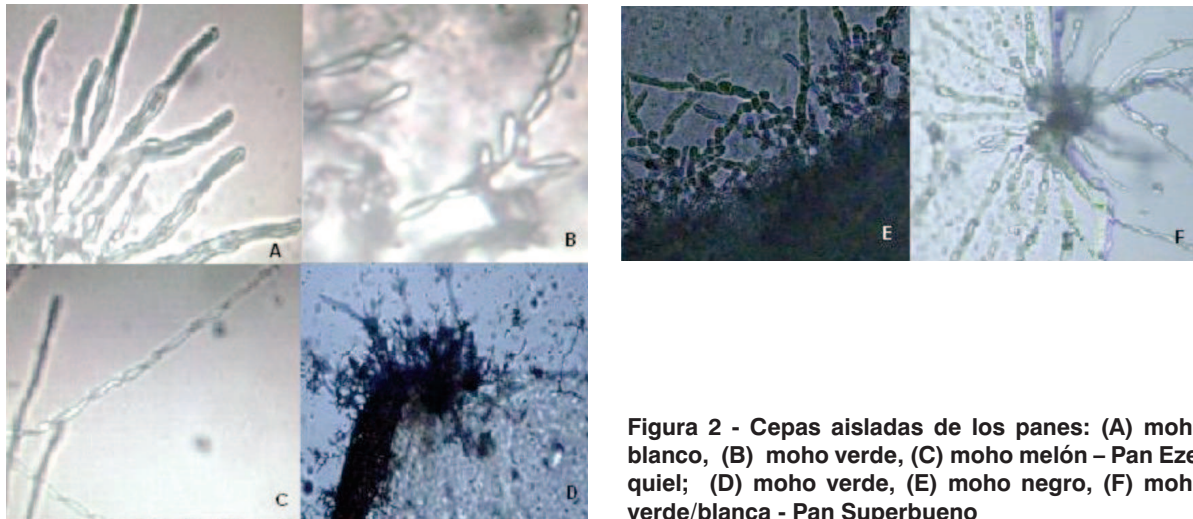


Figura 2 - Cepas aisladas de los panes: (A) moho blanco, (B) moho verde, (C) moho melón - Pan Ezequiel; (D) moho verde, (E) moho negro, (F) moho verde/blanca - Pan Superbueno

Según los estudios efectuados por Nielsen (2000), los mohos presentes en los panes pueden ser *Aspergillus flavus*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium commune*, *P. corylophilum*, *P. roqueforti* y *P. solitum*.

#### Actividad antimicrobiana

En la figura 3 se observa los resultados de la efectividad del aceite esencial en cepas aisladas del pan Ezequiel y pan Superbueno a una concentración de 10  $\mu$ l de aceite esencial de clavo de olor.

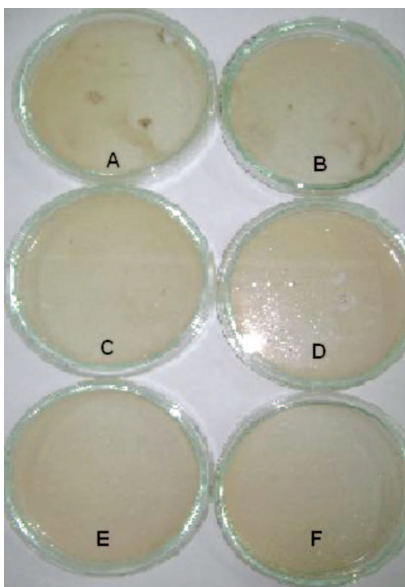


Figura 3 - Evaluación de la capacidad antimicrobiana de aceite esencial de clavo de olor a una concentración de 10  $\mu$ l en donde: (A) colonias negras, (B) colonias verdes, (C) colonias verdes/ blancas, (D) colonias verdes, (E) colonias melones, (F) colonias blancas

Se observa que para un período de incubación de 57 días no existe el crecimiento de cepas. Similares resultados fueron obtenidos a las concentraciones de 12.5  $\mu$ l y 15  $\mu$ l.

En la figura 4 se observa los panes conservados con el Pangermex a 300  $\mu$ l.

Para los 57 días de conservación no se observa ningún crecimiento de cepas similares. Los resul-

tados fueron obtenidos para el aceite esencial del clavo de olor.

Nielsen (2000) reporta porcentajes de inhibición que varían de 25 % hasta un 85 % dependiendo del género de *Penicillium*. Los autores usaron 1  $\mu$ l de aceite esencial de clavo de olor por 7 días de incubación.

Los resultados obtenidos son muy similares a los obtenidos por Nielsen (2000).



Figura 4 - Aplicación del antimoho Pangermex (300  $\mu$ l) en cepas aisladas de Ezequiel

## Conclusiones

El rendimiento del aceite esencial obtenido por el método de hidrodestilación fue 15 %  $\pm$  0.5 %.

De las tres cepas encontradas en el pan Superbueno, una de ellas es una levadura y las tres restantes pertenecen al género *Penicillium*. De igual manera las tres cepas del pan Ezequiel pertenecen al género *Penicillium*.

En los resultados observamos la total inhibición de las cepas de género *penicillium*, además de las dos cepas no identificadas presentes en el pan Ezequiel, afirmando los resultados de investigaciones anteriores acerca del efecto inhibitorio del aceite de clavo de olor.

Los resultados del análisis microbiológico IN VITRO indican que el aceite esencial de clavo de olor garantiza la conservación del pan Ezequiel.

## Agradecimiento

Agradecemos al Vicerrectorado Académico de la Universidad Peruana Unión por el soporte financiero. Además, queremos agradecer al Centro de Aplicación Productos Unión por las muestras de Pan Superbueno, y al técnico José Manrique del Laboratorio de Panificación de la EAP de Ingeniería de Alimentos por la elaboración del pan artesanal Ezequiel.

## Referencias

- Bravo D, Ayuso MJ, Fernández MA, García MD, Herrera MD, Marhuendo E, Martín C, Puerta R, Sáenz M, Toro M. 2003. Farmacognosia. Serie Farmacia Actual. España.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology. v.94, p.223-253.
- DaSilva. 2007. importante. Cápsulas Preservantes. <http://www.magazinedelpan.com/detalle.asp?Seccion=El+Pan+tiene+su+ciencia&id=195> (17/06/07)

- Decker E A, Warner K, Richards y Shahidi F. 2005. Measuring Antioxidante Effectiveness in Food. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4303-4310.
- Hao YY, Brackett RE, Doyle MP. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *Journal of Food Protection*. 61(3) p. 307-312.
- Holley R, Patel D. 2004. Improvement in shelf -life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Journal Food Microbiology* (22): 273 - 292.
- Martínez A. 2001. Aceites Esenciales. España.
- Nielsen V, Rios R. 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Journal of Food Microbiology*, v.60, p.219-229.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. Coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus Aureus* y *Listeria Monocytogenes*. *Food Control*. v.18, n.5, 2007, p.414-420.
- Reineccius G. 1999. *Source Book of Flavors*. 2da edición.
- Tejero F. 2003. Conservación del pan y la bollería. [www.franciscotejero.com](http://www.franciscotejero.com). (13/06/07)
-