



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**

**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA**

**ESCUELA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS**

**“EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES  
COMO INHIBIDORES DE LISTERIA MONOCYTOGENES  
EN PRODUCTOS CÁRNICOS”**

**TRABAJO DE GRADUACION PREVIO PARA LA OBTENCION DEL  
TITULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS.**

**AUTOR**

Fernando Esteban Correa Padrón.

**DIRECTORA**

Dra. María Elena Cazar.

**CUENCA - ECUADOR**

**2010**

## **DEDICATORIA**

A mi hija, Zara, el regalo más grande que Dios me ha dado y la verdadera razón de mi vida. A mis padres, que con su ayuda incondicional y esfuerzos desinteresados me han guiado hasta esta etapa del camino. A mi compañera de vida, mí querida esposa.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco de sobremanera a la doctora María Elena Cazar, quien con su gran sabiduría y ayuda desinteresada ha sabido brindarme sus conocimientos con el afán de apoyarme para culminar con esta etapa de mi carrera. A todo ese valioso personal de laboratorio, quienes con gran dedicación y solidaridad han sabido ofrecerme su tiempo y conocimientos durante este proyecto de graduación.

## RESUMEN

El presente trabajo se orienta a la búsqueda de aceites esenciales y extractos vegetales inhibidores de *Listeria monocytogenes*. Este patógeno fue aislado a partir de muestras de productos cárnicos. La actividad antilisterial de cuatro aceites esenciales y cuatro extractos vegetales, puros y en mezclas, fue evaluada mediante ensayos “in Vitro. Los productos naturales más efectivos en las pruebas “in Vitro” fueron evaluados como aditivos de hamburguesas de pollo, salchicha de freír y jamón de pierna. El aceite esencial de Orégano (*O. vulgare*). presentó la mayor actividad antilisterial. Su efecto es potenciado en la formulación de mezclas. El producto de mejor aceptación por el panel de catadores fue jamón de pierna, preservado con una mezcla de aceites Orégano 50% Laurel 50%

## **ABSTRACT**

The present work is focused towards the screening of essential oils and plant extracts as inhibitors of *Listeria monocytogenes*. This microorganism was isolated from meat products. The antimicrobial activity of four essential oils and four plant extracts; pure and mixture was evaluated by means of “in Vitro” assays. The effective natural products were assayed as preservers of chicken hamburgers, sausages and ham. *Oreganum vulgare* essential oil presented the highest antibacterial activity. Its effect is raised in mixtures formulation. The best accepted product was ham, preserved with a mixture of oregano and laurel essential oils.

## Índice de Contenidos

|   |       |
|---|-------|
| Dedicatoria.....  | ii    |
| Agradecimiento.....   | iii   |
| Resumen.....  | iv    |
| Abstract.....   | v     |
| Índice de Contenidos.....   | vi    |
| Índice de Ilustraciones y cuadros.....  | xi    |
| <br>INTRODUCCIÓN.....   | <br>1 |
| <br><b>CAPÍTULO1: <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i></b> .....   | <br>3 |
| <br>Introducción.....   | <br>3 |
| <br>1.1 Características microbiológicas de <i>Listeria monocytogenes</i> .....  | <br>3 |
| 1.2 Efectos de <i>Listeria monocytogenes</i> en contaminación de alimentos.....   | 5     |
| 1.2.1 Alimentos susceptibles de contaminación con <i>L. monocytogenes</i> .....   | 7     |
| 1.3 Estrategias de control de <i>L. monocytogenes</i> : Efecto de productos químicos<br>inhibidores de crecimiento bacteriano.....  | 7     |
| 1.3.1 Materias primas.....  | 8     |
| 1.3.2 Producto elaborado.....   | 10    |
| 1.4 Alternativas de control de <i>L. monocytogenes</i> con producto de origen<br>natural.....   | 16    |
| 1.5 <i>L. monocytogenes</i> como contaminante de productos cárnicos. Situación del<br>producto durante su procesamiento, almacenamiento, transporte y vida de<br>estante..... | 19    |
| 1.5.1 Situación del producto durante su procesamiento.....  | 20    |
| 1.5.2 Situación del producto durante el almacenamiento y transporte.....  | 21    |
| 1.5.2 Situación del producto durante la vida de estante.....  | 22    |

|   |    |
|---|----|
| <b>CAPÍTULO 2: ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO</b> .....  | 27 |
| Introducción.....   | 27 |
| 2.1 Romero.....   | 27 |
| 2.1.1 Descripción Botánica.....   | 28 |
| 2.1.2 Propiedades.....  | 29 |
| 2.2 Menta.....  | 30 |
| 2.2.1 Descripción Botánica.....   | 30 |
| 2.2.2 Propiedades.....  | 32 |
| 2.3 Pino.....   | 33 |
| 2.3.1 Descripción Botánica.....   | 34 |
| 2.3.2 Propiedades.....  | 35 |
| 2.4 Orégano.....  | 36 |
| 2.4.1 Descripción Botánica.....   | 36 |
| 2.4.2 Propiedades.....  | 37 |
| 2.5 Laurel.....   | 39 |
| 2.5.1 Descripción Botánica.....   | 39 |
| 2.5.2 Propiedades.....  | 40 |
| 2.6 Hierva Luisa.....   | 42 |
| 2.6.1 Descripción Botánica.....   | 42 |
| 2.6.2 Propiedades.....  | 43 |
| 2.7 Actividad biológica de aceites esenciales y extractos vegetales de las especies en estudio..... | 44 |
| <b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | 48 |
| 3.1 Esquema de actividades.....   | 48 |
| 3.2 Recolección de material vegetal.....  | 49 |
| 3.3 Preparación de extractos y aceites esenciales.....  | 49 |
| 3.3.1 Obtención de extractos vegetales.....   | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 3.3.1.1 Equipo.....  | 49 |
| 3.3.1.2 Materiales.....  | 49 |
| 3.3.1.3 Sustancias.....  | 50 |
| 3.3.1.4 Procedimiento.....   | 50 |
| 3.3.2 Obtención de aceites esenciales por el método de destilación<br>por arrastre de vapor.....                             | 53 |
| 3.3.2.1 Equipo.....  | 53 |
| 3.3.2.2 Sustancias.....  | 53 |
| 3.3.2.3 Procedimiento.....   | 53 |
| 3.3.3 Obtención de aceite de orégano.....  | 54 |
| 3.3.3.1 Equipo.....  | 54 |
| 3.3.3.2 Materiales.....  | 54 |
| 3.3.3.3 Sustancias.....  | 55 |
| 3.3.3.4 Procedimiento.....   | 55 |
| 3.4 Aislamiento y purificación del microorganismo de prueba.....   | 56 |
| 3.4.1 Equipos y materiales utilizados para el desarrollo<br>de técnicas microbiológicas.....                                 | 56 |
| 3.4.2 Obtención de <i>Listeria monocytogenes</i> a partir de muestras<br>del Camal Municipal de Cuenca.....                  | 57 |
| 3.4.2.1 Medios de cultivo para el aislamiento de<br><i>L. monocytogenes</i> .....  | 57 |
| 3.4.2.2 Procedimiento.....   | 57 |
| 3.4.3 Aislamiento y purificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....  | 57 |
| 3.4.3.1 Medios de cultivo utilizados.....  | 57 |
| 3.4.3.2 Procedimiento.....   | 57 |
| 3.4.4 Verificación de género y especie mediante características<br>culturales de <i>L. Monocytogenes</i> en agar sangre..... | 58 |
| 3.4.4.1 Medios de cultivo y sustancias utilizadas.....   | 58 |
| 3.4.4.2 Procedimiento.....   | 58 |
| 3.4.5 Mantenimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....   | 59 |
| 3.4.5.1 Medios de cultivo y sustancias.....  | 59 |
| 3.4.5.2 Procedimiento.....   | 59 |

|   |    |
|---|----|
| 3.5 Puesta a punto de ensayo “in Vitro” para extractos y aceites puros.....   | 60 |
| 3.5.1 Preparación de inóculo para el bioensayo.....   | 60 |
| 3.5.1.1 Equipo.....   | 60 |
| 3.5.1.2 Materiales.....   | 61 |
| 3.5.1.3 Sustancias.....   | 61 |
| 3.5.1.4 Procedimiento.....  | 61 |
| 3.5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales<br>y extractos vegetales ante <i>L. monocytogenes</i> . Ensayo “in Vitro”.... | 62 |
| 3.5.2.1 Equipo.....   | 62 |
| 3.5.2.2 Materiales.....   | 62 |
| 3.5.2.3 Sustancias.....   | 62 |
| 3.5.2.4 Procedimiento.....  | 63 |
| 3.5.2.5 Procedimiento para la revelación de resultados<br>del ensayo “in Vitro”.....  | 65 |
| 3.6 Diseño de Mezclas.....  | 66 |
| 3.7 Preparación de productos cárnicos.....  | 68 |
| 3.7.1 Elaboración de salchicha de freír.....  | 69 |
| 3.7.2 Elaboración de jamón de pierna.....   | 71 |
| 3.7.3 Elaboración de hamburguesa de pollo.....  | 73 |
| 3.8 Análisis sensorial de las muestras.....   | 75 |
| 3.8.1 Generalidades del análisis sensorial.....   | 75 |
| 3.9 Ensayo para determinar capacidad inhibitoria de aceites y extractos<br>ante <i>L. monocytogenes</i> .....                                       | 76 |
| <b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</b> .....   | 78 |
| Introducción.....   | 78 |
| 4.1 Resultados obtenidos en la fase experimental.....   | 78 |
| 4.1.1 Rendimiento de extractos vegetales y aceites esenciales.....  | 78 |
| 4.1.2 Actividad antibacteriana de extractos y aceites puros<br>en ensayo “in Vitro”.....  | 79 |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1.3 Actividad antibacteriana de mezclas en ensayo “in Vitro”.....                        | 81        |
| 4.1.4 Actividad antibacteriana de sustancias puras y mezclas<br>en productos cárnicos..... | 83        |
| 4.1.5 Resultados del análisis sensorial del producto terminado.....                        | 84        |
| 4.2 Discusión.....   | 88        |
| 4.2.1 Rendimiento de extractos vegetales y aceites esenciales.....                         | 88        |
| 4.2.2 Actividad antibacteriana de extractos y aceites puros en ensayo<br>“in Vitro”.....   | 89        |
| 4.2.3 Actividad antibacteriana de mezclas en ensayo “in Vitro”.....                        | 89        |
| 4.2.4 Actividad antibacteriana de sustancias puras y mezclas en productos<br>cárnicos..... | 90        |
| 4.2.5 Resultados del análisis sensorial del producto terminado.....                        | 91        |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>92</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>94</b> |

## Índice de Ilustraciones y Cuadros

|                   |    |
|-------------------|----|
| Tabla 1.1:.....   | 5  |
| Tabla 3.1:.....   | 68 |
| Tabla 3.2:.....   | 77 |
| Tabla 4.1:.....   | 79 |
| Tabla 4.2:.....   | 79 |
| Tabla 4.3:.....   | 80 |
| Tabla 4.4:.....   | 82 |
| Tabla 4.5:.....   | 83 |
| Gráfico 3.1:..... | 65 |
| Gráfico 3.2:..... | 67 |
| Gráfico 3.3:..... | 76 |
| Figura 1.1:.....  | 4  |
| Figura 2.1:.....  | 27 |
| Figura 2.2:.....  | 30 |
| Figura 2.3:.....  | 33 |
| Figura 2.4:.....  | 36 |
| Figura 2.5:.....  | 39 |
| Figura 2.6:.....  | 42 |
| Figura 3.1:.....  | 50 |
| Figura 3.2:.....  | 51 |
| Figura 3.3:.....  | 52 |
| Figura 3.4:.....  | 54 |
| Figura 3.5:.....  | 56 |
| Figura 3.6:.....  | 59 |
| Figura 3.7:.....  | 60 |
| Figura 3.8:.....  | 63 |
| Figura 3.9:.....  | 66 |
| Figura 3.10:..... | 70 |
| Figura 3.11:..... | 72 |
| Figura 3.12:..... | 74 |
| Figura 4.1:.....  | 81 |

Figura 4.2:.....82

Correa Padrón, Fernando Esteban.

Trabajo de Graduación.

Dra. María Elena Cazar.

Octubre 2010.

**“EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES COMO  
INHIBIDORES DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN PRODUCTOS  
CÀRNICOS”**

**INTRODUCCIÓN.**

Existen muchas condiciones de peligro que causan enfermedades alimentarias o transmitidas por alimentos. Los peligros biológicos son uno de ellos causados por microorganismos. Entre algunos tipos de microorganismos encontrados se incluyen las bacterias. En algunos casos, la presencia de microorganismos en los alimentos es buena y necesaria para producir algunos sabores y texturas deseadas. Algunas veces los microorganismos presentes en los alimentos causan descomposición. Los microorganismos que causan enfermedades se denominan patógenos. Algunos ejemplos de patógenos incluyen la *Listeria monocytogenes*. Los microorganismos patógenos causan la mayoría de enfermedades de origen alimentario.

El presente trabajo se enmarca en la línea de investigación orientada a la búsqueda de aceites esenciales bioactivos, con aplicación en la preservación de alimentos. La propuesta pretende dar continuidad a trabajos previos en los cuales se verificó el poder antimicrobiano de estas sustancias utilizadas como aditivos de cárnicos. En esta investigación el microorganismo objetivo es *Listeria monocytogenes*.

Existen algunos factores que hacen a *Listeria monocytogenes* particularmente peligrosa en los productos cárnicos. Se trata de un microorganismo realmente peligroso en alimentos ya que cuando es ingerida, esta bacteria puede causar la enfermedad

conocida como listeriosis. Además *L. monocytogenes* tiene una alta tasa de mortalidad. Ha sido estimado que aproximadamente el 20% de los casos que desarrollan listeriosis mueren por complicaciones. También *L. monocytogenes* puede afectar a las poblaciones altamente susceptibles. Los síntomas de las personas afectadas por listeriosis son diversos. En las poblaciones altamente susceptibles, la listeriosis puede ser particularmente peligrosa. De igual manera las alteraciones y la disminución de la vida útil de los productos cárnicos por deterioro bacteriano es la causa de grandes pérdidas económicas para los fabricantes, distribuidores y comerciantes de dichos productos, además un alto riesgo para la salud del consumidor final y por último afectaría la calidad del producto ocurriendo un descenso de ventas para el fabricante. Por consiguiente en la industria de cárnicos es de vital importancia inhibir las acciones de este microorganismo, por lo que en esta industria son muy utilizados los diversos inhibidores bacterianos. Muchos de estos compuestos se han introducido recientemente, por lo que se requiere de mayor investigación en este tema.

Las plantas elaboran los aceites esenciales con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización. Los aceites esenciales son utilizados como conservantes para alimentos, especialmente cárnicos. En el organismo, los aceites esenciales pueden actuar de modo farmacológico, fisiológico y psicológico. Estos compuestos no causan ningún tipo de toxicidad o algún efecto indeseable como los causados por químicos usados comúnmente como conservantes. Por lo tanto el uso de aceites esenciales y extractos naturales como preservantes de alimentos es un amplio campo de estudio además de su interés en la industria cárnica para la eliminación de una bacteria muy patógena como la *L. monocytogenes* ya que estas sustancias aplicadas en dosis correctas son inocuas y efectivas. (Buchanan, 2000).

La propuesta de este trabajo experimental se orienta a la evaluación de extractos vegetales y aceites esenciales, puros y en mezclas, como inhibidores potenciales de *Listeria monocytogenes* en ensayos “in Vitro” y su posterior evaluación en productos cárnicos.

## CAPITULO I

### *LISTERIA MONOCYTOGENES.*

#### **Introducción.**

En este capítulo se revisará información referente a la bacteria objetivo de nuestro estudio, *Listeria monocytogenes*, sus características microbiológicas, los efectos de *L. monocytogenes* en contaminación de alimentos, estrategias de control de la bacteria, el efecto que producen los productos químicos inhibidores del crecimiento bacteriano. Además se desarrollarán alternativas de control para *L. monocytogenes* con productos de origen natural y finalmente se describirá a la bacteria en estudio como contaminante de productos cárnicos durante su procesamiento.

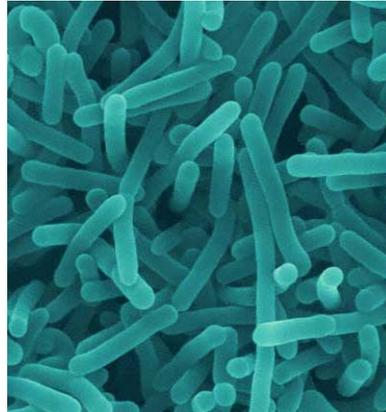
#### **1.1 Características microbiológicas de *Listeria monocytogenes*.**

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C. (Amstrong, 1995).

Otras características relevantes indican que es una bacteria ubicua, resiste ambientes diversos, anaerobio facultativo, psicrótrofo (crece en refrigeración), tolera la sal entre 8 - 12%, sobrevive en baja actividad acuosa (aW: 0.90), resiste pH bajos, forma biopelículas, además es susceptible a tratamientos térmicos. Este

microorganismo es predominante en ambientes húmedos, suelo, agua, vegetales crudos y descompuestos, carnes crudas, lácteos, aceras, techos, paredes, desagües y plantas de alimentos. (Sánchez, 2009)

**Figura 1.1** Imagen microscópica de *Listeria monocytogenes*.



**Fuente:** SÁNCHEZ, M. (2009). Situación de Listeria en el mundo: Hacia Planes Nacionales de;; Listeria; Chile; , disponible en:  
<http://www.iica.int/Eng/regiones/sur/chile/Documents/Situaci%C3%B3n%20de%20Listeria%20en%20el%20Mundo,%20Hacia%20Planes%20Nacionales%20de%20Control%20de%20Listeria.pdf>

Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60°, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, pero pueden crecer a 4°C en pocos días. (Amstrong, 1995).

Según sus reacciones bioquímicas, *Listeria monocytogenes* es una bacteria catalasa positivas y oxidasa negativas. Las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas. Hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni SH<sub>2</sub>. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares. El contenido de guanina-citosina de su ADN es bajo, entre el 36% y el 38%.

Entre las diferentes especies incluidas en el género, *Listeria monocytogenes* es la única implicada en patología humana y el objeto principal de esta investigación. (Brooks *et. al.*, 2002)

Las características de crecimiento son las siguientes

**Tabla 1.1.** Características de crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Sánchez, 2009)

|             | Mínimo | Óptimo | Máximo |
|-------------|--------|--------|--------|
| Temperatura | - 0.4  | 37     | 45     |
| pH          | 4.4    | 7      | 9.4    |
| aW          | 0.92   | -      | -      |

**Fuente:** SÁNCHEZ, M. (2009). Situación de Listeria en el mundo: Hacia Planes Nacionales de;; Listeria; Chile; , disponible en:  
<http://www.iica.int/Eng/regiones/sur/chile/Documents/Situaci%C3%B3n%20de%20Listeria%20en%20el%20Mundo,%20Hacia%20Planes%20Nacionales%20de%20Control%20de%20Listeria.pdf>

## 1.2 Efectos de *Listeria monocytogenes* en contaminación de alimentos

*L. monocytogenes* produce una toxina citolítica y hemolítica, llamada listeriolisina O, que actúa como un importante factor de virulencia. Se trata de una proteína de 52 kD que se secreta a pH bajo y baja concentración de hierro, condiciones presentes en el interior del fagolisosoma. Cuando es fagocitado, el microorganismo empieza a fabricar la listeriolisina, que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma. Este puede ser el principal factor que favorece su supervivencia intracelular, una de las características patogénicas más definitorias de *L. monocytogenes*. (Alvarez *et. al.*, 1997)

El mayor efecto que causa la contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* es la listeriosis. Se trata de una enfermedad originada al consumir alimentos contaminados con la bacteria *Listeria monocytogenes*. Esta enfermedad se ha reconocido recientemente como un importante problema de salud público en el mundo entero. Esta enfermedad afecta principalmente a mujeres embarazadas,

recién nacidos, y adultos con el sistema inmune debilitado. Puede ser evitado siguiendo unas recomendaciones simples. (Frazier y Westhoff., 1978)

En este momento, hay evidencia que los bajos niveles de contaminación de *Listeria monocytogenes* en un alimento puede causar listeriosis, hay evidencia de que menos de 1,000 organismos pueden causar la enfermedad en personas susceptibles. (Swaminathan *et. al.*, 1995)

Normalmente, este microorganismo prolifera a números potencialmente peligrosos dentro de 1 a 35 días. El periodo de incubación ha sido conocido y tiene un amplio rango como 1 a 91 días, sin embargo, bajo las condiciones ideales se ha informado que toman un tiempo pequeño como 1.75 a 2 horas. Las infecciones serias pueden producir septicemia (envenenamiento de la sangre), meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central, y posiblemente la muerte. Estos síntomas pueden precederse por síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarreas, fiebre o dolor de cabeza. Las mujeres embarazadas pueden experimentar una gripe suave con sus síntomas como escalofríos, fiebre y un leve dolor de espalda. También puede conducir al aborto espontáneo, nacimiento prematuro, y un retraso mental en el bebé. La exposición a la bacteria no siempre resulta en enfermedad. (Swaminathan *et. al.*, 1995)

*Listeria monocytogenes* está ampliamente distribuida en el ambiente, se encuentra en tierra y agua, los vegetales llegan a ser contaminados directamente por la tierra o simplemente de estiércol usado como fertilizante. Está presente en animales saludables (especialmente el ganado vacuno, ovejas y aves), estos pueden ser portadores de la bacteria sin presentar síntomas y pueden contaminar alimentos de origen animal como carnes y producto lácteos. También esta presente en el alcantarillado, la vegetación y materia vegetal, agua de arroyos, forraje conservado en silos, y en el hombre. Se cree que un 5% de la población humana son portadores, pero el porcentaje es mucho más alto en grupos particulares, tales como obreros del matadero. La abundancia de esta bacteria en la naturaleza indica que *Listeria monocytogenes* puede estar presente en una amplia variedad de

alimentos frescos y procesados, incluso la leche como es el caso de leches no pasteurizadas (crudas) o alimentos fabricados de esta como queso fresco (blando), también pueden contener la bacteria los productos cárnicos (especialmente productos de carne cruda o derivados sin cocinar como lo son : cortes de cecinas en vitrinas refrigeradas y vienasas), las aves y sus productos, los productos vegetales como ensaladas y alimentos del mar como pescados y mariscos (Frazier y Westhoff, 1978)

*Listeria monocytogenes* es destruida por pasteurización y por procesos de calor como los usados para preparar carnes pre-cocidas, estos deben ser suficientes para matar la bacteria; sin embargo, si las prácticas industriales no son buenas, la contaminación pueden ocurrir después del procesamiento. (Desrosier, 2004)

### **1.2.1 Alimentos susceptibles de contaminación con *L. monocytogenes***

- (1) Productos de carne precocida (cecinas, vienasas o salchichas)
- (2) Vegetales crudos premezclados.
- (3) Alimentos de origen marino como mariscos, pescados (ahumados)
- (4) Productos de leche sin pasteurizar.
- (5) Los quesos suaves (Frazier y Westhoff, 1978)

La composición del producto determina crecimiento/supervivencia. La *L. monocytogenes* crece mejor en carne de aves en comparación con productos a base de res y cerdo (Sánchez, 2009)

### **1.3 Estrategias de control de *L. monocytogenes*: Efecto de productos químicos inhibidores de crecimiento bacteriano**

Existen varias estrategias para el control de *L. monocytogenes* en las plantas de cárnicos y en los productos que son elaborados en estas. Este control se realiza en diferentes etapas de la producción y estados del producto. A continuación describimos las estrategias de control más utilizadas y los productos químicos que son usados. (López, 2009)

### 1.3.1 Materias primas

Los inhibidores de *L. monocytogenes* utilizados en materia prima de productos cárnicos son:

- Mezclas de ácido peroxiacético, ácido octanoico, ácido acético, agua oxigenada.
  - Estos compuestos son usados en carcasas, cortes y órganos de aves.
  - La mezcla de estos productos ejerce un efecto sinérgico, que mejora la actividad antimicrobiana ante *L. monocytogenes*. (López, 2009).
  - Algunos de estos químicos son difíciles de encontrar en el mercado nacional.
  - El ácido acético es utilizado para el control de diferentes especies de bacterias una de ellas *L. monocytogenes* por lo cual se ha sugerido usarlo para el control de microorganismos en productos cárnicos de corto almacenamiento. Su efectividad se incrementa con la reducción del pH, ya que la molécula sin disociar es la activa. No es tóxico en las concentraciones generalmente empleadas (muy variables pero no mayor a 3%) y tiene una dosis letal media para las ratas de 3.53g/Kg. Además por su pH bajo dota de un sabor ácido a los productos cárnicos no muy apetecido en muchos de los mismos. (Badui, 1993<sup>1</sup>).
  - El ácido peracético o peroxiacético (CH<sub>3</sub>-COOOH) no existe comercialmente como producto puro. Lo que se conoce con este nombre son mezclas en equilibrio conteniendo ácido peracético, ácido acético, peróxido de hidrógeno y agua en proporción variable según las cantidades predeterminadas de ácido acético y peróxido de hidrógeno que se utilizan como reacción inicial en el proceso de fabricación. El ácido peracético es un eficaz agente bactericida, esporicida, fungicida e incluso virucida. Atravesando la membrana citoplasmática de las células, oxida sus componentes y destruye su sistema enzimático. Sus

productos de descomposición, agua, oxígeno y ácido acético, son completamente biodegradables. (Bosakewich, 1993)

- El ácido octanoico es virtualmente no tóxico y no sensibilizante, en las dosificaciones recomendadas. A dosis muy grandes (5 veces la dosis recomendada) pueden causar la irritación de la mucosa y producir diarrea y náuseas. En algunos pacientes, la fatiga y síntomas de gripe pueden producirse durante los primeros 2-5 días del uso del ácido octanoico. Esta reacción se debe al fenómeno de decrecimiento y de la reabsorción de la levadura. Esto puede dar lugar a la reacción de Herxheimer (antígenos que reaccionan con los anticuerpos) produciéndose una elevación de histamina y cierto malestar. (Bosakewich, 1993)
- El peróxido de hidrógeno en la industria alimenticia se usa mucho para blanquear quesos, pollos, carnes, huesos, y también se usa en el proceso para la elaboración de aceites vegetales. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada es peligroso para la piel en concentraciones altas. La ingestión de soluciones diluidas de peróxido de hidrógeno puede inducir vómitos, leve irritación gastrointestinal, distensión gástrica y, en raras ocasiones, erosiones o embolismo (bloqueo de los vasos sanguíneos por burbujas de aire) gastrointestinal. Ingerir soluciones de 10-20% de concentración produce síntomas similares; sin embargo, los tejidos expuestos pueden también sufrir quemaduras. Ingerir soluciones aún más concentradas, además de lo mencionado anteriormente, puede también producir rápida pérdida del conocimiento, seguido de parálisis respiratoria. Inhalar el producto para uso doméstico (3%) puede producir irritación de las vías respiratorias. Inhalar vapores de las soluciones concentradas (más del 10%) puede producir grave irritación pulmonar. El contacto de una solución del 3% de peróxido de hidrógeno con los ojos puede causar dolor e irritación; sin embargo, las lesiones graves son raras. (Bosakewich, 1993)

- Nisina
  - Es un antibiótico producida por el *Lactobacillus lactis*, su molécula está constituida por 34 aminoácidos; actúa contra los microorganismos Gram positivos, es estable a pH ácido y algo termosensible, el organismo lo degrada y no produce resistencia cruzada, por lo que no es tóxica para el hombre. (Badui, 1993<sup>1</sup>)
  - Puede ser aplicado directamente en la formulación o por spray en producto elaborado.
  - Esta molécula experimenta sinergismo con lactato y acetato. (López Valladares, 2009)
  
- Ozono
  - Se trata de una técnica muy costosa utilizada en los procesos de desinfección de carnes o de sanitización en plantas de cárnicos. Para su aplicación se requiere de equipos que permitan dosificar el ozono, los cuales representan un costo para los procesos de sanitización. El ozono como gas es un compuesto altamente explosivo. (Doyle, 1999)

### **1.3.2 Producto elaborado**

Dentro de la industria de cárnicos existen varias alternativas como estrategias para el control de *L. monocytogenes* en producto elaborado (López, 2009). A continuación se presentará información referente a los compuestos químicos utilizados con este propósito.

- Monolaurina y otros monoglicéridos
  - Su acción no es muy confiable si se los utiliza como compuestos puros, se necesita realizar mezclas con otros preservantes para mayor efectividad.

- Varios monoglicéridos (glicerol con ácidos grasos) son inhibidores efectivos de *L. monocytogenes* en medio de cultivo y en alimentos, los monoglicéridos monocaprin, monolaurin y aceite de coco, individualmente inhiben el desarrollo de *L. monocytogenes*. Una salmuera con monolaurina y lactato inyectada a carnes logra una mayor eliminación de *L. monocytogenes* durante el cocimiento.
- Aparentemente la monolaurina es un antimicrobiano más potente a temperaturas valores de pH bajos. (Doyle, 1999)
  
- Quelantes (Citrato y EDTA)
  - Los quelantes, que ligan iones metal, no son por si solos letales para *L. monocytogenes* en las concentraciones utilizadas en alimentos. Sin embargo, estos compuestos interactúan con otros conservadores y algunas veces ayudan a suprimir el desarrollo de *L. monocytogenes* en carnes. En otros casos, por ejemplo el EDTA combinado con nisina, ocurre lo contrario y el EDTA reduce los efectos antimicrobianos de la nisina (Doyle, 1999)
  - El abuso en el empleo de los quelantes, especialmente del EDTA, provoca problemas nutricionales ya que este compuesto elimina iones indispensables para el buen funcionamiento del organismo humano; es decir, se puede reducir la disponibilidad biológica de los metales que contienen los alimentos. (Badui, 1993<sup>1</sup>)
  
- Sorbatos (ácido sórbico)
  - Estos conservantes se usan en una concentración menor al 0.3%, su efectividad aumenta al disminuir el pH. La dosis letal media del ácido es 7.3 g/Kg, en vía oral, para ratas. No es letal para el hombre ya que este compuesto se metaboliza como cualquier otro ácido graso. Las sales del ácido sórbico son más utilizadas por su mejor solubilidad (Badui, 1993<sup>1</sup>).

- El sorbato de potasio es la sal más usada en la industria cárnica; por esta razón se ha sugerido este compuesto como sustituto de los nitritos y nitratos que se usan en el curado de los derivados cárnicos. (Badui, 1993<sup>1</sup>)
- Experimentos “in Vitro” revelaron que *L. monocytogenes* es más susceptible al sorbato a un pH más bajo (mayor efectividad a pH 5 que a pH 6) y a una menor temperatura (mayor efectividad a 5°C que a 30°C). En productos cárnicos como salchichas de freír, el sorbato es también un inhibidor más efectivo de *L. monocytogenes* a menores temperaturas. El contenido de grasa de la salchicha no afecta su actividad antimicrobiana, el sorbato es más efectivo en salchichas con 67% de grasa comparadas con las de 22% de grasa. (Doyle, 1999)
  
- Metil parabenos (p-hidroxibenzoatos)
  - Estos compuestos corresponden a los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico con cadenas de alquilos. En concentraciones de 0.05 a 0.2% son efectivos en el control del crecimiento de bacterias especialmente Gram negativas. No son tóxicos para el hombre ya que se eliminan en la orina en forma de ácido hipúrico, después de haberse hidrolizado el enlace éster; la dosis letal media para los derivados de metílico y propílico es superior a 8000mg/Kg. (Badui, 1993<sup>1</sup>)
  
- Cloruro de Sodio (NaCl)
  - El Cloruro de Sodio en un medio de crecimiento o en los alimentos, puede ser una fuente del estrés osmótico por la disminución de la actividad del agua (aw). Sin embargo, *L. monocytogenes* es sorprendentemente tolerante a la sal y capaz de resistir altas concentraciones de este compuesto, en comparación

con *Salmonella spp.* y *Yersinia spp.* En un experimento para determinar los efectos antilisteriales de soluciones de salmuera que se podrían utilizar como untables, *L.monocytogenes* sobrevivió fácilmente 6 horas a 10°C en soluciones con 6, 16, o 26% de cloruro de sodio. *L. monocytogenes* incluso llegó a crecer en una solución de salmuera al 6% y en un medio de peptona de carne con 8% de NaCl. La presencia de cloruro de sodio en un medio de cultivo también protege *L. monocytogenes* de otros tipos de estrés como el calor en carne de puerco molida, lactocina 705 en carne molida y peróxido de hidrógeno en medio de cultivo. A pesar de que *L. monocytogenes* es halotolerante, la sal es estresante y reduce la velocidad de desarrollo. En combinación con otros compuestos utilizados en carnes curadas, NaCl es un factor que contribuye a la destrucción o inhibición de *L. monocytogenes* (Doyle, 1999)

- Nitritos y nitratos

- Nitratos y nitritos son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza, formando parte del ciclo del nitrógeno. El nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química puede ser reducido por acción microbológica. El nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), es oxidado con facilidad por procesos químicos o biológicos a nitrato, o bien reducido originando diversos compuestos. (Antón *et, al.* 2001).
- El nitrito fundamentalmente se emplea como aditivo alimentario (E-249 nitrito potásico, E-250 nitrito sódico), especialmente en carnes curadas. El nitrato es añadido en ocasiones junto con el nitrito como conservante (E-251 nitrato sódico, E-252 nitrato potásico), ya que sirve como reserva de éste al ir transformándose lentamente en nitrito. La principal preocupación derivada de la presencia de nitratos en alimentos o en agua potable tiene dos motivos: por un lado, los efectos tóxicos producidos por un exceso de nitratos en la dieta; por otra parte, pueden causar la formación

endógena de N-nitrosocompuestos, de efectos cancerígenos (como las nitrosaminas). Los N-nitrosocompuestos son agentes teratogénos, mutágenos y probables carcinógenos, altamente peligrosos para la salud humana. Se originan como consecuencia de la reacción de las aminas secundarias (aromáticas y alifáticas) con el ácido nitroso HONO. A altas concentraciones pueden reaccionar con la hemoglobina. (Antón *et, al.*2001).

- La ingesta diaria admisible de nitritos es máximo 0.06mg/kg de peso corporal. Su uso no está permitido en productos dirigidos a los niños menores de seis meses. Los niños pequeños tienen un tipo diferente de hemoglobina, la cual es mucho más reactiva hacia los nitritos que la hemoglobina normal. (Badui,1993<sup>1</sup>)
- El nitrito por si mismo no es un agente antilisterial muy efectivo. En pasta de pavo (pH 6.2), una solución de 30ppm de nitrito de sodio es incapaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* a 4 o 25°C. En pasta de res, se requiere una solución de 800 ppm para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes*. Sin embargo, como con la sal, en presencia de otros agentes curantes o lactocina 705, el nitrito contribuyó a la supresión de *L. monocytogenes* temperaturas de refrigeración. (Doyle, 1999)

- Fosfato trisódico:

- Los fosfatos son sales esenciales para el funcionamiento del organismo, debido a su capacidad de regular sales minerales en el organismo. El fosfato sódico de celulosa, por ejemplo, se usa para prevenir la formación de cálculos.
- Los fosfatos son absorbidos lenta e incompletamente cuando son ingeridos, y resultan rara vez en efectos sistémicos. Tales efectos, sin embargo, han ocurrido. Los síntomas pueden incluir vómitos, letargo, diarrea, efectos químicos en la sangre, alteraciones cardíacas y efectos sobre el sistema nervioso. La toxicidad de los fosfatos es debido a su habilidad para secuestrar el calcio.

- El fosfato trisódico se ha utilizado para descontaminar canales de pollo ya que puede reducir las bacterias contaminantes en 1-2 logs. Aplicar TSP en canales de res contaminadas con *L. monocytogenes* elimina 1.3 log de células pero al séptimo día de almacenamiento en frío, las bacterias restantes comenzaron a crecer. Utilizar TSP al 10% untado durante 15 seg eliminó únicamente 39% y 81% de *L. monocytogenes* a 10°C y 4°C, respectivamente. En otros experimentos, en donde *L. monocytogenes* se suspendió en soluciones de TSP, fue necesaria una exposición en TSP al 8% por lo menos 10 min para reducir el número bacteriano en al menos 1 log. *E. coli* o157:H7, *Campylobacter jejuni* y *Salmonella typhimurium* fueron más sensibles al TSP que *L. monocytogenes*. (Doyle, 1999)
  
- Ahumado / humo líquido
  - El ahumado de carne y pescado es una técnica de conservación bien conocida que ha demostrado inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Varios experimentos han demostrado los efectos antilisteriales de los aditivos de humo líquido. El análisis del humo líquido reveló que su ingrediente activo era el isoeugenol y este compuesto fue más efectivo en presencia de ácido acético a pH 5.8. Son mejores agentes antilisteriales aquellos que tienen concentraciones más altas de fenoles. (Doyle, 1999).
  - Se conoce que el exceso en el uso de humo líquido causa cáncer, y no es aplicable para todos los productos solo para los productos ahumados.
  
- Lactato de sodio/potasio
  - Se trata de un ácido débil
  - No se han reportado límites sobre su ingesta diaria.

- El lactato no presenta efectos colaterales en los adultos. Los lactatos de configuración D- o DL (estereoisómeros) no deben ser suministrados a infantes debido a que su organismo no cuenta aún con las enzimas hepáticas apropiadas para metabolizar estas formas de lactato.
  - Como antimicrobiano, el lactato actúa a nivel de membrana celular.
  - El lactato, individualmente, es solo bacteriostático a altas concentraciones (Doyle, 1999).
- Diacetato de sodio
    - Se disocia en ácido acético y acetato de sodio
    - Presenta pH bajo debido a presencia de ácido acético
    - Al aplicarlo sólo es bacteriostático en altas concentraciones
    - Los acetatos son usados como conservantes además de como sustancias amortiguadoras o 'buffers'
    - El diacetato de sodio no produce efectos colaterales, ya que los acetatos son compuestos afines a todas las células corporales. Debe ser evitado por aquellas personas que sufren de intolerancia al vinagre (casos muy raros). La ingesta máxima diaria es de 15 mg/kg de peso corporal. (Badui, 2006<sup>2</sup>)

#### **1.4 Alternativas de control de *L. monocytogenes* con productos de origen natural**

Se ha evaluado la eficacia de una variedad de hierbas y especies para suprimir el crecimiento de *L. monocytogenes* en ensayos "in vitro". Los extractos de plantas que presentan actividad antilisterial incluyen: extractos de lúpulo, eugenol, hojas de pimiento, destilados de rábano, romero, clavo, ácido cinámico, furanocoumarinas, carvacol. Se han evaluado otros extractos de plantas pero los resultados no fueron consistentes. Varias muestras comerciales de aceites esenciales de plantas y varias variedades de las mismas hierbas mostraron

diferencias en el potencial antilisterial por la diferencia de cantidades de compuestos críticos. También se encontró que algunos extractos de plantas son efectivos contra *L. monocytogenes* en carne incluyendo el romero en salchichas de hígado de puerco lista para consumirse, destilado de rábano en roast beef, eugenol y hojas de pimiento en carne cocida refrigerada. Cabe destacar que *L. monocytogenes* generalmente fue menos sensible a estos extractos en carne (comparado con medio de cultivo) y la sensibilidad también varió con el contenido de grasa de la carne. (Doyle, 1999)

En los últimos años, el renovado interés por lo natural y lo orgánico ha propiciado el resurgimiento de los extractos naturales y ha generado nuevas líneas de investigación.

Los principales extractos vegetales con actividad antimicrobiana son los aceites esenciales y las oleorresinas.

Los aceites esenciales se obtienen directamente de las plantas y no sufren transformaciones posteriores, por ello su rendimiento es bajo y continúan siendo costosos. Se extraen de las partes no leñosas de las plantas, en especial de las hojas, mediante diferentes métodos: extrusión, destilación por arrastre con vapor de agua (más usada a nivel comercial), extracción con solventes volátiles, enfleurage (generalmente para extractos de flores) y con fluidos supercríticos. Se encuentran en estructuras histológicas especializadas, localizadas sobre o cerca de la superficie de la planta. Su función en la planta sigue en estudio pero se asocia a la inhibición de la germinación y como protección contra insectos y hongos y para favorecer la polinización (Shiva, 2007). Se conocen aproximadamente 3000 plantas productoras de aceites esenciales con potencial antimicrobiano, de las cuales 300 tienen importancia comercial (Burt, 2004).

La clasificación de los aceites esenciales se basa en la consistencia y se denominan con el mismo nombre de la planta de la cuál provienen (planta donante), por ejemplo aceite esencial de romero. Los *aceites esenciales* son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, son mezclas complejas de hasta 100 componentes, entre ellos:

terpenoides, fenoles aromáticos, éteres, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma característico de la planta donante (Batish *et al.*, 2008). Algunos de los componentes fenólicos de los aceites esenciales son clasificados como GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized as Safe) lo que potencia su uso (Ponce *et al.*, 2003).

Los aceites esenciales de han mostrado en varios trabajos propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias e insecticidas (Burt, 2004). Muchos estudios realizados *in vitro* informan la eficiencia de los aceites esenciales y las oleorresinas como antilisteriales naturales (Ponce *et al.*, 2003).

Algunos de los aceites esenciales que han sido ensayados en alimentos son: eucalipto (*Melaleuca alternifolia*), romero (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha piperita*), rosa mosqueta (*Rosa moschata*), trébol (*Syzygium aromaticum*), limón (*Citrus limonum*), orégano (*Origanum vulgare*), etc. Para que el uso de aceites esenciales y oleorresinas pueda ser aplicado exitosamente a escala comercial como antilisteria, el impacto sensorial sobre el alimento debe ser tenido en cuenta y minimizado. Las hierbas aromáticas y especias han sido utilizadas durante siglos para condimentar los alimentos, pero también como preservantes. El desarrollo de tecnologías no tradicionales de preservación de alimentos, donde se busca la conservación del alimento manteniendo sus características originales, ha dado paso a la aplicación combinada de distintos métodos. Por este motivo, la incorporación de extractos vegetales naturales como aditivos de alimentos tiene un campo de estudio prometedor. Sin embargo, para obtener los resultados observados en el laboratorio en conservación de alimentos, suele requerirse mayores concentraciones de los extractos activos.. En general, la eficacia de los extractos puede verse afectada por ciertos componentes de los alimentos. Se cree que altos niveles de grasas y/o proteínas en el alimento protegen a las bacterias de la acción de los extractos (Moreira *et al.*, 2007).

También se ha sugerido que la mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos, comparada con la disponible en los medios de laboratorio, puede

favorecer la reparación de las células microbianas dañadas por principios activos de los extractos y aceites esenciales. No sólo deben tenerse en cuenta las propiedades intrínsecas del alimento, sino también las extrínsecas, tales como temperatura, características de los microorganismos, etc. Es importante analizar la influencia de estos factores en la actividad antimicrobiana de los extractos propuestos para determinar las condiciones óptimas de aplicación (Gutierrez *et. al.*, 2008).

### **1.5 *L. monocytogenes* como contaminante de productos cárnicos. Situación del producto durante su procesamiento, almacenamiento, transporte y vida de estante**

El alimento va por un largo recorrido antes de llegar a la venta. A pesar de que nuestro país tiene normas para controlar la inocuidad de los productos cárnicos, enfermedades transmitidas por estos productos todavía podrían ocurrir debido a los peligros presentes durante la producción, procesamiento, distribución, almacenaje, o preparación de los alimentos. Se puede prevenir y controlar los brotes causados por productos cárnicos contaminados, identificando las fuentes y los factores que contribuyen a *Listeria monocytogenes* en los ambientes de producción, almacenamiento, en el transporte y en los diversos sitios que se encuentren para su venta. (Cutre *et. al.*2006).

En los últimos 20 años fue identificada una conexión entre *Listeria monocytogenes* y los alimentos listos para comer o alimentos procesados. Durante el procesamiento de alimentos, el patógeno es eliminado a través de una cocción adecuada. Sin embargo, el organismo puede contaminar productos listos para el consumo humano cocidos antes del empaque, durante el transporte, o durante el manipuleo post-cocción. La contaminación es considerada un problema serio ya que usualmente estos alimentos no requieren cocción adicional en el servicio de alimentos, en los establecimientos de ventas al detalle, o por los consumidores. Si *Listeria monocytogenes* está asociada con estos productos y no es destruida por la cocción, puede sobrevivir y ser ingerida, causando una enfermedad transmitida por alimentos. Es importante anotar que la

mayoría de los brotes de listeriosis asociados con alimentos listos para comer provienen de productos manufacturados en establecimientos de procesamiento. (Cutre *et. al.*2006).

### **1.5.1 Situación del producto durante su procesamiento**

Existen numerosas fuentes de contaminación, incluyendo: alimentos, ambiente, equipo, empleado. Observemos detenidamente estas fuentes de contaminación en las diferentes fases de producción. (Cutre *et. al.*2006).

**Alimentos:** Algunos materias primas pueden estar contaminados con algunos peligros de origen alimentario antes de ser enviados a la planta de producción. (Cutre *et. al.*2006).

Los productos crudos como las carnes y aves pueden contener microorganismos, como *Listeria monocytogenes*. Aunque los métodos de procesamiento como los tratamientos de calor o químicos pueden destruir los microorganismos, algunos productos cárnicos procesados podrían estar contaminados con *Listeria monocytogenes* cuando son inadecuadamente tratados o cuando entran en contacto con otros alimentos contaminados. Si los alimentos contaminados con patógenos entran en el establecimiento de producción, la posibilidad de que otros alimentos puedan contaminarse aumenta. (Cutre *et. al.*2006).

**Ambiente:** Los microorganismos son parte natural del agua, aire y suelo. Algunas formas para prevenir que los microorganismos entren o crezcan en estos ambientes son la limpieza, desinfección y filtración del aire. Los artículos como los limpiadores, desinfectantes, y aún los plaguicidas, son comunes en los ambientes de la fábrica de proceso, lugares. Sin embargo, algunos pasos deben tomarse para asegurar que los químicos estén separados de las áreas de preparación y de los alimentos. (Cutre *et. al.*2006).

**Equipos:** El equipo contaminado o sucio puede contaminar el alimento inocuo. El mantenimiento preventivo y el cuidado del equipo es necesario para evitar que los equipos transfieran patógenos a los alimentos. El equipo limpiado y desinfectado

inadecuadamente puede ser una fuente de contaminación microbiológica o aún contaminación química. (Cutre *et. al.*2006).

Empleados: Los empleados pueden contaminar los alimentos con *Listeria monocytogenes* si no siguen políticas de higiene personal adecuadas, o si los empleados no siguen los pasos apropiados para recibir, almacenar, preparar, y servir los alimentos de una manera segura. (Cutre *et. al.*2006).

### **1.5.2 Situación del producto durante el almacenamiento y transporte**

Equipos: *Listeria monocytogenes* también puede encontrarse en los equipos usados para el transporte y almacén. Sin ninguna información definitiva, se debes considerar que cualquier tipo de equipo puede ser una fuente del patógeno. El patógeno puede esconderse en los equipos difíciles de limpiar como:

- ruedas de carritos que transportan los alimentos desde la recepción,
- las unidades de almacenaje como los exhibidores, cuartos fríos y los congeladores,
- los anaqueles y repisas.
- ventiladores en el sistema de enfriamiento de los lugares de almacenamiento y los termo cooler para transporte. (Cutre *et. al.*2006).

El ambiente: Es muy posible que los sitios de refugio de *Listeria monocytogenes* en lugares de almacenamiento sean drenajes, □pisos , paredes, tomas de aire, casetas en los vehículos de transporte, contenedores de almacenamiento y todo lo que le rodee al producto cárnico durante estos dos periodos. (Cutre *et. al.*2006).

Empleados: Las manos, pies, y ropa de los empleados también pueden estar contaminados con el patógeno, por lo tanto, esto permite la contaminación de pisos y cualquier artículo usado por los empleados. (Cutre *et. al.*2006).

### 1.5.3 Situación del producto durante la vida de estante.

Aunque los tres tipos de peligros deben ser evaluados y dirigidos para los establecimientos de venta al detalle, los microorganismos representan el mayor riesgo de una enfermedad o daño causado por los alimentos. *Listeria monocytogenes* es uno de esos microorganismos que pueden contaminar los alimentos y causar enfermedades alimentarias, o aún la muerte. Ha sido muy bien documentado que *Listeria monocytogenes* tiene la habilidad de sobrevivir y multiplicarse bien en los establecimientos de procesamiento de alimentos. Este patógeno puede establecerse en lugares difíciles para limpiar, conocidos como sitios de refugio. Estos lugares pueden contaminar los alimentos listos para comer si no son limpiados completamente. Sin embargo, muy poco se sabe acerca de los sitios de refugio del patógeno en los establecimientos de venta al detalle. Por lo que, solo podemos especular las fuentes específicas de *Listeria monocytogenes* en el ambiente de estos establecimientos. (Cutre *et. al.*2006).

Consideremos la siguiente información:

Alimentos: Los alimentos listos para comer vendidos en los mostradores de carnes, pueden ser una fuente de *Listeria monocytogenes*. La carne, también es fuente potencial del patógeno. En muchos establecimientos de venta al consumidor, el potencial de una contaminación cruzada de un producto crudo a uno listo para el consumo y el equipo es posible. (Cutre *et. al.*2006).

Ambiente: Es muy posible que los sitios de refugio de *Listeria monocytogenes* en establecimientos de venta al detalle sean similares a aquellos encontrados en las instalaciones de procesamiento. Estos sitios incluyen, pero no están limitados a:  drenajes trampas de grasa,  pisos , paredes, respiraderos,  áreas por donde plagas, como roedores o insectos, pueden entrar al establecimiento. (Cutre *et. al.*2006).

Equipos: cualquier superficie en contacto con los alimentos como los cuchillos, tablas de picar, guantes, y esterillas de bambú pueden ser fuente de *Listeria*

*monocytogenes*, así como las rebañadoras, molinos para carne etc. (Cutre *et. al.*2006).

Empleados: Los empleados pueden ser una fuente de *Listeria monocytogenes* ya que se sabe que algunas personas portan el patógeno en su tracto gastrointestinal. Malas prácticas de higiene personal tales como un mal lavado de manos o uniformes sucios, puede llevar a la contaminación de alimentos y equipos con *Listeria monocytogenes*.

Clientes y Vendedores: Cualquiera que entre a la tienda tiene el potencial de introducir peligros en la tienda. Por ejemplo, los clientes y vendedores portan microorganismos en sus zapatos, ropa, y manos, y pueden transferirlos a los carritos y los alimentos mientras compran. Luego, los empleados pueden recoger estos microorganismos durante el curso de las rutinas normales y transferirlos a los alimentos cuando los están manipulando.

Comprender las fuentes de *Listeria monocytogenes* es un paso muy importante para desarrollar e implementar un programa de control adecuado. Basado en los reportes de la FDA y en los reportes de provistos por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CCE), se han identificado frecuentemente tres factores de riesgo que contribuyen a la contaminación, diseminación, y crecimiento de la mayoría de patógenos en alimentos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, en el ambiente de procesamiento o de venta al detalle. Estos son:

- el control inadecuado de la temperatura y del tiempo;
- la contaminación cruzada; o
- la limpieza y desinfección inadecuadas.

A continuación se detallan estos factores.

Control Inadecuado del Tiempo y Temperatura: El primer factor que contribuye a *Listeria monocytogenes* en los ambientes de producción, transporte, almacenamiento y en la venta el control inadecuado de la temperatura y del tiempo.

Desafortunadamente, *Listeria monocytogenes* puede crecer lentamente a temperaturas de refrigeración. Los productos cárnicos pueden contaminarse con *Listeria monocytogenes* durante el procesamiento. Si estos productos se mantienen almacenados a temperaturas de refrigeración por largos períodos de tiempo, es posible que *Listeria monocytogenes* pueda crecer a niveles tan altos que puedan causar enfermedades alimentarias. Mientras que la refrigeración es importante para mantener bajos los niveles de *Listeria monocytogenes*, las temperaturas mayores de 41°F permiten que el patógeno crezca mucho más rápido. Esta información es una de las razones por la cual las guías federales recomiendan que los productos cárnicos sean mantenidos a 41°F (Cutre *et. al.*2006).

Contaminación Cruzada: La contaminación cruzada ocurre cuando los microorganismos son transferidos de una superficie a otra, posiblemente contaminando los alimentos inocuos y los equipos limpios.

En 1998 y 2003, la FDA condujo un estudio para observar y documentar la incidencia de los factores de riesgo que contribuyen a las enfermedades transmitidas por alimentos en. Estos escenarios incluyen:

- alimentos de fuentes no confiables
- tiempo y temperatura inadecuados
- cocción inadecuada
- pobre higiene personal
- equipo contaminado/prevenición de la contaminación

La contaminación cruzada puede ocurrir entre el equipo, el alimento, el ambiente y aún los empleados. (Cutre *et. al.*2006).

Existen muchas formas de contaminación cruzada. Algunos ejemplos de contaminación cruzada en el ambiente incluyen:

- Rebanando alimentos. Si la rebanadora está contaminada con producto que contiene microorganismos, entonces otros alimentos que entren en contacto con la rebanadora pueden contaminarse.
- Exhibidores y congeladores. Los ventiladores sucios en las congeladoras y exhibidores pueden propagar *Listeria monocytogenes* a los alimentos. Cuando los ventiladores circulan aire, los microorganismos en éstos pueden propagarse en todo el exhibidor o congelador, incrementando la incidencia de la contaminación cruzada en las piezas del equipo. (Cutre et. al.2006). También, la condensación que se forma en el exhibidor, crea otro problema de contaminación cruzada. El agua que gotea en los productos listos para comer es otra forma en que los alimentos pueden ser contaminados. (Cutre et. al.2006)
- Drenajes. Los datos han demostrado que los drenajes pueden ser reservorios potenciales de *Listeria monocytogenes*. Durante la limpieza de pisos y drenajes, los alimentos y equipos pueden contaminarse si durante la limpieza, el agua de las mangueras salpica el microorganismo sobre algunas superficies, o en el ambiente. Las mangueras a presión deberían usarse cuidadosamente en las áreas de preparación y almacenaje de alimentos listos para comer ya que las gotas de agua pueden llevar *Listeria monocytogenes* del drenaje al aire. Grietas en equipos y utensilios. *Listeria monocytogenes* puede esconderse en grietas presentes en el equipo, utensilios, y tablas de preparación, haciendo más difícil su limpieza. Si las superficies no son limpiadas adecuadamente, cualquier alimento que entre en contacto con éstas puede llegar a contaminarse. (Cutre et. al.2006).

Contaminación durante el transporte, almacenamiento y exhibición. Los alimentos pueden llegar a contaminarse por el manipuleo inadecuado durante el transporte desde la recepción a las fábricas durante el almacenamiento o exhibición. Si los productos cárnicos entran en contacto con los alimentos crudos o el equipo contaminado, el potencial de contaminación cruzada se incrementa. También el tráfico de personas del área de productos crudos, puede introducir *Listeria monocytogenes* al ambiente del producto terminado.

Las manos sucias de los empleados o sin lavar pueden contaminar los alimentos y equipos. Los empleados que realizan las diferentes tareas en los establecimientos de producción pueden contaminar los alimentos y los equipos cuando cambian de tarea si es que no siguen una higiene adecuada, o no usan los utensilios apropiados como tenazas o guantes limpios. El uso de vestimenta sucia puede ser una fuente de contaminación de alimentos. Por esto, es importante seguir las normas sobre la vestimenta apropiada que deben llevar los empleados de alimentos. Para reducir la probabilidad de contaminación cruzada, los empleados deben usar delantales o mandiles limpios y cambiarlos cuando se ensucian y dejarlos en el lugar de trabajo cuando abandonen el área de trabajo. (Cutre *et. al.*2006).

Limpieza y Desinfección Inadecuadas: El tercer factor que contribuye a la presencia de *Listeria monocytogenes* en los diferentes ambientes, es la limpieza y desinfección inadecuada del equipo, los alimentos, las superficies en contacto con los mismos y las superficies que no tienen contacto directo con ellos. La limpieza y desinfección poco frecuente permite a *Listeria monocytogenes* crecer a niveles altos en los equipos y en el ambiente. (Cutre *et. al.*2006).

Si *Listeria monocytogenes* permanece en el equipo y en el ambiente por largos períodos de tiempo, el riesgo de una contaminación de los productos cárnicos aumenta. Ya que *Listeria monocytogenes* puede producir biopelículas, o una capa viscosa invisible, en las superficies. En resumen, existen numerosos factores de riesgo que contribuyen a la contaminación, crecimiento, y diseminación de *Listeria monocytogenes* en los ambientes de venta, producción, transporte y almacenamiento. Estos factores necesitan ser tomados en cuenta para identificar las medidas de prevención/control y establecer un programa efectivo de control de *Listeria monocytogenes*. (Cutre *et. al.*2006).

*L. monocytogenes* puede contaminar productos cárnicos que son expuestos al ambiente después de ser sometidos a un tratamiento letal para la bacteria

El producto listo para consumo es considerado adulterado si contiene o si entra en contacto con superficies contaminadas con *L. monocytogenes*. (Cutre *et. al.*2006).

## CAPITULO II

### ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO.

#### Introducción.

En este capitulo se desarrolla la descripción botánica y propiedades de cada una de las especies vegetales que se utilizan para el estudio realizado.

#### 2. Especies vegetales en estudio.

##### 2.1 Romero.

Figura 2.1: Romero



**Fuente:** Diccionario Enciclopédico Popular Ilustrado Salvat (1974). <http://es.wikipedia.org/wiki/Internacional>; (Visitada Mayo 2010).

### 2.1.1 Descripción Botánica.

**Reino:** Plantae.

**Familia:** Lamiaceae.

**Division:** Magnoliophyta.

**Genero:** *Rosmarinus*.

**Clase:** Magnoliopsida.

**Especie:** *R. officinalis*.

**Orden:** Lamiales.

**Nombre Binomial:** *Rosmarinus officinalis*.

El romero es un arbusto leñoso de hojas perennes muy ramificado, y puede medir hasta 2 metros de altura. Lo encontramos de color verde todo el año, con tallos jóvenes borrosos (aunque la borra se pierde al crecer) y tallos añosos de color rojizo y con la corteza resquebrajada. (Miranda, 2007). (Salvat, 1974).

Las hojas son pequeñas y muy abundantes, presentan forma linear. Son opuestas, sésiles, enteras, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de pelo. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos. (Miranda, 2007).

Las flores son de unos 5 mm de largo. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados que están soldados a la corola y tienen un pequeño diente. (Miranda, 2007).

El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color parduzco. (Salvat, 1974).

Las hojas y sumidades de romero contienen taninos, un principio amargo, 0.15% de saponina ácida y pequeñas cantidades de un glucósido. Pero el más importante de sus componentes aparte de una pequeña cantidad de resina, es la esencia de romero, que se obtiene de las hojas y sumidades floridas en cantidades variables, según las localidades en que se cría y la época en que se recolecta. (Bandoni, 2000)

Su composición química es:

- Ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, rosmarínico)
  - Flavonoides (derivados del luteol y del epigenol)
  - Aceite esencial (pineno, canfeno, borneol, cineol, alcanfor, limoneno) 1,2 a 2%
  - Diterpenos (carnosol, rosmanol, rosmadial)
  - Ácidos triterpénicos (ácido ursólico) 2 a 4%
  - Alcoholes triterpénicos (alfa y beta-amirina, betulósido).
- (Bandoni, 2000).

### **2.1.2 Propiedades.**

Del romero se utilizan sobre todo las hojas, y a veces, las flores. Es una planta rica en principios activos. Con el aceite esencial que se extrae directamente de las hojas, se prepara alcohol de romero, que se utiliza para prevenir las úlceras. También se emplea para tratar dolores reumáticos y lumbalgias. Se utiliza en fricciones como estimulante del cuero cabelludo (alopecia). La infusión de hojas de romero alivia la tos y es buena para el hígado y para atajar los espasmos intestinales. El humo de romero sirve como tratamiento para el asma. El alcanfor de romero tiene efecto hipertensor (sube la tensión) y tonifica la circulación sanguínea. (Salvat, 1974).

Por sus propiedades antisépticas, se puede aplicar por decocción sobre llagas y heridas como cicatrizante. También posee una ligera cualidad emenagogo.

Además es una excelente planta de interior debido al agradable aroma que desprende. (Morton, 1987),

## 2.2 Menta.

Figura 2.2: Menta



**Fuente:** Diccionario Enciclopédico Popular Ilustrado Salvat (1974). <http://es.wikipedia.org/wiki/Internacional>; (Visitada Mayo 2010).

### 2.2.1 Descripción Botánica.

**Reino:** Plantae.

**Familia:** Lamiaceae.

**Division:** Magnoliophyta.

**Genero:** *mentha*.

**Clase:** Magnoliopsida.

**Especie:** *M.pulrgium*

**Orden:** Lamiales.

**Nombre Binomial:** *Mentha pulegium*.

El poleo (*Mentha pulegium*), también llamado poleo-menta, es una de las especies más conocidas del género *Mentha*. De la familia de las labiadas, es una perenne cespitosa y de raíces rizomatosas que crece bien en sitios húmedos o junto a cursos fluviales, donde se la encuentra silvestre entre gramíneas y otras plantas. (Miranda, 2007). (Salvat, 1974).

Planta perenne, de 10-40 cm, subglabra o tomentosa, con olor acre; tallos de rastreros a ascendentes. Hojas de 8-30 x 4-12 mm, estrechamente elípticas, atenuadas en la base, raramente suborbiculares, cortamente pecioladas, enteras o algo denticuladas, pelosas al menos en el envés. Brácteas semejantes a las hojas, pero generalmente más pequeñas. Flores agrupadas en verticilos numerosos, todos axilares, multifloros y compactos. Cáliz de 2-3 mm; dientes ciliados, los dos inferiores subulados, los tres superiores más cortos y anchos. Corola de 4-6 mm, rosa o lila, con una jiba lateral. Estambres exertos o inclusos. Ovario súpero, bicarpelar, tetralocular. (Plantas Medicinales, Vademécum)

Florece desde el comienzo del verano hasta octubre. Muy variable en cuanto al hábitat, forma de la hoja e indumento.

Las características morfológicas son: Tallo cuadrangular, de subglabro a tomentoso.

Hojas, de subglabras a tomentosas, con peciolo corto, ovales u oblongas, obtusas o subagudas, denticuladas o casi enteras, con nervios prominentes en el envés. Presentan tricomas glandulares y tectores en ambas caras. Los tricomas tectores son más largos y abundantes en los nervios. Brácteas florales semejantes a las hojas, generalmente de menor tamaño. Cáliz de 2-3 mm, con diez nervios prominentes, pubescente, glanduloso, tubular, con la garganta cerrada por pelos conniventes, subbilabiado, con cinco dientes desiguales, ciliados, los dos inferiores más estrechos y largos. Corola de 4-6 mm, rosa o lila, tubulosa, con cuatro lóbulos casi iguales, glándulas y tricomas tectores, algunos muy largos, anchos y flexuosos. Cuatro estambres divergentes, soldados a la corola.

Ovario súpero, tetralocular; estilo ginobásico. El fruto es una tetranúcula.

En todos los órganos se observan glándulas redondeadas, grandes, más abundantes en las hojas, brácteas y cáliz

La menta, en sus distintas variedades, contiene principios activos similares. El principal de ellos es un aceite esencial, cuyo componente central es un alcohol, denominado mentol. El compuesto se encuentra en concentraciones de 50 a 86%. Este alcohol es el producto de una cadena metabólica, que tiene como subproductos la piperitona, la pulegeona y la mentona. Cabe hacer notar que mientras más joven es la planta, mayor es la concentración de los subproductos.

Composición química. La esencia de poleo contiene fundamentalmente cetonas, destacando entre ellas la pulegona (85-96%), cetona terpénica no saturada, cuya proporción más o menos elevada determina la calidad de la esencia. Otras cetonas presentes en menor concentración son: l-mentona, d-isomentona, piperitona, piperitenona, isopiperitenona. Además, han sido identificados alcoholes (mentol, 3-octanol, linalol, isomentol, neomentol, neoisomentol); ésteres, como el acetato de mentilo, e hidrocarburos (alfa y beta-pineno, limoneno, p-cimeno, dipenteno, canfeno). Influyendo en la proporción de cada componente el estado de desarrollo de la planta, así como los factores climáticos y ecológicos, también contiene flavonoides (diosmósido y hesperósido). (Morton, 1987).

### **2.2.2 Propiedades.**

Como se trata de una planta con aceite esencial, sus propiedades medicinales corresponden a las comunes a todas estas especies; es decir, tiene propiedades sedantes, antiespasmódicas, tónicas y digestivas. También posee cualidades expectorantes, ya que se absorbe y elimina por las vías respiratorias y las descongestiona. Por estas propiedades, representa una gran utilidad en el tratamiento de la patología congestiva: rinitis y bronquitis.

Las propiedades más importantes de esta planta obedecen a la presencia del aceite esencial y especialmente a su constituyente, el mentol, que es altamente consumido con fines medicinales y culinarios.

Finalmente, el mentol de esta planta posee un efecto refrescante al aplicarse sobre la piel; por esto, calma las molestias del prurito y de las quemaduras. Aplicado sobre las sienes, también alivia la cefalea. Debido a la esencia, el poleo es

estimulante del apetito y de la digestión, antiespasmódico, colagogo, carminativo, antiséptico y parasiticida (Morton, 1987).

En uso interno está indicado en: inapetencia, digestiones lentas, espasmos gastrointestinales, meteorismos, disquinesia biliar, colecistitis, colelitiasis, jaquecas En uso externo se utiliza la esencia en disolución alcohólica o en linimentos, para fricciones estimulantes y lavar heridas (Morton; 1987)

En la industria alimenticia y confitera se utiliza en la elaboración de golosinas, comidas y bebidas. En perfumería, debido a su olor aromático y ligeramente amargo, se emplea como componente de muchos perfumes económicos y también para perfumar desodorantes, detergentes y jabones. Las hojas se utilizan como repelentes de insectos; con las secas, se preparan saquitos aromáticos.

### 2.3. Pino

**Figura 2.3:** Pino



**Fuente:** Diccionario Enciclopédico Popular Ilustrado Salvat (1974). <http://es.wikipedia.org/wiki/Internacional>; (Visitada Mayo 2010).

### 3.1 Descripción Botánica.

**Reino:** Plantae.

**Familia:** Pinaceae.

**Division:** Pinophyta.

**Genero:** *Pinus*.

**Clase:** Magnoliopsida.

**Especie:** *P. patula*.

**Orden:** Pinales.

**Nombre Binomial:** *Pinus patula*

El *Pinus patula* alcanzan alturas aproximadas de 30 m. Poseen un sistema radicular robusto, amplio y profundo (más de 6m). La copa más o menos esférica. Sus agujas colgantes le confieren una apariencia característica («pino llorón»). (Miranda, 2007). (Salvat, 1974).

La corteza es suberosa, de color grisáceo-marrón, con profundos surcos longitudinales; en un árbol maduro, esta puede constituir hasta 12% del volumen total. En sitios secos y en las tierras bajas, algunos árboles desarrollan una corteza casi completamente lisa. Las hojas aciculares están en haces de 3 a 4 y miden aproximadamente de 15 a 30 cm de largo, son colgantes y permanecen en el árbol de 2 a 4 años. Los conos son brillantes, de color gris-claro o marrón, miden de 4 a 12 cm de largo y tienen un diámetro de 2,5 a 4,0 cm. Su forma es cónica, asimétrica y torcida; se encuentran en haces de 3 a 6. Un cono contiene de 40 a 80 semillas viables, haladas y de color marrón-negruzco. (Miranda, 2007).

La composición química del pino varía en dependencia de diferentes factores como: la especie, la época del año, las condiciones de crecimiento, los factores climáticos, y el sitio. Todo ello facilita los procesos de formación y degradación de las sustancias biológicamente activas en las plantas. Los contenidos de

proteínas en *Pinus patula* están entre 9,4% y 11,8% La celulosa se encuentra se encontró valores de 29,1% y 27,9% en acículas y brotes, de la fracción foliar de *Pinus patula* (Morton, 1987).

Se señala porcentajes de lípidos en follaje de pino de 9,8% Los compuestos fenólicos se presentan en *Pinus patula* con 21,3%; el grupo de vitaminas en el follaje verde determina gran parte de su actividad biológica y la de los productos que se obtienen de él, dentro de las que se encuentran las vitaminas E, K, C, B1, B2, B6, entre otras. (Morton, 1987).

Las sustancias minerales expresadas como cenizas, contenidas en las hojas, son mayores que en las contenidas en la madera. Muchos de estos minerales se encuentran combinados con compuestos orgánicos como sales de oxalatos, fosfatos silicatos, etc., desempeñando un papel fisiológico en las plantas.

### **2.3.2 Propiedades.**

La trementina de la resina obtenida de todos los árboles de pino es antiséptica, diurética y rubefaciente. Es un valioso remedio de uso interno en el tratamiento de los riñones y las quejas de la vejiga y se utiliza tanto a nivel interno y como un masaje y baño de vapor en el tratamiento de afecciones reumáticas. También es muy beneficioso para el sistema respiratorio y así es útil en el tratamiento de las enfermedades de las membranas mucosas y problemas respiratorios tales como tos, resfrío, la gripe y [TB 4]. Externamente es un tratamiento muy beneficioso para una variedad de afecciones de la piel, heridas, llagas, quemaduras, ampollas, etc y se utiliza en forma de emplastos linimento, cataplasmas, baños de vapor con hierbas y los inhaladores. (Morton, 1987).

## 2.4 Orégano.

Figura 2.4: Orégano



**Fuente:** Diccionario Enciclopédico Popular Ilustrado Salvat (1974). [http://es.wikipedia.org/wiki/Origanum\\_vulgare](http://es.wikipedia.org/wiki/Origanum_vulgare); Internacional; (Visitada Mayo 2010).

### 2.4.1 Descripción Botánica.

**Reino:** Plantae.

**Familia:** Lamiaceae

**Division:** Magnoliophyta.

**Genero:** *Origanum*.

**Clase:** Magnoliopsida.

**Especie:** *O. vulgare*.

**Orden:** Lamiales.

**Nombre binomial:** *Origanum vulgare*.

*Origanum vulgare* es una planta vivaz (que vive más de dos años), de tallo recto, que alcanza entre 30 y 80 centímetros y no es redondo sino, curiosamente,

cuadrado, ramificado en la parte más alta, totalmente cubierto de pelusilla blanca. Posee un rizoma rastrero. La planta forma un pequeño arbusto achaparrado de unos 45 cm de alto, los tallos, que a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en la parte superior y tienden a deshojarse en las partes más inferiores. Las hojas brotan de dos en dos en cada nudo, enfrentadas, son enteras, ovaladas, acabadas en punta, también se recubren de pelusilla por ambas caras y su longitud es de hasta 4 centímetros. Poseen peciolo y aparecen cubiertas también de glándulas. Las hojas surgen opuestas, de entre 2-5 cm, con bordes enteros o ligeramente dentados. Las flores se disponen en verticilastros que forman espiguillas de hasta 3 centímetros; las flores son muy pequeñas (los pétalos no sobrepasan los 2 ó 3 milímetros de longitud), de color violeta rosado, rezuman unas gotitas de un líquido amarillento aromático. Están protegidas por bracteolas de hasta 5 milímetros, de contorno oval et alor verdoso o purpúreo. Los cálices se presentan amarillentos y las corolas son bilabiadas de color blanco, rojizo o purpúreo.

Toda la planta desprende un agradable y particular aroma. Su sabor, por contra, es amargo.

Toda la planta posee unas pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática, de color amarillo limón, compuesta por un estearopteno y dos tipos de fenoles, como mayoritario el carvacrol y en menor proporción el timol. Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas. (Miranda, 2007). (Salvat, 1974).

Sus componentes activos son: ácidos; rosmarinico (planta y hojas), palmítico, esteárico, oleico, ursólico, cafeico, capricho (planta). Aceite esencial rico en timol, cíñelo, carvacrol, borneol, beta-bisolobeno, limoneno, alfa pineno, beta pineno, mirceno, camfeno, alfa terpineno (planta). Minerales; potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, hierro (planta). Taninos (planta). Vitaminas; niacina, beta-caroteno (planta). (Morton, 1987).

#### **2.4.2 Propiedades.**

El orégano, hierba que habitualmente es empleada para condimentar comidas, es mucho más potente de lo que su aspecto muestra. Es un gran antioxidante, es altamente benéfica a la hora de pelear contra hongos y bacterias y perfecta para luchar contra la neumonía y otras enfermedades respiratorias. Lo cierto es que detrás de esta especie, se encuentran una gran cantidad de propiedades, que pueden ser magníficamente aprovechadas por el ser humano. Sus propiedades han sido ampliamente estudiadas, siendo las más importantes su actividad antioxidante. Contiene más de 30 compuestos con estas propiedades, entre ellos el timol, muy abundante también en el tomillo, el ácido rosmarínico o el carvacrol, antimicrobiana y, en estudios bastante primarios, antitumoral, antiséptica y también se la considera tónica y digestiva. Estas propiedades pueden ser muy útiles en el tratamiento de enfermedades. (Miranda, 2007).

Según estudios realizados, el orégano es una de las plantas antioxidantes más potentes que existen. De hecho, comparado con algunas frutas, tiene un efecto mucho más potente que las manzanas, las naranjas y los arándanos, algunas de las frutas con mayor capacidad antioxidante que existen. Hoy en día, el aceite de orégano esencial tiene propiedades antivirales, antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y antisépticas.

También el aceite esencial de esta planta es muy eficaz en la lucha contra los estreptococos, es decir, las bacterias que causan la neumonía y otros trastornos respiratorios. Se ha revelado que el orégano es ideal para combatir las bacterias como *E. coli*, estafilococos, *Salmonella enterica*, y *Klebsiella pneumoniae*. Investigaciones han mostrado que los aceites esenciales de orégano para ser eficaz contra 25 bacterias diferentes, asimismo sirve como fungicida. Por lo que consumir orégano en infusiones o emplear su aceite esencial en las comidas puede ser una interesante manera de mantenerte sano y luchar contra virus y bacterias.

Para uso externo, el aceite de orégano esencial es valorado como un fuerte agente analgésico y antirreumático. El aceite diluido (generalmente 5 gotas de aceite esencial en 25 gotas de aceite del portador, como jojoba), incluso se pueden frotar en un dolor de muelas.

## 2.5 Laurel.

Figura 2.5: Laurel



**Fuente:** Diccionario Enciclopédico Popular Ilustrado Salvat (1974). <http://es.wikipedia.org/wiki/Internacional>; (Visitada Mayo 2010).

### 2.5.1 Descripción Botánica.

**Reino:** Plantae.

**Familia:** Lauraceae.

**Division:** Magnoliophyta.

**Genero:** *Laurus*.

**Clase:** Magnoliopsida.

**Especie:** *L. nobilis*.

**Orden:** Laurales.

**Nombre binomial:** *Laurus nobilis*.

El laurel común es un árbol dioico siempre verde de 5-10 m de altura, de tronco recto con la corteza gris y la copa densa, oscura. Ramaje erecto. Hojas simples, alternas, lanceoladas u oblongo-lanceoladas, de consistencia algo coriácea,

aromáticas, con el borde en ocasiones algo ondulado. Ápice agudo y base atenuada. Miden unos 3-9 cm de longitud y poseen corto pecíolo. El haz es de color verde oscuro lustroso, mientras que el envés es más pálido. Flores dispuestas en umbelas sésiles de 4-6 flores. La unisexualidad de las flores es debido a un fenómeno de aborto, y prueba de ello es la presencia de 2-4 estaminodios en las flores femeninas. El fruto es drupáceo, ovoide, de 1-1.5 cm de longitud, tornándose de color negro en la madurez. (Miranda, 2007). (Salvat, 1974).

Las hojas de laurel contienen un aceite esencial cuyos principales componentes son el cineol y el eugenol, que le confieren propiedades carminativas (reducen los gases o alivian la flatulencia) y hepatoprotectoras. También se encuentran diversos ácidos orgánicos, ácidos grasos insaturados, sustancias de acción antioxidante y bactericida y minerales tales como manganeso, calcio, potasio y magnesio. Las hojas del laurel son ricas en un aceite esencial volátil compuesto en un 45% de cineol; contienen también tanino y un principio amargo. Los frutos contienen además un 25% de materias grasas formadas por ácidos láurico, oleico, palmítico y linoleico. (Morton, 1987).

### **2.5.2 Propiedades.**

El aceite esencial de laurel es un aceite esencial que posee una serie de beneficios y propiedades muy interesantes desde un punto de vista saludable y natural.

El principio activo responsable de los efectos medicinales del laurel es su aceite esencial. Aperitivo, eupéptico (facilita la digestión) y carminativo (elimina los gases del conducto digestivo). Estimula el apetito y las secreciones digestivas, así como los movimientos intestinales. Facilita la digestión, mejora o previene situaciones de pirosis o acidez, así como los espasmos intestinales. Favorece la expulsión de las mucosidades de las vías respiratorias y contiene sustancias de acción bactericida, por lo que resulta muy adecuado en caso de afecciones tales como la bronquitis, faringitis, etc. Contiene ácidos grasos insaturados, entre ellos el oleico y linoleico. Ambos ácidos grasos poseen acciones beneficiosas ya que su consumo contribuye a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, si bien la acción más destacable del laurel es a nivel del sistema digestivo. Posee una

ligera acción antiinflamatoria, contribuye a regular la menstruación en la mujer y es diurético; aumenta la producción y volumen de orina, ayudando a eliminar el exceso de líquidos del organismo. (López; 2001)

El aceite de las bayas tiene aplicaciones tópicas muy eficaces, tales como abscesos, contusiones y otras afecciones de la piel producidas por hongos. Se aplica preferentemente en forma de linimento, pomada o aceite.

Además de uso medicinal también es utilizada en la cocina, y como hierba aromática. En algunas regiones de España se utilizaba como leña en verde para el primer ahumado de los chorizos. El laurel en sí es una de las plantas culinarias más populares en toda Europa. Consumida en ensalada o en infusión, aporta interesantísimas propiedades, tales como afecciones digestivas e incluso para la histeria o contra la fiebre. El aceite esencial obtenido de los frutos ("manteca de laurel") se usaba tradicionalmente para el tratamiento de inflamaciones osteoarticulares y pediculosis. La ingesta de hojas de Laurel en grandes cantidades llega a ser tóxica. (López; 2001)

Las personas que consumen dosis altas (por ejemplo: infusiones demasiado concentradas de hojas de laurel) pueden tener náuseas, vómitos e irritación de la mucosa gástrica. Por otro lado, el laurel es una de las plantas que con mayor frecuencia produce dermatitis de contacto y fenómenos de fotosensibilización (reacciones que se producen en la piel en contacto con la luz del sol). Además, su uso está desaconsejado en caso de gastritis y úlcera, así como en ciertas enfermedades que afectan al intestino y en personas que tienen el estómago delicado.

## 2.6 Hierva Luisa.

Figura 2.6: Hierva Luisa



**Fuente:** Diccionario Enciclopédico Popular Ilustrado Salvat (1974). <http://es.wikipedia.org/wiki/Internacional>; (Visitada Mayo 2010).

### 2.6.1 Descripción Botánica.

**Reino:** Plantae.

**Familia:** Poaceae

**Division:** Magnoliophyta.

**Genero:** *Cymbopogon*.

**Clase:** Liliopsida

**Especie:** *C. citratus*

**Orden:** Poales

**Nombre binomial:** *Cymbopogon citratus*

Nombre común o vulgar: Hierba Luisa, Hierbaluisa, Verbena de olor, Reina Luisa, Verbena olorosa. Herbácea denominada mide de 60 a 120 cm de altura. Hierba perenne, robusta, tallos muy ramificados de 1 a 2 m de alto con los nudos ceríferos. Hojas aromáticas (con aroma alimonado), agrupadas cerca de la base, lineares, de hasta casi 1 m de longitud, con el borde cortante, lampiña, glaucas, de 6 a 10 dm, sus ramas alargadas y un tanto penduladas. Las espiguillas en pares, una sésil y la otra pedicelada; los racimos bifurcados, portando en la bifurcación una espiguilla estaminada sin arista, la espiguilla sésil, del par o los pares inferiores diferentes de las de arriba. Racimos de 1 a 1,5 cm de largo, la espiguilla sésil línea lanceolada de 4 a 5 cm de largo acuminada con el dorso cóncavo en la parte baja. No florece o lo hace muy rara vez. (Miranda, 2007). (Salvat, 1974).

En una planta de *C. citratus* desarrollada pueden encontrarse hojas cuyas longitudes varían desde 22 cm hasta 82 cm y la mayor proporción se encuentra entre los rangos de 34 a 46 cm, 58 y 70 cm. El mayor porcentaje de raíces se encuentra hasta los 0,30 m de profundidad en el suelo. En la distribución horizontal y para las distancias entre las hileras de las plantas de 0,90 m, la mayor proporción de raíces se halla a los 22,5 cm a partir del eje central del plantón. Las hojas no son realmente lampiñas pues a lo largo de los nervios se encuentran cerdas que le comunican cierta aspereza que se acentúa en las hojas secas, en los bordes, estas cerdas se lubrican y al tacto se sienten como el filo de un serrucho.

El color de las hojas es variable en cuanto al tono del verde en dependencia de donde se desarrolla, a veces se percibe un aspecto ceniciento. A plena exposición solar las hojas pueden presentar tonalidades violáceas que denotan la presencia de pigmentos antocianos. El aceite esencial contiene altos contenidos de citral (75-85 %), además de geraniol, linalol, metilheptona, citronelal, limoneno, diterpeno y otras sustancias. (Morton, 1987).

### **2.6.2 Propiedades**

Toda la planta, y sobre todo las hojas, son ricas en un aceite esencial compuesto por más de cien sustancias entre las que destaca el citral, el limoneno y el cariofileno. Esta esencia le confiere propiedades digestivas, antiespasmódicas y

carminativas (favorece la expulsión de gases del aparato digestivo). La hierba luisa se halla indicada en los siguientes casos; dispepsias agudas (empacho o indigestión) y crónicas (digestiones pesadas) y flatulencias, dolores menstruales (dismenorrea), cólicos biliares y renales, por su acción antiespasmódica. Se halla indicada en diferentes tipos de alteraciones nerviosas, especialmente en caso de ansiedad, ya que en muchos casos consigue mejores resultados que algunos tranquilizantes químicos, con la ventaja de no tener los efectos secundarios de estos fármacos. Son muchas las utilidades que podemos encontrar en la hierba luisa, infusiones, licores, perfumería, etc. (López; 2001)

Científicos japoneses han demostrado con pruebas *in vitro* que los aceites extraídos de la hierba limón tienen buen potencial como terapia alternativa para erradicar la *Helicobacter pylori*. Se han realizado pruebas en roedores y han encontrado que el aceite en altas dosis es dañino, pero en uso terapéutico no genera toxicidad.

## **2.5 Actividad biológica de aceites esenciales y extractos vegetales de las especies en estudio.**

El uso de las plantas con fines curativos se remonta a muchos años atrás y guarda relación con la flora existente en cada territorio. Los extractos de plantas se han usado desde la antigüedad para el tratamiento de distintas enfermedades. (Shiva, 2007).

Los principales extractos vegetales con actividad antimicrobiana son los aceites esenciales y las oleorresinas. Los extractos naturales se obtienen directamente de las plantas y no sufren transformaciones posteriores, por ello su rendimiento es bajo y continúan siendo costosos. Se extraen de las partes no leñosas de las plantas, en especial de las hojas, mediante diferentes métodos: extrusión, destilación por arrastre con vapor de agua (más usada a nivel comercial), extracción con solventes volátiles y con fluidos supe críticos. Se encuentran en estructuras histológicas especializadas, localizadas sobre o cerca de la superficie de la planta.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, son mezclas complejas de hasta 100 componentes, entre ellos: terpenoides, fenoles aromáticos, éteres, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma característico de la planta donante. Algunos de los componentes fenólicos de los aceites esenciales son clasificados como GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized as Safe) lo que potencia su uso (Morton, 1987).

Los aceites esenciales de han mostrado en varios trabajos propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias e insecticidas (Burt, 2004).

Las oleorresinas son líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas. Constituyen las verdaderas esencias de las especias en su forma más concentrada y contienen gran variedad de compuestos volátiles y no volátiles. Además son los sustitutos preferidos de las especias tradicionales en las industrias de alimentos (Ponce et al, 2008).

Algunas de las aplicaciones por su actividad biológica son:

Aumento de la vida útil en alimentos: Hierbas aromáticas y especias han sido utilizadas durante siglos para condimentar los alimentos, pero también como preservantes. El aceite esencial y las oleorresinas obtenidas son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos y por sus propiedades medicinales. La actividad antimicrobiana y las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales y las oleorresinas se atribuyen a la presencia de componentes fenólicos.

El desarrollo de tecnologías no tradicionales de preservación de alimentos, donde se busca la conservación del alimento manteniendo sus características originales, dio paso a la aplicación combinada de distintos métodos (tecnología de obstáculos). La adición de extractos vegetales naturales tiene aquí un campo de estudio prometedor.

El enriquecimiento con aceites esenciales u oleorresinas en la tecnología de películas comestibles en los alimentos permite la lenta liberación del agente antimicrobiano prolongando así su acción. Se ha investigado la susceptibilidad *in vitro* de la micro flora nativa de algunos productos cárnicos y *Listeria*

*monocytogenes* a la aplicación de películas comestibles enriquecidas con varias oleorresinas.

Muchos estudios realizados *in vitro* informan la eficiencia de los aceites esenciales y las oleorresinas como antimicrobianos o antioxidantes naturales (Morton, 1987)

Sin embargo, *in vivo* suelen requerirse mayores concentraciones de los extractos para obtener resultados similares a los estudios *in vivo*. Para que el uso de aceites esenciales y oleorresinas pueda ser aplicado exitosamente a escala comercial como antibacterianos, el impacto sensorial sobre el alimento debe ser tenido en cuenta y minimizado. En general, la eficacia de los extractos puede verse afectada por ciertos componentes de los alimentos. Se cree que altos niveles de grasas y/o proteínas en el alimento protegen a las bacterias de la acción de los extractos (Moreira *et al.*, 2007).

También la mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos, comparada con la disponible en los medios de laboratorio, puede favorecer la reparación de las células microbianas dañadas por principios activos de los aceites. No sólo deben tenerse en cuenta las propiedades intrínsecas del alimento, sino también las extrínsecas, tales como temperatura, características de los microorganismos, etc. Es importante analizar la influencia de estos factores en la actividad antimicrobiana de los extractos propuestos para determinar las condiciones óptimas de aplicación (Gutierrez *et al.*, 2008).

Insecticidas naturales: La búsqueda de sustancias naturales que permitan desarrollar nuevas estrategias para controlar y eliminar insectos es necesaria debido al aumento en la resistencia desarrollada por estos a los insecticidas sintéticos y el problema que generan por ser no biodegradables y contaminantes. La mayoría de las plagas en los cultivos es controlada biológicamente a través de la actividad de aves, enfermedades, otros microorganismos, etc. De hecho, el control natural de las plagas, no sólo permite minimizar el uso de químicos,

proteger los cultivos sino que también permite el ahorro de dinero (Batish *et al.*, 2008)

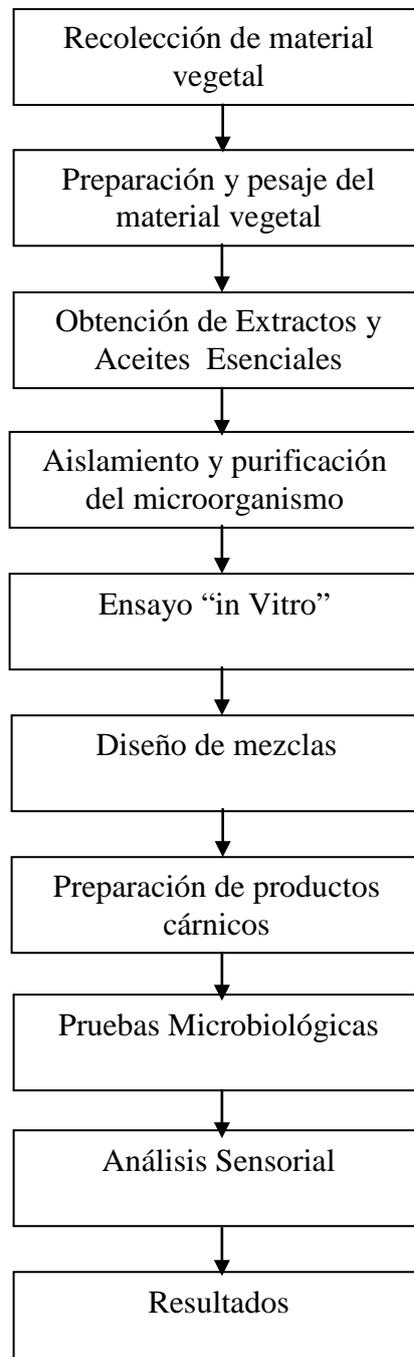
Uso como promotores de crecimiento en animales: La inclusión de un agente antimicrobiano en el pienso tiene como objetivo la prevención de desordenes digestivos, incrementar el consumo de alimentos y mejorar el estado de salud general del animal, factores que se traducen en ganancia de peso. Es deseable reducir la cantidad de antibióticos suministrada a los animales debido a los riesgos de desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos, en especial aquellas que presenten riesgos para la salud humana. El uso de extractos vegetales se presenta como una alternativa al empleo masivo de antibióticos. Si bien el uso de aceites esenciales como aditivo en el pienso aún no está generalizado, estudios presentados en los últimos 5 años, indican que mejoran la digestibilidad y reducen la proliferación de microorganismos (Shiva 2007).

También tienen como ventaja la reducción en el costo y el factor positivo desde el punto de vista del consumidor que exige productos más naturales.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Esquema de Actividades



### 3.2 Recolección de material vegetal

Las especies vegetales evaluadas según la capacidad antilisterial de sus aceites esenciales se adquirieron en mercados locales en gran cantidad. Se seleccionaron las partes aéreas de las especies en estudio, desechando material vegetal seco o con síntomas de enfermedades. Finalmente se pesó la materia prima para obtener su rendimiento.

Se utilizaron partes aéreas frescas de las siguientes especies vegetales:

- Romero (*Rosmarinus officinalis*).
- Orégano (*Origanum vulgare*).
- Menta (*Mentha pulegium*).
- Pino (*Pinus patula*).
- Laurel (*Laurus nobilis*).
- Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*).

### 3.3 Preparación de extractos y aceites esenciales

#### 3.3.1 Obtención de extractos vegetales

##### 3.3.1.1 Equipo

- Rotavapor
- Balanza

##### 3.3.1.2 Materiales

- Fuente de calor
- Balón de 500ml fondo plano y cuello esmerilado
- Soxhlet
- Refrigerante
- Mangueras de refrigeración
- Pinza 3 dedos

- Nudo para pinza
- Soporte universal
- Cartucho (papel filtro)
- Engrapadora
- Tijeras
- Balón de 1000 ml fondo redondo y cuello esmerilado

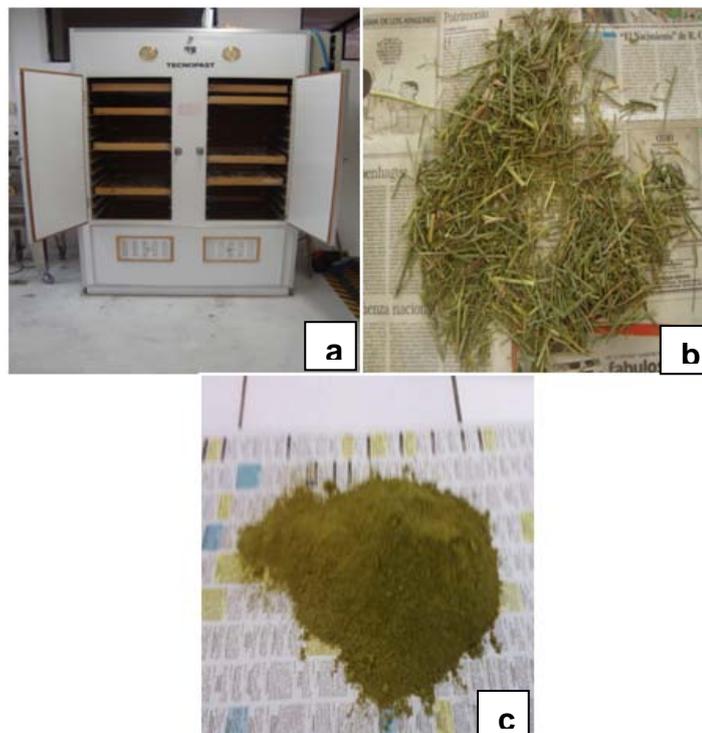
### 3.3.1.3 Sustancias

- Solvente (Metanol 96%)

### 3.3.1.4 Procedimiento

Para la obtención de los extractos de las especies en estudio se separaron las hojas del tallo y luego se procedió a secar en el secador del laboratorio de farináceos de la UDA por un periodo de 24h a una temperatura de 40°C. Posteriormente, las hojas secas fueron molidas y pulverizadas.

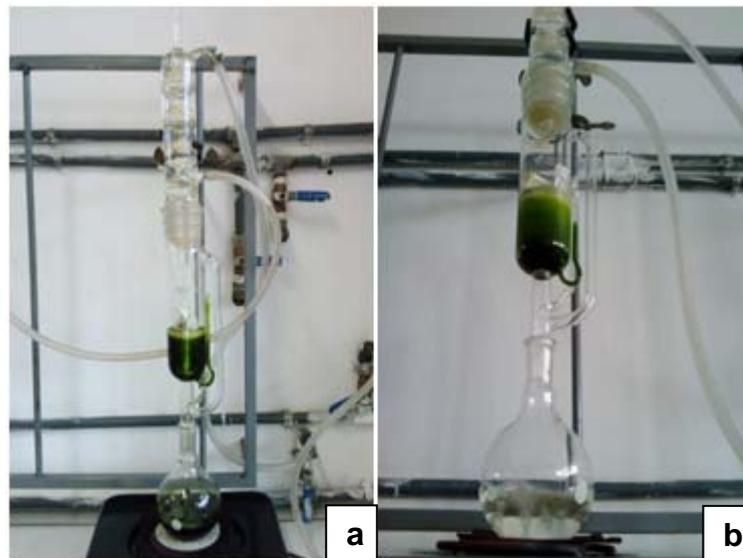
**Figura 3.1.** Imágenes de preparación vegetal para obtención de extractos vegetales; **a:** secador del laboratorio de farináceos de la Universidad del Azuay **b:** material vegetal seco y seleccionado Hierba luisa (*C. citratus*). **c:** material vegetal molido y listo para proceso. **Fuente:** Autor



La obtención de extractos vegetales se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay. La extracción se realizó por el método continuo de Soxhlet, cuyo procedimiento se detalla a continuación.

El material vegetal seco y pulverizado es pesado y colocado en un cartucho de papel filtro, el cual se introduce en el extractor Soxhlet. El equipo de reflujo se ensambla, y en el balón de 500 mL se coloca un volumen adecuado de solvente (de 300 a 400 mL). El solvente llega a temperatura de ebullición con la ayuda de la fuente de calor y se desarrolla el proceso de extracción mediante el reflujo del solvente, el cual se condensa en el refrigerante del equipo. La extracción se desarrolla durante 10 reflujos del solvente a través del cartucho, lo cual sucede en un tiempo aproximado de 2 horas.

**Figura 3.2.** Imágenes del equipo para método continuo Soxhlet. Equipos de la universidad del Azuay; Laboratorio de Bioquímica **a:** vista frontal **b:** vista desde abajo

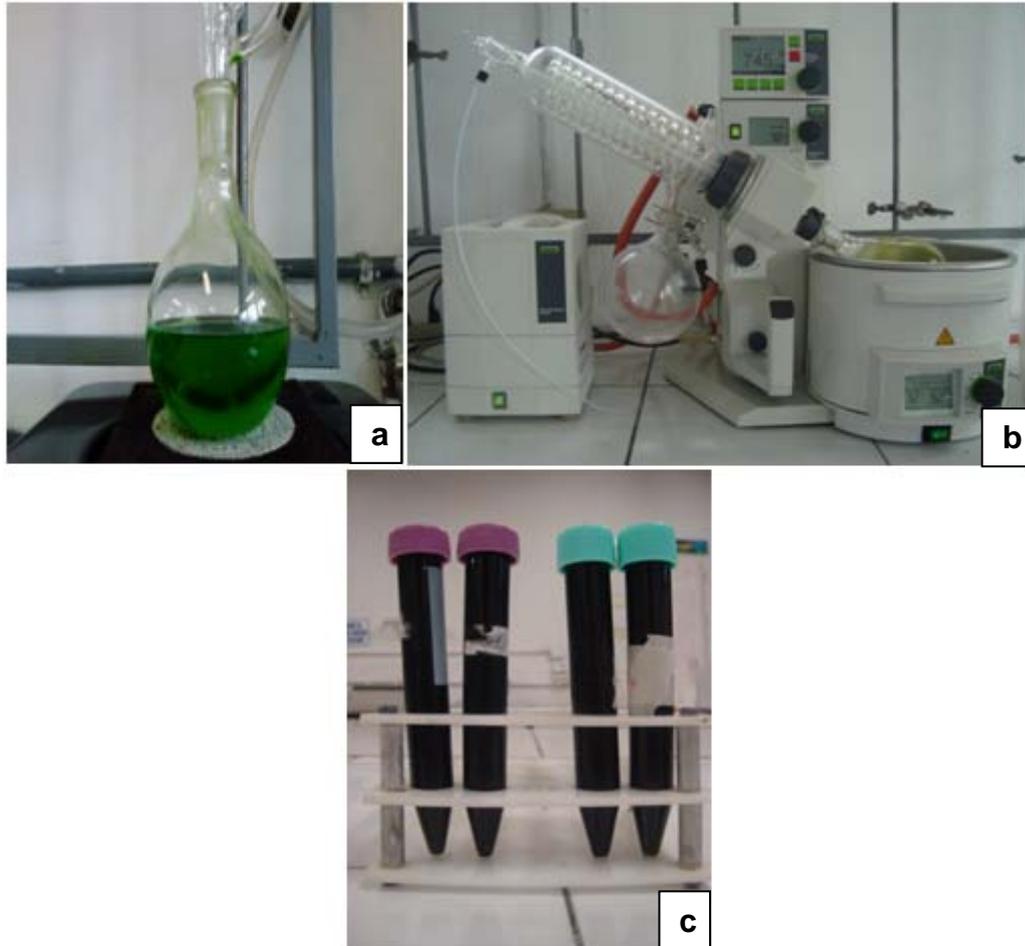


**Fuente:** Autor

Una vez que se ha obtenido el extracto metanólico éste es concentrado en el rotavapor. Esta operación fue realizada en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad del Azuay. La mezcla de metanol y extracto obtenida anteriormente por el método Soxhlet es colocada en un balón de 1000cc de fondo redondo y cuello esmerilado, este balón es acoplado al evaporador rotatorio (Presión 774mbar, Temperatura = 52°C, 90 rpm. Esta operación se efectúa hasta eliminar

completamente el solvente del balón. Una vez obtenido el extracto es transferido a un tubo de plástico y almacenado en un lugar oscuro, seco y limpio.

**Figura 3.3.** Imágenes de obtención de extractos naturales; **a:** extracto metanólico **b:** rotavapor del laboratorio de fitopatología de la Universidad del Azuay. **c:** extractos vegetales obtenidos.



**Fuente:** Autor

### **3.3.2 Obtención de aceites esenciales por el método de destilación por arrastre de vapor.**

#### **3.3.2.1 Equipo.**

- Equipo extractor de aceites esenciales marca Albrigi Luigi (Italia).
- Fuente de calor
- Refrigerante
- Mangueras de caucho
- Erlenmeyer
- Decantador
- Frascos de vidrio color ámbar
- Balanza

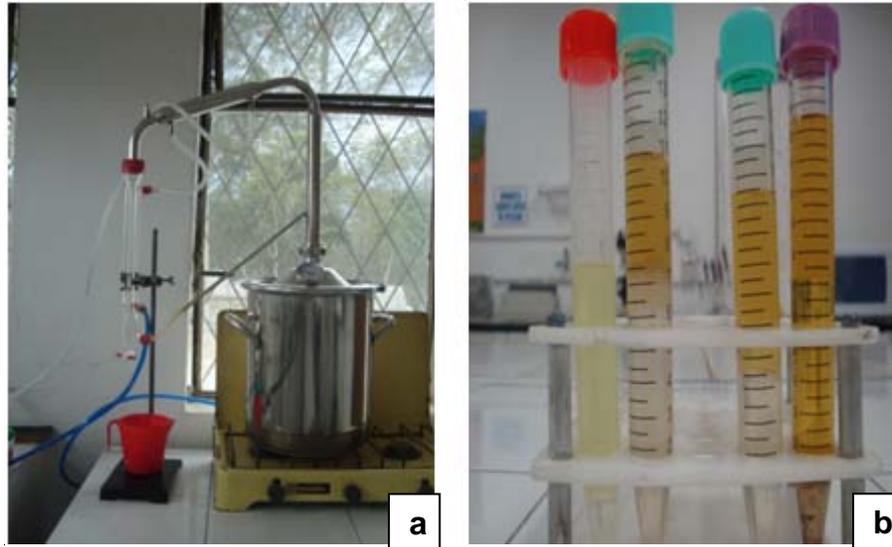
#### **3.3.2.2 Sustancias**

- Solvente (Agua)

#### **3.3.2.3 Procedimiento**

Todas las especies se procesaron en fresco. Se separaron las hojas verdes de los tallos del material vegetal y se redujeron a pequeños pedazos para facilitar la extracción. Finalmente se pesó la materia prima para obtener su rendimiento. El procesamiento del material vegetal para obtener aceites esenciales se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la UDA. El equipo utilizado extrae aceites esenciales por el método de arrastre de vapor. Para el procesamiento se arma el equipo de manera correcta evitando que existan fugas entre las uniones. Se colocan aproximadamente 4 litros de agua en un contenedor de acero inoxidable. Se procesa alrededor de 1kg de material vegetal previamente seleccionado. Se tapa el equipo el mismo que posee un sistema de reflujo para condensar el aceite esencial. Los productos de la destilación son separados por densidad en el decantador. El proceso de extracción inicia cuando el sistema alcanza la temperatura de ebullición del agua (92°C a 2500 msnm) y dura un aproximado de 30 minutos. El aceite esencial obtenido fue colectado en frascos ámbar para protegerlo de la degradación por la luz solar.

**Figura 3.4.** Imágenes de obtención de aceites esenciales; **a:** Equipo extractor de aceites esenciales marca Albrigi Luigi (Italia) del laboratorio de fitopatología de la Universidad del Azuay **b:** aceites esenciales obtenidos



Fuente: Autor

### 3.3.3 Obtención de aceite de orégano

#### 3.3.3.1 Equipo

- Rotavapor
- Balanza

#### 3.3.3.2 Materiales

- Balón de 500ml fondo redondo
- Soporte universal
- Uniones
- Codo de cristal
- Refrigerante
- Manto calefactor
- Mangueras de caucho
- Pinzas 3 dedos

- Nudos para pinzas
- Erlenmeyer
- Balón de separación
- Espátula
- Vaso de precipitación
- Varilla de cristal
- Papel filtro
- Embudo
- Soporte para embudo
- Balón de 1000cc de fondo redondo y cuello esmerilado
- Frascos de vidrio color ámbar

### 3.3.3.3 Sustancias

- Agua
- Cloruro de sodio
- Diclorometano
- Sulfato de magnesio

### 3.3.3.4 Procedimiento

El aceite esencial fue obtenido a partir de hojas de orégano secas. Se ensambló un equipo extractor a escala de laboratorio. En un balón de fondo redondo se colocó el material vegetal, y se acopló con conectores de vidrio un refrigerante, con el fin de condensar la mezcla aceite –agua a obtener de la destilación. Se aseguró cada unión con un sujetador plástico para evitar que se proyecte el vapor hacia el exterior.

La mezcla aceite – agua colectada luego del proceso de extracción fue recolectada en un matraz. Para favorecer la separación del aceite se adicionan 4 – 6 g de NaCl (efecto salting – out). Posteriormente, la mezcla se coloca en un balón de separación, se adicionan 200cm<sup>3</sup> de diclorometano, y se procede a la separación. Se puede observar la formación de dos fases, y se colecta la fase orgánica en un matraz de 500cm<sup>3</sup>. A la fase orgánica se adiciona una punta de espátula del desecante sulfato de magnesio, con el fin de eliminar residuos de agua. La mezcla

se deja en reposo por 4 horas. Transcurrido este tiempo, se procede a filtrar en un balón de fondo redondo. El diclorometano es eliminado en el rotavapor y se obtiene el aceite, el cual es colocado en un frasco de vidrio color ámbar y al resguardo de la luz.

**Figura 3.5.** Imagen de rotavapor del laboratorio de fitopatología de la Universidad del Azuay (vista superior) durante la concentración del aceite esencial de orégano.



**Fuente:** Autor.

### **3.4 Aislamiento y purificación del microorganismo de prueba**

#### **3.4.1 Equipos y materiales utilizados para el desarrollo de técnicas microbiológicas**

- Balanza
- Vortex (agitador).
- Autoclave
- Estufa
- Espátula
- Matraz
- Tubos para cultivo
- Probeta
- Gradillas
- Canastilla para autoclave

### **3.4.2 Obtención de *Listeria monocytogenes* a partir de muestras del Camal Municipal de Cuenca**

#### **3.4.2.1 Medios de cultivo para el aislamiento de *L. monocytogenes***

- Cultivo (Listeria Fraser Broth, cultivo selectivo para *Listeria*)
- Agua destilada

#### **3.4.2.2 Procedimiento**

- Se pesan 27.5g de cultivo (Listeria Fraser Broth), y se disuelven en 500 cm<sup>3</sup> de agua destilada. La mezcla es repartida en tubos tapa rosca de 10 cm<sup>3</sup>.
- Los tubos son autoclavados por 15 minutos a 121°C y 1,5 atm.
- Cinco tubos fueron inoculados con hisopos de algodón, empapados de muestras tomadas del Camal Municipal de la ciudad de Cuenca, las cuales presuntamente contenían *L. monocitogenes*.
- Estos tubos fueron colocados en una estufa a 37°C por 24h, para evaluar la presencia de *L. monocitogenes*.

### **3.4.3 Aislamiento y purificación de *Listeria monocytogenes***

#### **3.4.3.1 Medios de cultivo utilizados**

- Medio de Cultivo (Agar base para *Listeria*)
- Listeria Supplement®
- Agua destilada

#### **3.4.3.2 Procedimiento**

- Se pesan 13g de medio de cultivo, y se aforan a 250 cm<sup>3</sup>. Posteriormente el cultivo fue autoclavado por 15 minutos, a 121°C y 1,5 atm. Posteriormente el medio fue enfriado a 45°C y mezclado con Listeria Supplement®; el reactivo revelador de las colonias de *Listeria*.
- El medio de cultivo fue repartido en cajas petri, las cuales fueron dejadas

en reposo en la cámara de flujo laminar hasta que se solidifique el medio.

- Se realizaron repiques a partir de los tubos que dieron positivo en el procedimiento descrito en 3.4.2.2 Las cajas petri inoculadas con *L. monocitogenes* fueron transportadas a una estufa a 37°C por 24h, para obtener las colonias bien definidas de un color verde azulado.

### **3.4.4 Verificación de género y especie mediante características culturales de *L. Monocytogenes* en agar sangre**

#### **3.4.4.1 Medios de cultivo y sustancias utilizadas**

- Agar Base
- Agua destilada
- Sangre desfibrilada

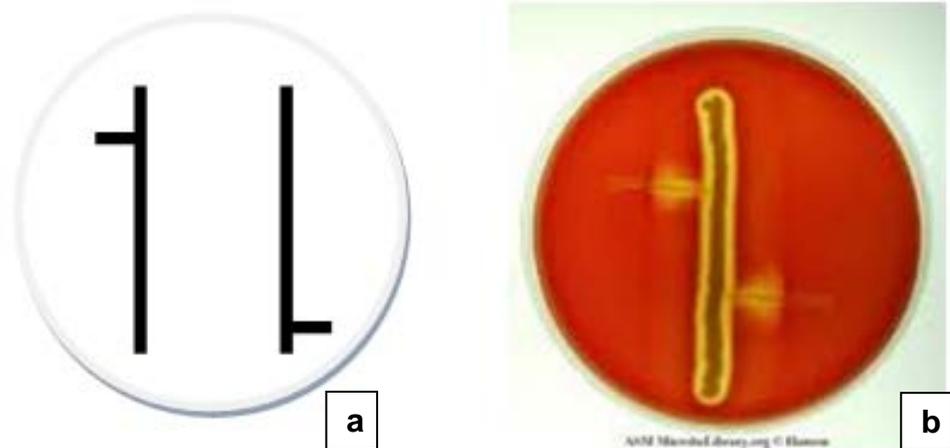
#### **3.4.4.2 Procedimiento**

- Fueron pesados 4g de medio de cultivo (Agar Base) los mismos que se aforaron y mezclaron a 100 cm<sup>3</sup>.
- El medio fue autoclavado por 15 minutos (T° = 121°C, P= 1,5 atm), luego fue enfriado a 37°C y mezclados con 15 cm<sup>3</sup> de sangre desfibrilada.
- El agar sangre fue repartido en cajas petri y dejado reposar en la cámara de flujo laminar hasta que se solidifique el medio.
- Con un asa se sembró en forma de 2 líneas paralelas el microorganismo en las cajas petri con agar sangre, desde los cultivos obtenidos según lo descrito en 3.4.3.2 Luego se inocula; de manera transversal a las líneas paralelas; con *S. aureus*. La manera de sembrar las bacterias en el medio es explicada en la figura 3.6
- Se colocó las cajas petri inoculadas con *L. monocitogenes* y *S. aureus* en una estufa a 37°C por 24 horas, para obtener un patrón de crecimiento de las colonias bien definido y de esta manera comprobar que la bacteria es *L. monocitogenes*, mediante la diferencia de las hemólisis en el agar sangre producida por las bacterias. Dicha identificación se realiza mediante la capacidad de producir hemólisis, característica esencial para distinguir *L.*

*monocytogenes* de *L. innocua* (que es la especie no patógena aislada con más frecuencia). *L. monocytogenes*, produce una estrecha zona de hemólisis, a veces limitada al diámetro de la colonia y es hemolítica en agar sangre, esta propiedad está relacionada con su patogenia.

*L. monocytogenes*, aumentan la hemólisis producida por *S. aureus* hemolítico.

**Figura 3.6.** Imágenes de **a:** Manera de sembrar *L. monocytogenes* y *S. aureus* en agar sangre. **b:** forma de crecimiento de los microorganismos.



**Fuente:** BROOKS G.F, J. BUTEL, S. MORSE. (2002). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg; 17ta Edición; Editorial El Manual Moderno.

### 3.4.5 Mantenimiento de *Listeria monocytogenes*

#### 3.4.5.1 Medios de cultivo y sustancias

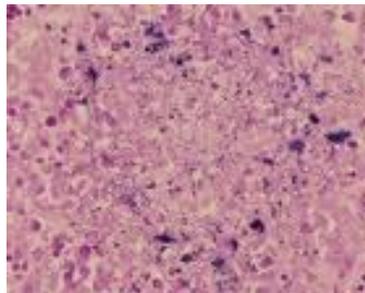
- Agar Nutritivo
- Agua destilada

#### 3.4.5.2 Procedimiento

- Fueron pesados 2.3g de medio de cultivo, los mismos que se aforaron y mezclaron con 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada.

- El medio fue autoclavado por 15 minutos ( $T^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 1,5 \text{ atm}$ ). Luego fue repartido en cajas petri y dejado en reposo en la cámara de flujo laminar hasta que se solidifique.
- Con un asa se sembró el microorganismo en las cajas petri con agar de mantenimiento desde las cajas obtenidas según el procedimiento descrito en 3.4.3.2 El microorganismo fue sembrado en cuadrícula, con el fin de obtener colonias aisladas. Las condiciones de crecimiento fueron  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h
- Con el objeto de realizar los ensayos “in Vitro” y la inoculación a los productos cárnicos, se realizó una tinción de Gram, para comprobar que la bacteria obtenida fue *L. monocitogenes*.

**Figura 3.7.** Imagen de *L. monocitogenes* tinción de Gram vista al microscopio.



**Fuente:** BROOKS G.F, J. BUTEL, S. MORSE. (2002). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg; 17ta Edición; Editorial El Manual Moderno, México.

### **3.5 Puesta a punto de ensayo “in Vitro” para extractos y aceites puros.**

#### **3.5.1 Preparación de inóculo para el bioensayo**

##### **3.5.1.1 Equipo**

- Balanza
- Vortex (agitador).
- Autoclave
- Estufa

- Cámara de flujo laminar

### 3.5.1.2 Materiales

- Espátula
- Matraz
- Frasco para cultivo
- Tubos para cultivo
- Probeta
- Pipeta automáticas

### 3.5.1.3 Sustancias

- Agua destilada
- Peptona de caseína
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio

### 3.5.1.4 Procedimiento

- Se formuló un medio de cultivo líquido mezclando 2 g de peptona de caseína, 0.75g de extracto de levadura y 0.25g de cloruro de sodio. Luego fueron aforados y mezclados a 250 cm<sup>3</sup> con agua destilada.
- Este medio fue autoclavado por 15 minutos ( $T^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 1,5 \text{ atm}$ ) y enfriado.
- Se transfirió asépticamente una colonia de *L. monocytogenes* a dos tubos con el medio de cultivo líquido, descrito anteriormente. Los tubos inoculados fueron incubados en una estufa a 37°C por 24h, para obtener biomasa suficiente y viable para el desarrollo de la prueba “in Vitro”.

### **3.5.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos vegetales ante *L. monocytogenes*. Ensayo “in Vitro”.**

#### **3.5.2.1 Equipo**

- Estufa
- Cámara de flujo laminar
- Vortex (Agitador)
- Balanza.

#### **3.5.2.2 Materiales**

- Vaso de precipitación
- Cajas petri de vidrio
- Pipeta automáticas
- Placa de microdilución de 96 pocillos
- Tubos Eppendorf
- Espátula
- Varilla de cristal

#### **3.5.2.3 Sustancias**

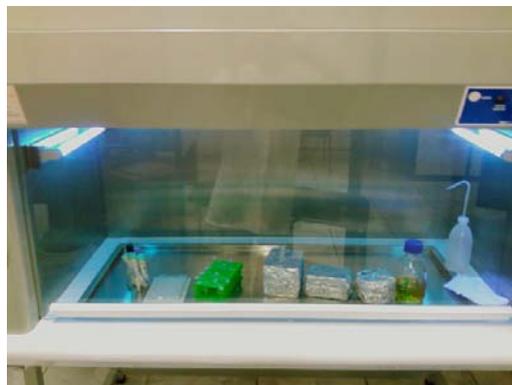
- Alcohol etílico
- Medio de cultivo líquido (3.5.1.)
- Inóculo de *L. monocytogenes* (3.5.1)
- Muestras de aceites esenciales
- Muestras de extractos vegetales
- Agua destilada
- MTT (metil tiazolil tetrazolium)

### 3.5.2.4 Procedimiento

- Preparación de soluciones de trabajo.
  - Las soluciones de trabajo de los aceites esenciales fueron preparadas siguiendo el proceso que se describe a continuación: se colocaron 500µl de medio de cultivo en 4 tubos eppendorf. Luego se colocó en cada tubo eppendorf 500µl de los diferentes aceites esenciales de las especies vegetales en estudio. De esta manera se preparó una dilución 1:1 de medio de cultivo y aceite. La mezcla fue homogenizada con la ayuda del vortex.
  - Las soluciones de trabajo de los extractos vegetales fueron preparadas mediante el siguiente proceso: Se pesó 0.5g de extracto vegetal y se colocó en un tubo eppendorf. Luego se agregó 500µl de agua destilada y se homogenizó. Una vez obtenida esta disolución; peso volumen 1:1; son colocados 200µl más 800µl de medio de cultivo líquido en tubos eppendorf obteniendo una disolución 1:5.

El trabajo fue realizado en condiciones de esterilidad. Todos los bioensayos fueron realizados por triplicado.

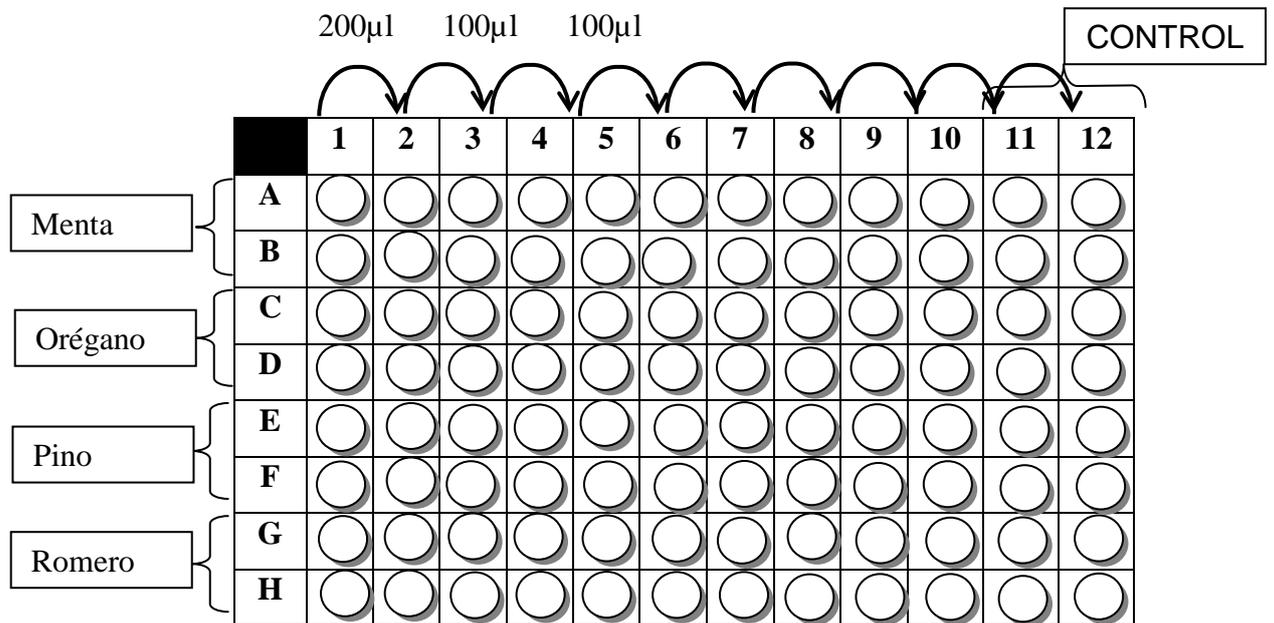
**Figura 3.8.** Imagen de la cámara de flujo laminar con material para esterilizar en el laboratorio de investigación de la Universidad del Azuay.



**Fuente:** Autor.

- El bioensayo fue desarrollado en la placa de microdilución de 96 pocillos. Esta placa consta de 8 filas y 12 columnas. La columna 11 fue llenada con 200µl de medio líquido en cada pocillo. En esta columna se verificó la esterilidad del bioensayo (control de medio).
- En la columna 12 se colocó una dilución 1:1 del inóculo con medio de cultivo (volumen final 200 µl). En esta columna se verificó la viabilidad de la bacteria en las condiciones del bioensayo (control de crecimiento).
- Se transfirió a las columnas 2 -10, 100 µl de medio de cultivo líquido.
- Los aceites esenciales y extractos evaluados en el bioensayo fueron distribuidos según el siguiente esquema:
  - Filas A y B: Aceite / extracto de menta
  - Filas C y D: Aceite / extracto de orégano
  - Filas E y F: Aceite / extracto de pino
  - Filas G y H: Aceite / extracto de romero.
- Las soluciones de trabajo de los aceites esenciales o extractos vegetales evaluados fueron transferidas a la columna 1 (200 µl). Se colocaron 100 µl de medio de cultivo líquido en todos los pocillos desde la columna 2 hasta la columna 10. A partir de la columna número 2 se realizaron las microdiluciones, depositando 100 µl de solución desde la columna 1 a la columna 2. Este proceso se repitió hasta llegar a la columna 10. De esta manera se obtuvo un rango de dilución desde 1:1 hasta 0.002:1. Para finalizar se colocó 100µl de inóculo con *L. monocitogenes* en cada pocillo desde la columna 1 hasta la columna 10. Se transportó la placa a una estufa a 37°C por 24 horas para poder revelar la placa y observar resultados.
- Para una mejor comprensión de este procedimiento véase el siguiente gráfico.

Gráfico 3.1. Imagen para preparar bioensayo.

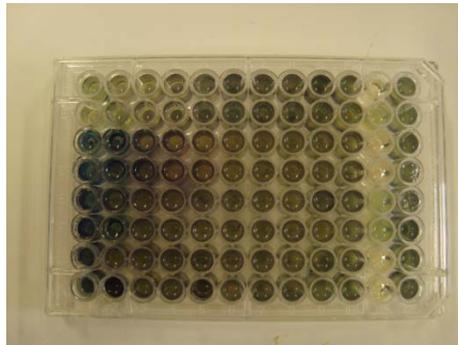


Fuente: Autor

### 3.5.2.5 Procedimiento para la revelación de resultados del ensayo “in Vitro”

- Se pesó 0.004g de MTT y se colocó en un vaso de precipitación de 50ml. Luego se agregó 5cm<sup>3</sup> de agua destilada y se homogenizó.
- De la solución anterior se colocó 20µl en cada pocillo; de cada fila y columna exceptuando la columna 11 que es el control de medio.
- Se puso la placa 30 minutos en la estufa y se vio el resultado. Si el MTT cambia de amarillo a azul oscuro la bacteria está viva.

**Figura 3.9.** Imagen de revelación de resultados del ensayo “in Vitro”



**Fuente:** Autor

Como observación en este punto se agrega que los aceites esenciales y extractos naturales de Laurel y Hierba luisa fueron evaluados en placas diferentes a las otras especies en estudio, debido al espacio de las placas. (Eloff, 1998; Cazar, 2006)

### **3.6 Diseño de Mezclas**

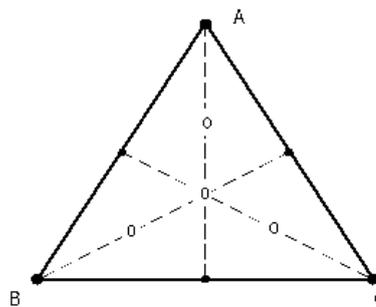
Esta estrategia nos permite conocer cuál es la mejor combinación en las proporciones de los componentes de una mezcla (aceite o extracto) que otorga el valor mínimo o máximo de una determinada respuesta (actividad antilistelial).

En un diseño la suma de todos los componentes es el 100%. Los factores de mezcla son expresados como fracciones de la cantidad total. Los rangos experimentales se hallan entre cero y uno, es decir, que no puede ser cambiado total e independientemente uno de otro. En dependencia del tipo de preparación es posible considerarlo como un componente. Los diseños más comunes de mezclas son: simplex lattice, simplex-centroide y simplex aumentado. El diseño simplex lattice para modelos cuadráticos ( $m=2$ ) incluye mezclas binarias cuyas coordenadas corresponden a los puntos medios en las líneas que conectan los vértices para estimar efectos no lineales. Un estudio más completo puede realizarse aumentando el modelo simplex centroide con puntos adicionales conocidos axiales. Estos puntos incluyen los tres componentes y están localizadas

a una distancia  $d = 2/3$  desde el centroide en el radio que lo conecta con estos vértices.

Un diseño típico para una mezcla de 3 componentes, es el centroide simplex aumentado. El diseño centroide simplex aumentado es un diseño de mezclas con 6 puntos espaciados en el perímetro, un adicional de 3 puntos axiales localizados en el interior a medio camino entre el centroide y los vértices y 1 punto en el centroide. (Lundstedt *et al.*, 1998)

**Gráfico 3.2.** Diseño simplex aumentados para tres componentes



**Fuente:** Autor.

Las mezclas de aceites esenciales y extractos naturales evaluados se formularon siguiendo un diseño de mezclas Simplex Aumentado. Se realizó un esquema que se evaluó con un modelo cuadrático, probando diez mezclas de los seis aceites esenciales y extractos naturales en estudio. Las respuestas para evaluar la eficiencia de estas mezclas serán el recuento de microorganismos luego de un tiempo de conservación.

**Tabla 3.1.** Diseño de mezclas Simplex Aumentado

|           | <b>Orégano</b> | <b>Laurel</b> | <b>Hierba<br/>Luisa</b> |
|-----------|----------------|---------------|-------------------------|
| <b>1</b>  | <b>100%</b>    | <b>0</b>      | <b>0</b>                |
| <b>2</b>  | <b>0</b>       | <b>100%</b>   | <b>0</b>                |
| <b>3</b>  | <b>0</b>       | <b>0</b>      | <b>100%</b>             |
| <b>4</b>  | <b>50%</b>     | <b>50%</b>    | <b>0</b>                |
| <b>5</b>  | <b>0</b>       | <b>50%</b>    | <b>50%</b>              |
| <b>6</b>  | <b>50%</b>     | <b>0</b>      | <b>50%</b>              |
| <b>7</b>  | <b>33%</b>     | <b>33%</b>    | <b>33%</b>              |
| <b>8</b>  | <b>16.5%</b>   | <b>16.5%</b>  | <b>66%</b>              |
| <b>9</b>  | <b>16.5%</b>   | <b>66%</b>    | <b>16.5%</b>            |
| <b>10</b> | <b>66%</b>     | <b>16.5%</b>  | <b>16.5%</b>            |

**Fuente:** Autor

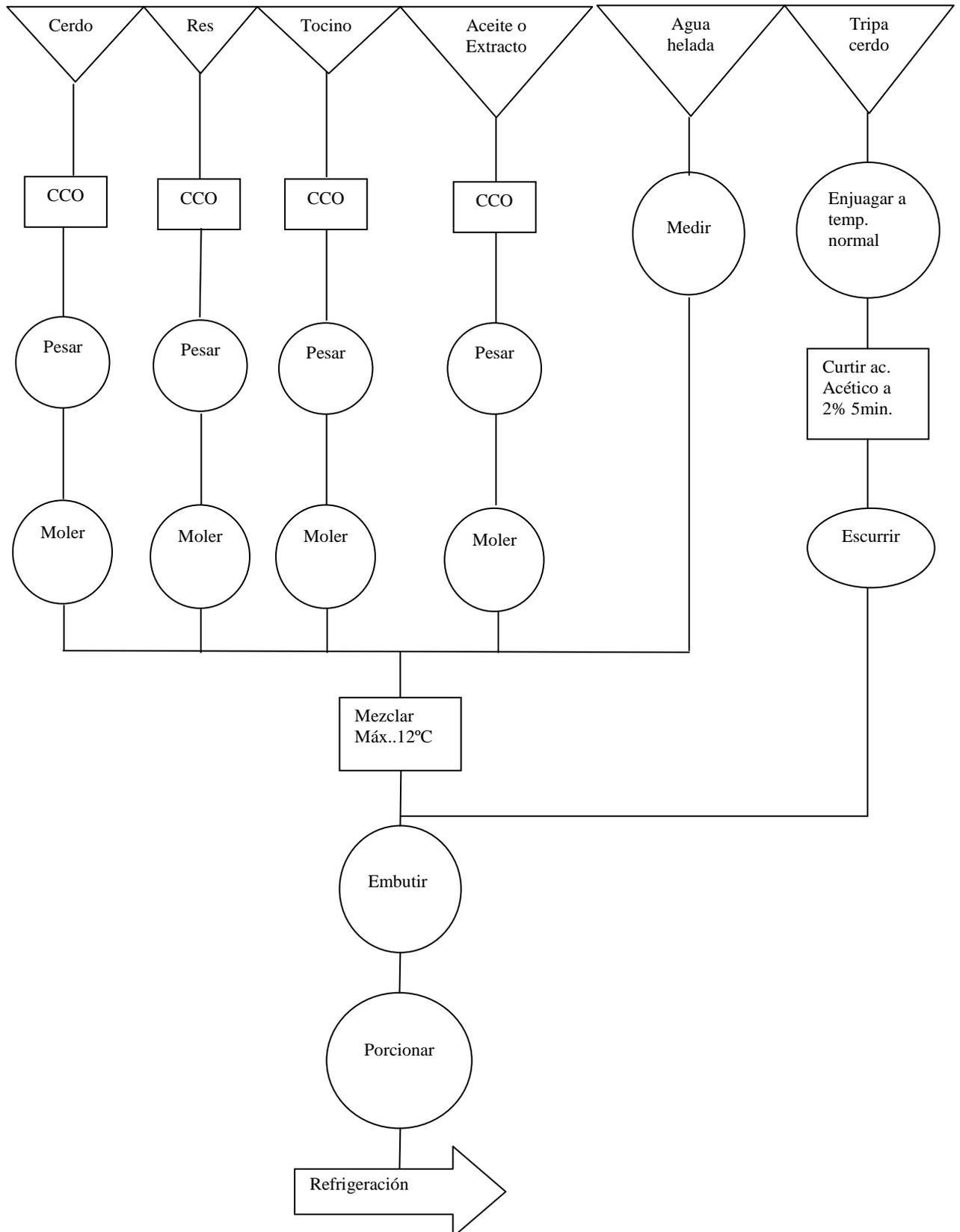
### **3.7 Preparación de productos cárnicos**

Para la elaboración de los productos se utilizó carne de res, cerdo y pollo, se realizó diagramas de flujo de los diferentes procesos de elaboración para los productos cárnicos de diverso tipo, se tomó también en cuenta el control de la calidad de la materia prima e insumos a emplearse. Se planteó la elaboración de tres productos cárnicos de diferente naturaleza para evaluar la bioactividad de los productos naturales seleccionados. Jamón de pierna, salchicha de freír y hamburguesa de pollo.

Las carnes y grasa que se necesitó para realizar los productos cárnicos fueron compradas en el mercado 12 de Abril de la ciudad de Cuenca. Los insumos y aditivos fueron obtenidos del laboratorio de cárnicos de la Universidad del Azuay a igual que su elaboración fue realizada en este mismo lugar.

### 3.7.1 Elaboración de salchicha de freír

#### Diagrama de flujo:



**Datos y cálculos:**

Formulación para 3 Kg. 100%, agua helada 10%, pulpa de brazo 20%, tocino 20%, pulpa de cerdo 50%.

10 gr de azúcar (tampón y formación de color))

0.6 gr de polifosfato (abren las proteínas de la carne ayudan a absorber agua)

TARI K<sub>7</sub>

0.06 gr Aceite, mezcla o extracto (preservante)

0.1gr de Eritorbato de sodio (antioxidante)

1gr de proteína aislada de soya

Condimento a elección, pimienta negra 2 g/kg, ajo 1gr, Glutamato monosódico 0.5 gr, comino 0.5 gr.

**Pesos:**

Res: 0.6 Kg 20%

Cerdo: 1.5 Kg 50%

Tocino: 0.6 Kg 20%

Agua: 0.3 Kg 10%

**Temperaturas y tiempos:**

Reposo 24 horas

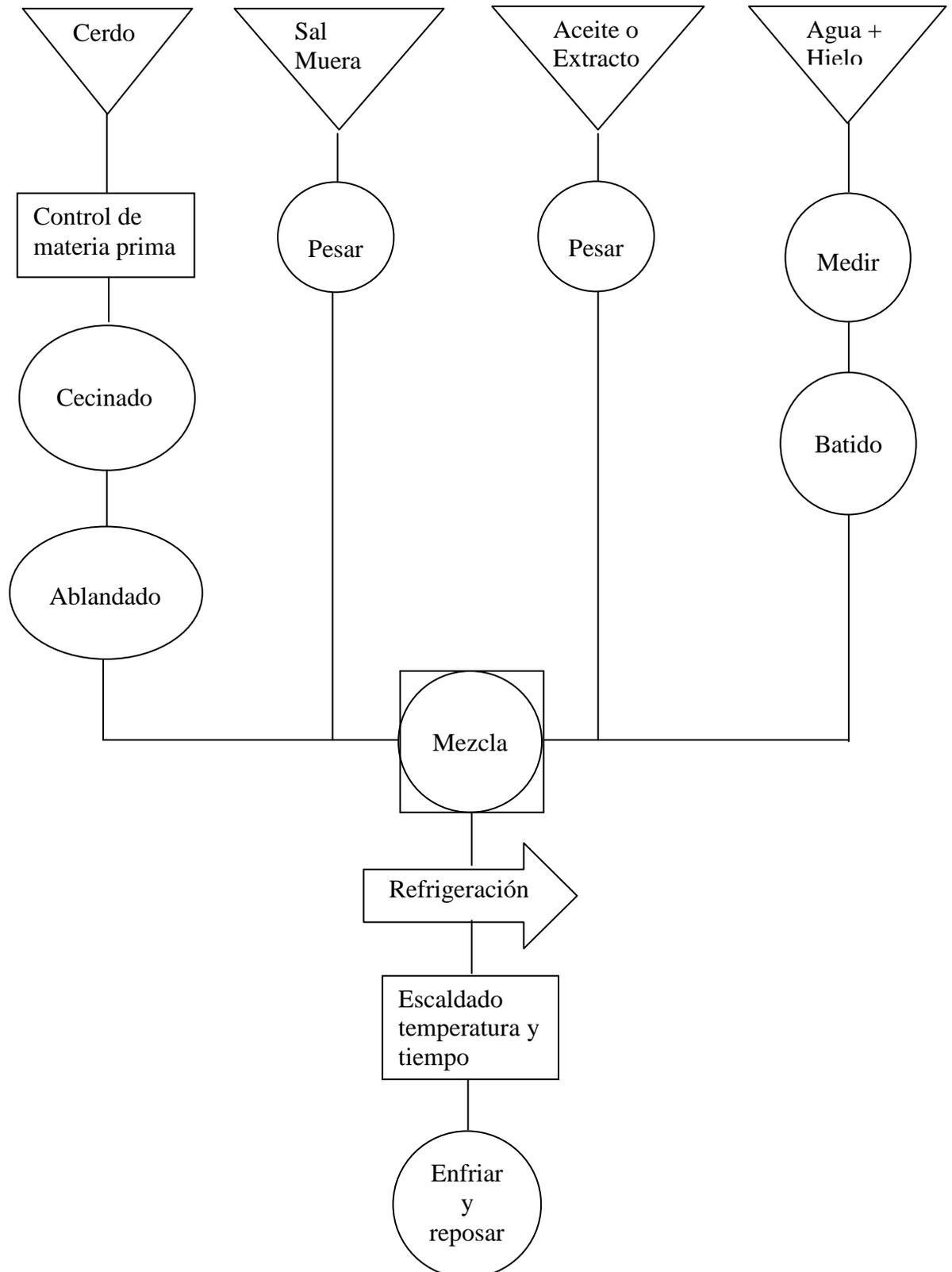
**Figura 3.10.** Salchicha de freír



**Fuente:** Autor

### 3.7.2 Elaboración de jamón de pierna

Diagrama de flujos:



### **Datos y cálculos:**

Formulación para 0.750 Kg. de pulpa de cerdo

20% de inyección todo para 0.15 Kg.

1.2 gr de sal curante

0.3 gr de polifosfato (abren las proteínas de la carne ayudan a absorber agua)

TARI P<sub>22</sub>

0.04 gr de aceite, mezcla o extracto

0.04 gr de Eritorbato de sodio (antioxidante)

0.03 gr de azúcar (tampón y formación de color)

Glutamato monosódico 0.06gr.

Proteína de soya 0.6 gr.

### **Pesos:**

Total de carne de cerdo: 0.750 Kg

Peso salmuera: 0.150 Kg

### **Temperaturas y tiempos**

Temperatura inicial de la carne 17.7°C

Temperatura de la pasta Gruesa Máximo 12°C nos mantuvimos en 11.7°C pasta amasada.

Escaldado 72°C al interior de la pieza y 75°C en el agua por 1h cada kilogramo, por 20 minutos

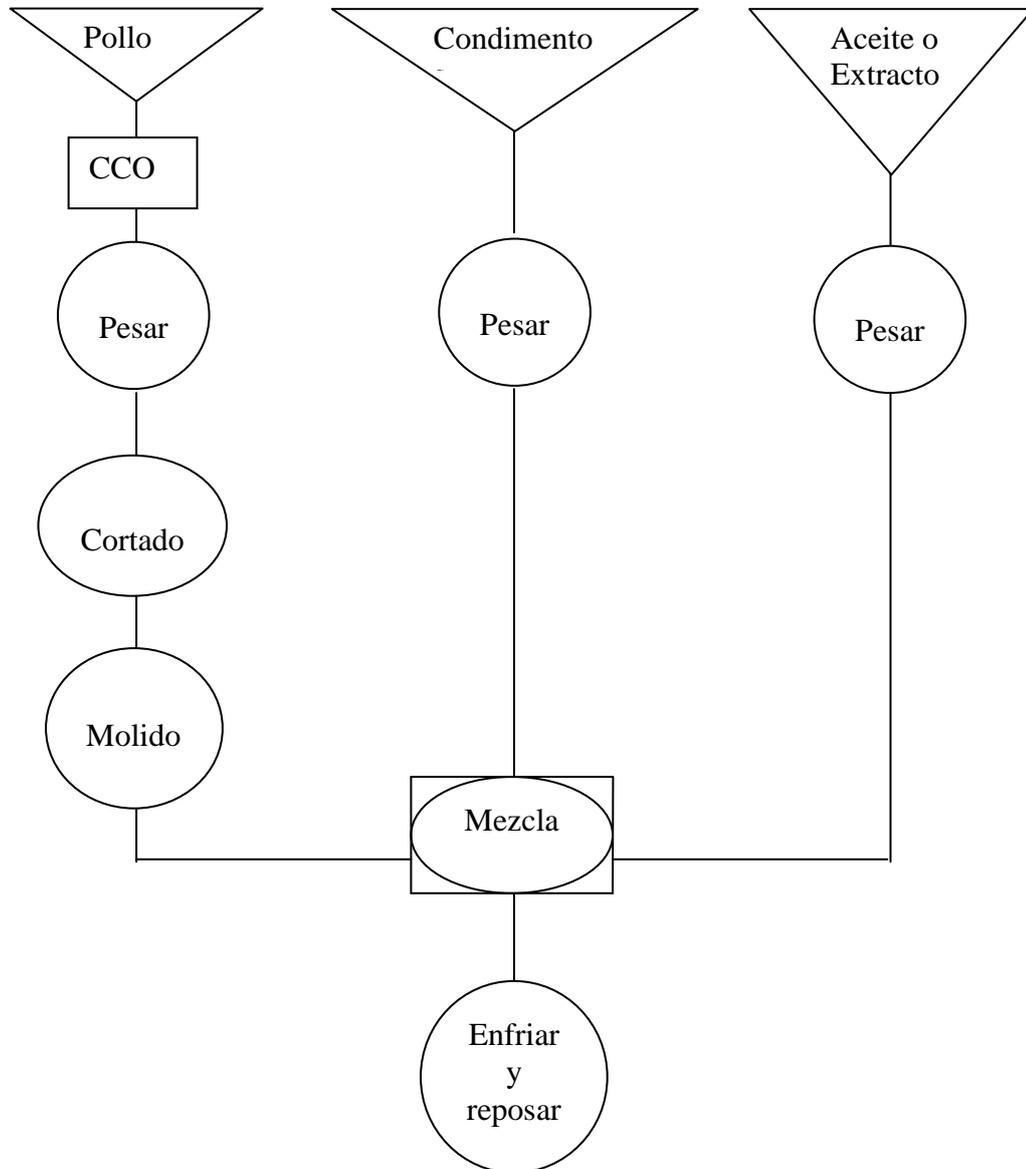
**Figura 3.11.** Jamón de pierna



**Fuente:** Autor.

### 3.7.3 Elaboración de hamburguesa de pollo

Diagrama de flujos:



**Datos y cálculos:**

Formulación para 0.750 Kg. de carne de pollo

0.7 gr de polifosfato (abren las proteínas de la carne ayudan a absorber agua)

TARI P<sub>22</sub>

0.04 gr de aceite, mezcla o extracto

0.03 gr de azúcar (tampón y formación de color)

Glutamato monosódico 0.06gr.

Proteína de soya 3.75 gr.

Condimento a elección, pimienta negra 2 g/kg, ajo 1gr.

**Pesos:**

Total de carne de pollo: 0.750 Kg

**Temperaturas y tiempos:**

Reposo 24 horas

**Figura 3.12.** Hamburguesa de pollo



**Fuente:** Autor.

### **3.8. Análisis sensorial de las muestras**

#### **3.8.1 Generalidades del análisis sensorial.**

La evaluación sensorial es el análisis de alimentos por medio de los sentidos. Degustar es analizar con los sentidos las características organolépticas de un producto comestible. Todos los sentidos deben estar en alerta. El degustador es la persona seleccionada para evaluar las características organolépticas de un alimento según los modelos preestablecidos.

Los degustadores expresan su forma (numérica) en función de un patrón ideal o escalado, por medio de preguntas. La compilación de los datos obtenidos de su análisis para valorar la certeza en la evaluación de los productos comparados.

##### - Instrumentos del análisis sensorial

El análisis sensorial se hace con todos los sentidos, pero con unos condicionantes que aumentan su objetividad y fiabilidad. Por eso es necesario conocer primero cual es la fisiológica y mecanismo por el cual los estímulos son percibidos por el sujeto, así como el entorno físico, psicológico que influye en el resultado final

Una vez que se tienen condiciones para obtener los datos necesarios para plasmar de forma escrita y cuantificable, para que se pueda después hacer el estudio estadístico. Los sentidos corporales son el principal instrumento usado para el análisis, pero también se necesitan medios matemáticos y otros instrumentos materiales que permita traducir las percepciones a número o datos cuantificables.

Como en cualquier análisis instrumental, si el aparato no funciona correctamente, las lecturas no tienen sentido, por lo que de manera similar en el análisis sensorial: es necesario conocer las limitaciones y posibilidades de los órganos sensoriales de los catadores, ya que la ignorancia de estas posibilidades conduce a la obtención de datos falsos y conclusiones erróneas.

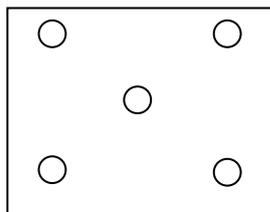
Para la evaluación sensorial es necesario determinar el número de catadores que deben participar, los cuales son las personas que tomarán parte en las pruebas de análisis y de ellos depende en gran parte el éxito y la validez de las pruebas. A los catadores se les debe explicar en forma adecuada cómo han de realizar su evaluación y darles la información necesaria. (Anzaldúa, 2005).

En el análisis sensorial que se aplicó fue usada la prueba de medición del grado de satisfacción, ya que se debió evaluar más de dos muestras a la vez. Esta estrategia se utilizó para manejar más objetivamente datos tan subjetivos como son las respuestas de los catadores respecto a cuánto les gusta o les disgusta un alimento. Se utilizó un panel no entrenado de 20 personas y se aplicó una escala hedónica de tres puntos, en la que se pudo conocer la opinión acerca de los tipos de productos cárnicos preparados con mezclas de aceites esenciales de orégano, una mezcla 1-1 de orégano con laurel y una mezcla con extracto natural de pino. Las preparaciones de hamburguesas de pollo y las salchichas de freír se realizaron mediante una cocción a la plancha, y el jamón se lo analizó sin ninguna preparación previa.

### **3.9 Ensayo para determinar capacidad inhibitoria de aceites y extractos ante *L. monocytogenes*.**

1. Se preparó un inculo de *L. monocytogenes* según lo descrito en 3.5.1
2. Se inoculó a un espécimen de cada producto elaborado, 0.5 mL del inculo, en porciones de 100 uL.

**Gráfico 3.3.** Imagen de inoculación de la bacteria en la unidad del producto cárnico.



**Fuente:** Autor.

3. Los productos inoculados fueron empacados al vacío y colocarlos en refrigeración (4°C)
4. La prueba de determinación de *L. monocytogenes* fue realizada a los productos en ensayo, en los siguientes tiempos:

**Tabla 3.2.** Ensayo vs. tiempo.

| <b>Ensayo</b>                | <b>Tiempo (días)</b> |
|------------------------------|----------------------|
| <b>Producto sin inocular</b> | <b>0</b>             |
| <b>Primera prueba</b>        | <b>7</b>             |
| <b>2da prueba</b>            | <b>15</b>            |
| <b>3ra prueba</b>            | <b>30</b>            |
| <b>4ta prueba</b>            | <b>60</b>            |

**Fuente:** Autor.

Las muestras positivas se remitieron a recuento bacteriano. Si las muestras dan negativo hasta el día 30 se almacenarán hasta 60 días o hasta que se muestren signos de contaminación (hinchamiento del empaque o cambio de color del producto).

5. Los ensayos se realizan por triplicado. (Glass *et. al.*, 1989)

## **CAPITULO IV.**

### **RESULTADOS**

#### **Introducción.**

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en la fase experimental: el rendimiento obtenido en la extracción de los aceites esenciales y extractos vegetales de las distintas especies vegetales en estudio, la evaluación de la actividad antilistelial a través de ensayos “in Vitro” de los aceites esenciales y extractos vegetales. Además se reporta la determinación de las concentraciones de trabajo de los aceites y extractos y el diseño de mezclas de los aceites de las especies en estudio para evaluar una posible sinergia en su actividad biológica.

#### **4.1 Resultados obtenidos en la fase experimental**

##### **4.1.1 Rendimiento de extractos vegetales y aceites esenciales.**

En los cuadros a continuación se detalla el peso de material utilizado, el volumen de aceite esencial y extracto vegetal obtenidos y el rendimiento de cada especie vegetal expresado en porcentaje.

**Tabla 4.1.** Rendimiento de aceites esenciales de las especies en estudio.

| <b>Especie Vegetal</b>              | <b>Material vegetal<br/>(gr)</b> | <b>Aceite esencial<br/>(mL)</b> | <b>Rendimiento<br/>(% p/v)</b> |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Orégano ( <i>O. vulgare</i> )       | 4200                             | 5                               | 0.11                           |
| Menta ( <i>M.pulegium</i> )         | 3740                             | 11                              | 0.29                           |
| Pino ( <i>P. patula</i> )           | 4710                             | 2.5                             | 0.05                           |
| Romero ( <i>R. officinalis</i> )    | 3400                             | 30                              | 0.88                           |
| Laurel ( <i>L. nobilis</i> )        | 2350                             | 7                               | 0.30                           |
| Hierba luisa ( <i>C. citratus</i> ) | 1312                             | 5                               | 0.38                           |

**Fuente:** Autor.

**Tabla 4.2.** Rendimiento de extractos vegetales de las especies en estudio.

| <b>Especie Vegetal</b>              | <b>Material vegetal<br/>(gr)</b> | <b>Extracto vegetal<br/>(mL)</b> | <b>Rendimiento<br/>(% p/v)</b> |
|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Orégano ( <i>O. vulgare</i> )       | 100                              | 30.2                             | 30.2                           |
| Menta ( <i>M.pulrgium</i> )         | 100                              | 14.8                             | 14.8                           |
| Pino ( <i>P. patula</i> )           | 150                              | 26                               | 17.33                          |
| Romero ( <i>R. officinalis</i> )    | 100                              | 26.9                             | 26.9                           |
| Laurel ( <i>L. nobilis</i> )        | 100                              | 25                               | 25                             |
| Hierba luisa ( <i>C. citratus</i> ) | 100                              | 45                               | 45                             |

**Fuente:** Autor.

#### **4.1.2 Actividad antibacteriana de extractos y aceites puros en ensayo “in Vitro”**

El desarrollo de los bioensayos para evaluar la actividad antibacteriana de extractos y aceites esenciales ante *L. monocytogenes* permitió seleccionar las

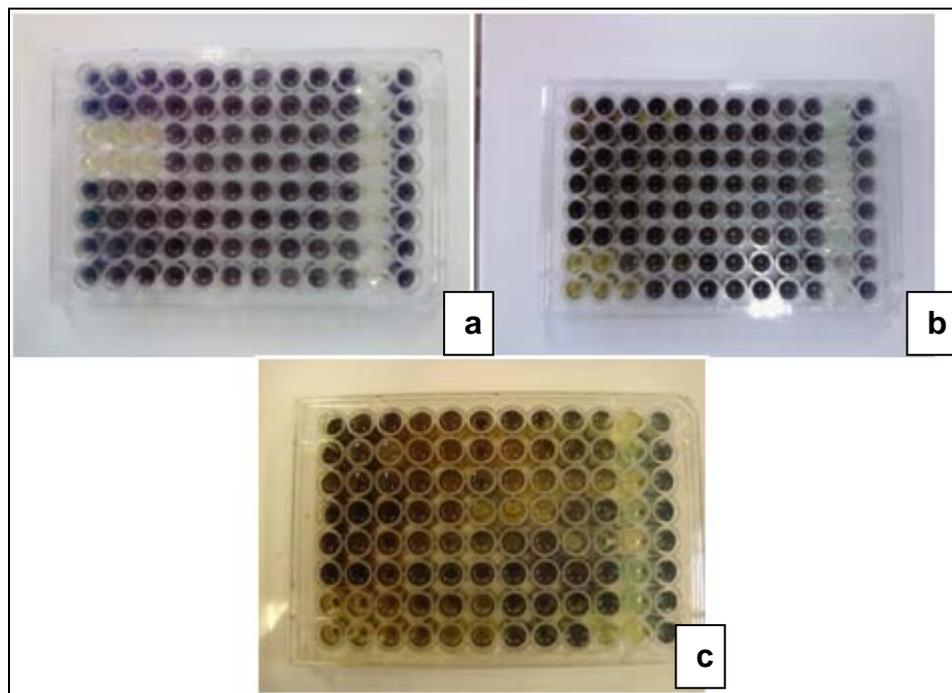
sustancias naturales capaces de inhibir el crecimiento de este microorganismo. A continuación se presentan las especies evaluadas, la sustancia natural bioactiva y la dosis inhibitoria mínima, en el caso de presentarse actividad.

**Tabla 4.3.** Actividad antibacteriana de extractos y aceites puros en ensayo “in Vitro”. +: Inhibición del microorganismo; -: sin actividad antibacteriana; ND: No determinado; CIM: Concentración Mínima Inhibitoria

| <b>Especie</b>                         | <b>Sustancia natural evaluada</b> | <b>Bioactividad</b> | <b>CIM (<math>\mu</math>L)</b> |
|--|-----------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Orégano<br>( <i>O. vulgare</i> )       | Aceite esencial                   | +                   | 12.5                           |
|  | Extracto                          | -                   | ND                             |
| Menta<br>( <i>M. pulegium</i> )        | Aceite esencial                   | -                   | ND                             |
|  | Extracto                          | -                   | ND                             |
| Pino<br>( <i>P. patula</i> )           | Aceite esencial                   | -                   | ND                             |
|  | Extracto                          | +                   | 25                             |
| Romero<br>( <i>R. officinalis</i> )    | Aceite esencial                   | -                   | ND                             |
|  | Extracto                          | -                   | ND                             |
| Laurel<br>( <i>L. nobilis</i> )        | Aceite esencial                   | +                   | 12.5                           |
|  | Extracto                          | -                   | ND                             |
| Hierba luisa<br>( <i>C. citratus</i> ) | Aceite esencial                   | -                   | ND                             |
|  | Extracto                          | -                   | ND                             |

**Fuente:** Autor

**Figura 4.1.** Imágenes de bioensayos desarrollados; **a:** aceites esenciales de Orégano (*O. vulgare*); Menta (*M. pulegium*); Pino (*P. patula*); Romero (*R. officinalis*). **b:** extractos vegetales de las especies Orégano (*O. vulgare*); Menta (*M. pulegium*); Pino (*P. patula*); Romero (*R. officinalis*). **c:** aceites esenciales y extractos vegetales de las especies Laurel (*L. nobilis*); Hierba luisa (*C. citratus*).



**Fuente:** Autor

#### 4.1.3 Actividad antibacteriana de mezclas en ensayo “in Vitro”

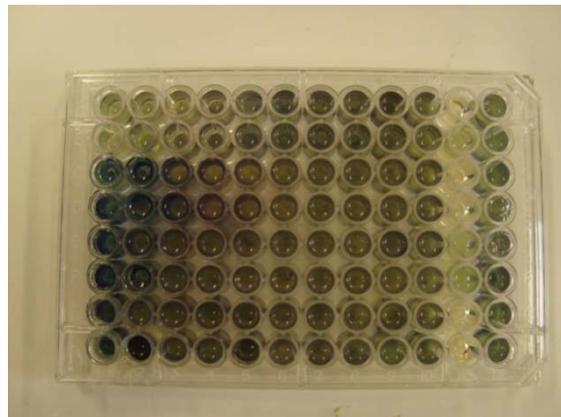
Llevando a cabo los bioensayos para evaluar la actividad antilistelial de las mezclas de los aceites esenciales más promisorios ante *L. monocytogenes* permitió seleccionar la mezcla capaz de inhibir el crecimiento de este microorganismo. A continuación se presentan la formulación de la mezcla y en el caso de presentarse actividad; la dosis inhibitoria mínima.

**Tabla 4.4.** Actividad antibacteriana de mezclas en ensayo “in Vitro”. +: Inhibición del microorganismo; -: sin actividad antibacteriana. CIM: Concentración Mínima Inhibitoria. ND: No determinado.

| Formulación de la mezcla                      | Bioactividad | CIM ( $\mu\text{L}$ ) |
|---|--------------|-----------------------|
| 50% orégano y 50% laurel                      | +            | 12.5                  |
| 50% laurel y 50% hierba luisa                 | +            | 50                    |
| 50% orégano y 50% hierba luisa                | -            | ND                    |
| 33% orégano, 33% laurel, 33% hierba luisa     | -            | ND                    |
| 16.5% orégano, 16.5% laurel, 66% hierba luisa | -            | ND                    |
| 16.5% orégano, 66% laurel, 16.5% hierba luisa | +            | 25                    |
| 66% orégano, 16.5% laurel, 16.5% hierba luisa | +            | 25                    |

**Fuente:** Autor

**Figura 4.2.** Placa desarrollada en ensayos “in Vitro” de las siguientes mezclas; 50% orégano y 50% laurel; 50% laurel y 50% hierba luisa; 16.5% orégano, 66% laurel, 16.5% hierba luisa; 66% orégano, 16.5% laurel, 16.5% hierba luisa.



**Fuente:** Autor

#### 4.1.4 Actividad antibacteriana de sustancias puras y mezclas en productos cárnicos

Los resultados obtenidos en los ensayos “in vitro” permitieron diseñar una prueba para verificar la actividad antilisterial de los productos naturales bioactivos en la preservación de cárnicos.

Los productos preparados según lo descrito en la sección 3.7 fueron sometidos a una prueba de conservación. Los resultados obtenidos se reportan a continuación:

**Tabla 4.5.** Actividad antibacteriana de sustancias puras y mezclas en productos cárnicos. +: presencia de *L. monocytogenes*, -: ausencia de *L. monocytogenes*. ND: no determinado; UFC: Unidades Formadoras de Colonias. Productos: 1: jamón de pierna; 2: salchicha de freir; 3: hamburguesa de pollo.

| Especie                          | Sustancia natural evaluada | Producto | Tiempo (días) |   |    |    |    | Recuento de Bacterias (UFC/ml) |
|----------------------------------|----------------------------|----------|---------------|---|----|----|----|--------------------------------|
|                                  |                            |          | 0             | 7 | 15 | 30 | 60 |                                |
| Orégano<br>( <i>O. vulgare</i> ) | Aceite                     | 1        | -             | - | -  | -  | +  | 34560                          |
|                                  |                            | 2        | -             | - | -  | -  | +  | 38930                          |
|                                  |                            | 3        | -             | - | -  | -  | +  | 32800                          |
| Pino<br>( <i>P. patula</i> )     | Extracto                   | 1        | -             | - | -  | -  | +  | 23060                          |
|                                  |                            | 2        | -             | - | -  | -  | +  | 72000                          |
|                                  |                            | 3        | -             | - | -  | +  | ND | 36400                          |
| 50% orégano y<br>50% laurel      | Mezcla de aceites          | 1        | -             | - | -  | -  | +  | 54260                          |
|                                  |                            | 2        | -             | - | -  | -  | +  | 86130                          |
|                                  |                            | 3        | -             | - | -  | -  | +  | 63200                          |

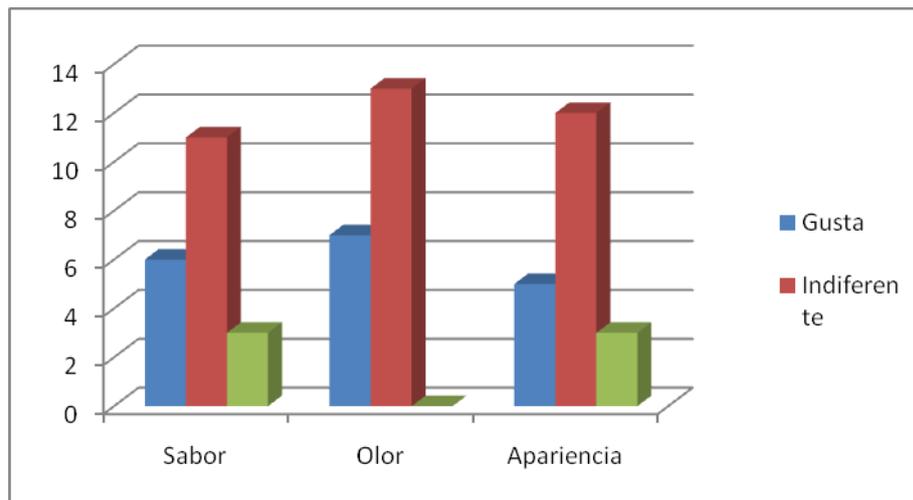
**Fuente:** Autor

#### 4.1.5 Resultados del análisis sensorial del producto terminado

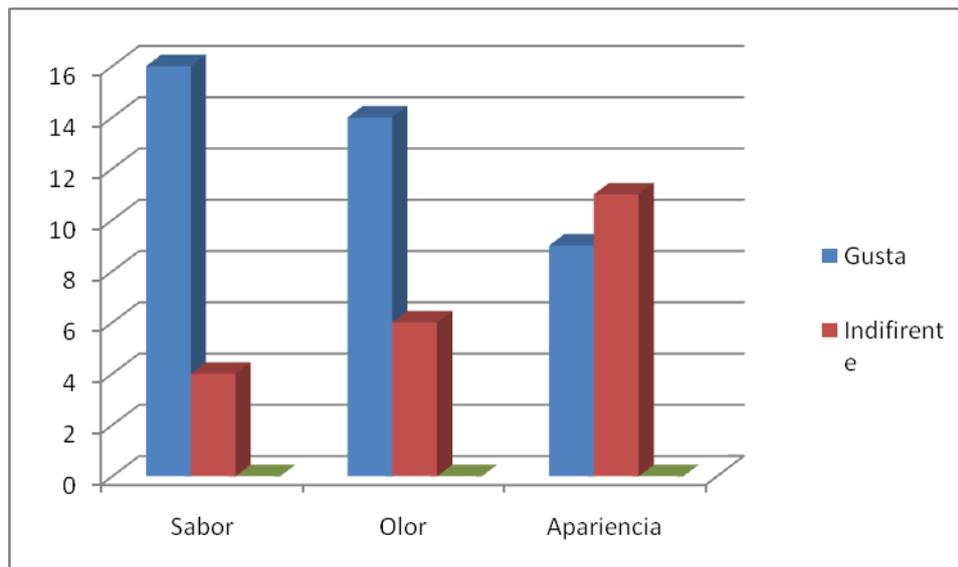
Los resultados del análisis sensorial se resumen en los siguientes gráficos.

- **Producto 1: Jamón de pierna**

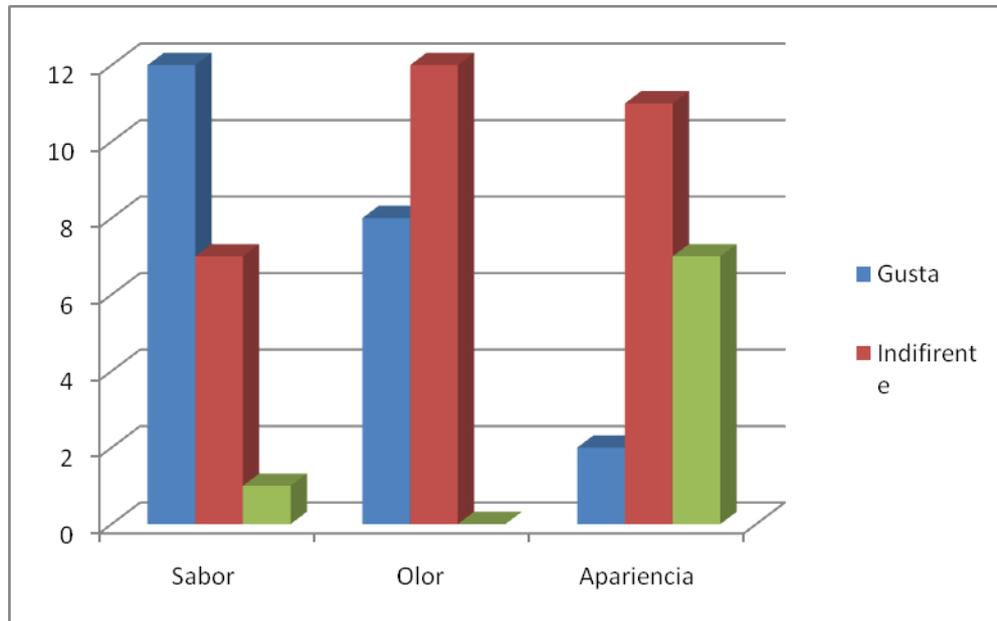
##### Muestra I (Aceite de Orégano)



##### Muestra II (Mezcla de Aceites Orégano 50% Laurel 50%)

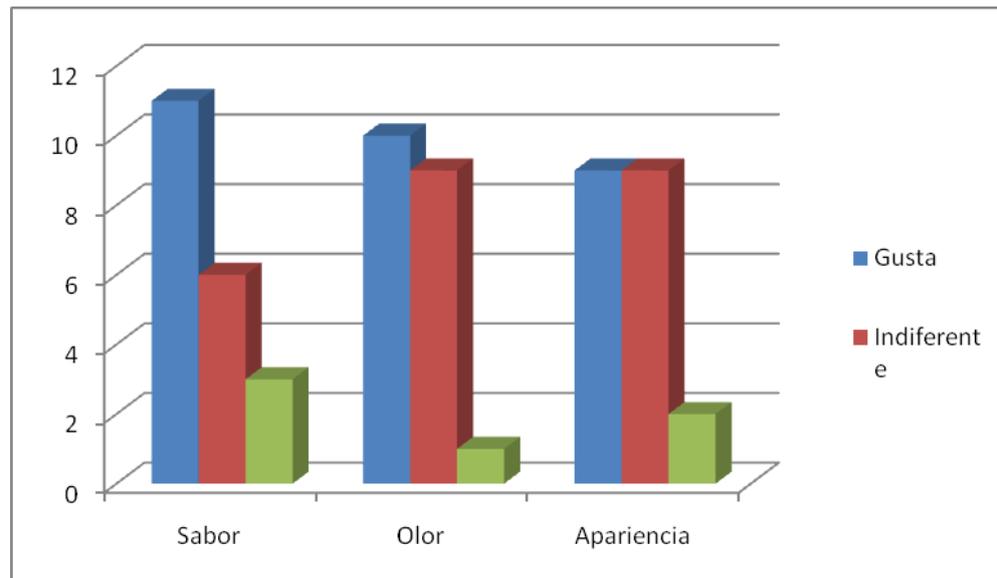


**Muestra III (Extracto de Pino)**

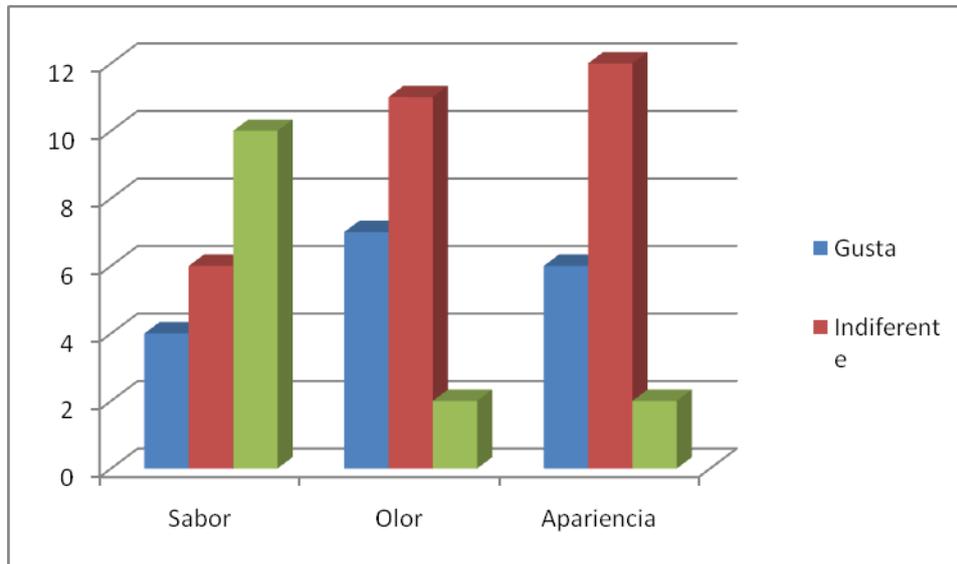


- **Producto 2: Salchicha de freír**

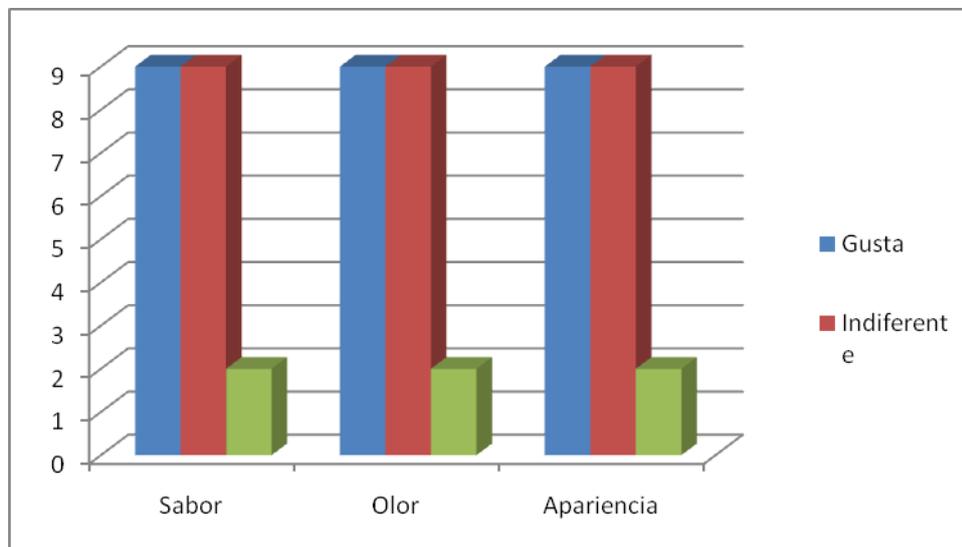
**Muestra I (Aceite de Orégano)**



**Muestra II (Mezcla de Aceites Orégano 50% Laurel 50%)**

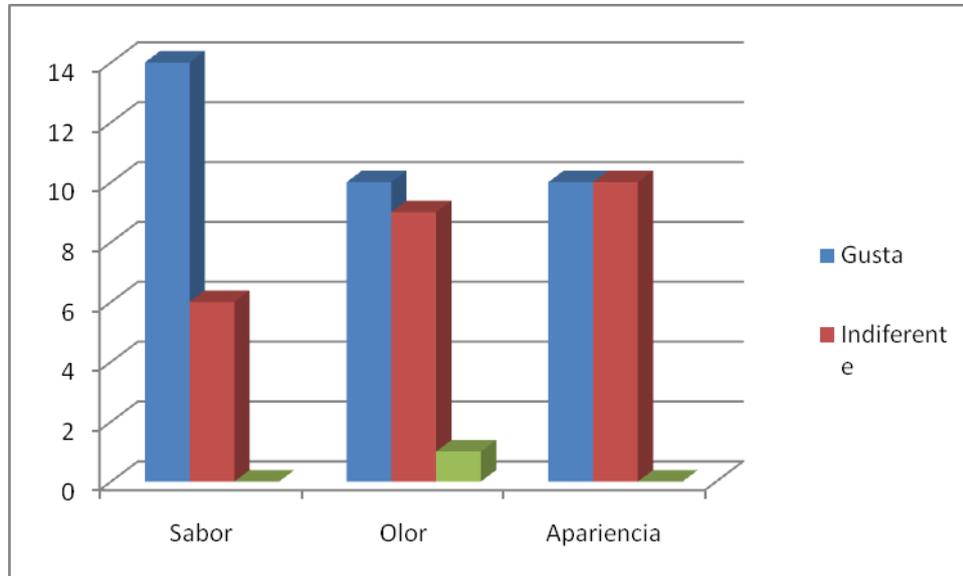


**Muestra III (Extracto de Pino)**

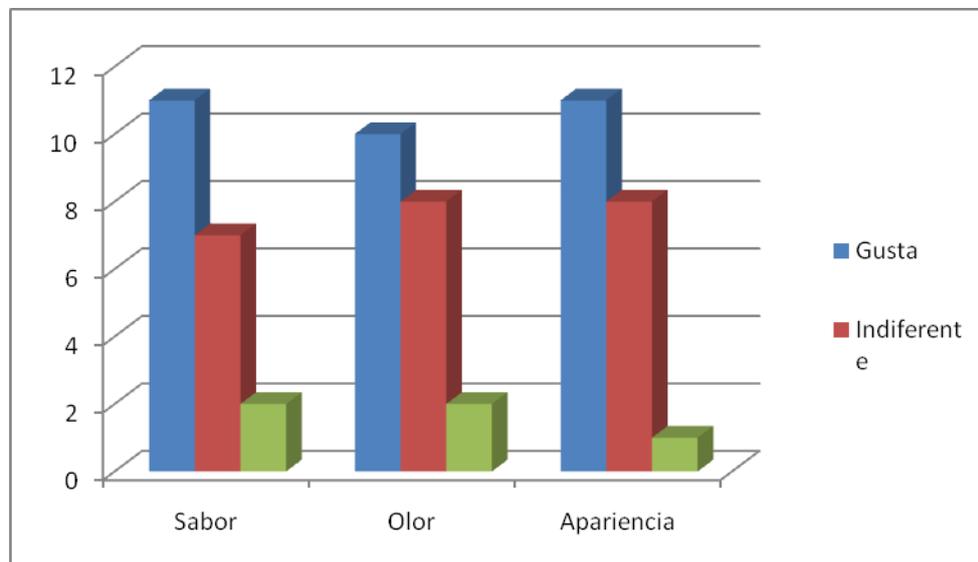


- **Producto 3 : Hamburguesa de pollo**

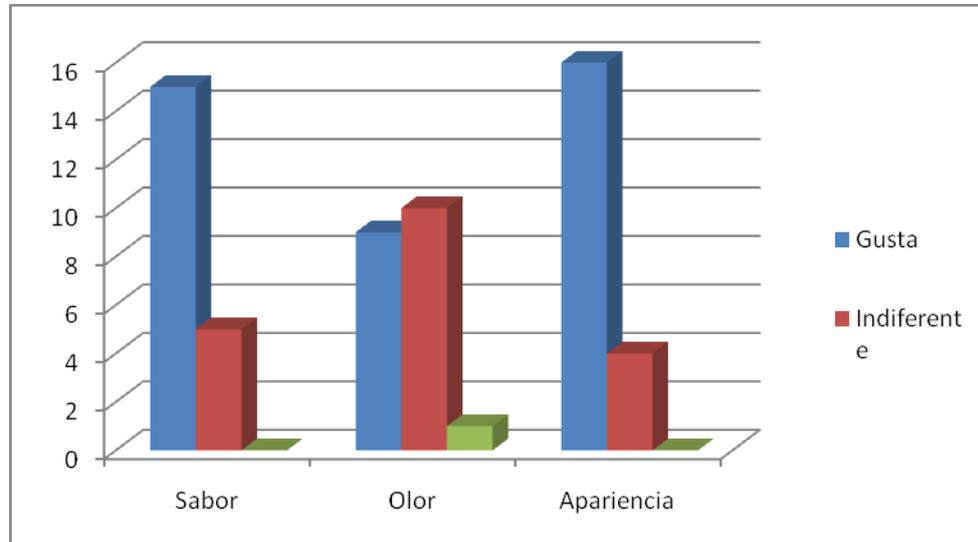
**Muestra I (Aceite de Orégano)**



**Muestra II (Mezcla de Aceites Orégano 50% Laurel 50%)**



### Muestra III (Extracto de Pino)



## 4.2 Discusión

### 4.2.1 Rendimiento de extractos vegetales y aceites esenciales.

Según los resultados obtenidos muestran que la especie vegetal con mayor rendimiento en la obtención de aceites esenciales es Romero (*R. officinalis*) con un rendimiento del 0.88% (p/v), a esta especie le sigue Hierba luisa (*C. citratus*) con un rendimiento del 0.38% y en un tercer lugar tenemos Laurel (*L. nobilis*) con 0.30%. El menor resultado fue Pino (*P. patula*) con 0.05%

Los resultados de rendimiento de los extractos vegetales muestran que la especie vegetal con un mayor rendimiento es Hierba luisa (*C. citratus*) con un 45% (p/v), seguida de Orégano (*O. vulgare*) con un 30.2% y en tercer lugar Romero (*R. officinalis*) con un 26.9%. El más bajo rendimiento ocurrió en la extracción de Menta (*M. pulegium*), reportándose un 14.8%.

Podemos observar que los rendimientos obtenidos por los aceites son bajos con relación a los porcentajes obtenidos en los extractos vegetales. Esto se debe a la abundancia de aceites esenciales, que es menor a la de los compuestos que se obtienen por extracción.

#### **4.2.2 Actividad antibacteriana de extractos y aceites puros en ensayo “in Vitro”**

En función a los resultados presentados en la tabla 4.3 se determina que la mayor actividad antilisterial se obtuvo en los aceites esenciales de las especies Orégano (*O. vulgare*) y Laurel (*L. nobilis*). El aceite de orégano tiene propiedades antibacterianas y antisépticas; en el aceite de laurel se han reportado sustancias de acción bactericida; con una dosis inhibitoria mínima de 12.5µL (Font Quer, 1982). Además, se reporta la actividad antilisterial del extracto natural de Pino (*P. patula*) con una dosis inhibitoria mínima de 25µL. El efecto bactericida puede deberse a la acción de la trementina, componente de la resina de pino (Font Quer, 1982). Esta sustancia es un conocido antiséptico. Estos resultados permitieron seleccionar las sustancias naturales capaces de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Se pudo observar que los aceites esenciales son más eficientes para inhibir *L. monocytogenes* que los extractos naturales., esto debido a la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales que es atribuida a la presencia de componentes fenólicos. (Morton, 1987)

#### **4.2.3 Actividad antibacteriana de mezclas en ensayo “in Vitro”**

Mediante los resultados obtenidos en los bioensayos para evaluar la actividad antilisterial de las mezclas de los aceites esenciales más promisorios ante *L. monocytogenes* permitió seleccionar la mezcla capaz de inhibir el crecimiento de este microorganismo la misma que fue la mezcla de aceites esenciales 50% orégano y 50% laurel con una dosis inhibitoria mínima de 12.5µL. El efecto sinérgico de esta mezcla se justifica por las características bactericidas de cada uno de los aceites puros y que fueron citadas en 4.2.2.

#### **4.2.4 Actividad antibacteriana de sustancias puras y mezclas en productos cárnicos**

Los resultados obtenidos en la tabla 4.5 nos muestran que, en todos los ensayos desarrollados con productos cárnicos, no se presenta crecimiento bacteriano hasta los 60 días de almacenamiento. La hamburguesa de pollo preservada con extracto de pino registra crecimiento de *L. monocytogenes* a los 30 días de almacenamiento, Esta fue la única prueba que no cumple con lo requerido para la vida útil de los productos cárnicos en refrigeración. Este resultado se atribuye a que el extracto de pino tiene una dosis inhibitoria mínima de 25µL menor al aceite esencial de orégano y a la mezcla de aceites esenciales 50% orégano y 50%, además la *L. monocytogenes* crece mejor en carne de aves en comparación con productos a base de res y cerdo (Sánchez, 2009). El resultado promedio de recuento de bacterias al dar positiva la prueba de presencia de *l. monocytogenes* es 49038 UFC/ml

#### **4.2.5 Resultados del análisis sensorial del producto terminado**

Los resultados del análisis sensorial demostraron que los productos que presentaron mejor aceptación por características organolépticas fueron:

- jamón de pierna, adicionado con la mezcla bioactiva (aceite de orégano 50% y aceite de laurel 50%)
- salchicha de freír preservada con aceite de orégano
- hamburguesa de pollo adicionada con extracto de pino

Los productos desarrollados en esta investigación tienen características de sabor, olor y apariencia aceptables por el panel de catadores. Esta característica fortalece los resultados obtenidos al demostrar el potencial de productos naturales como conservantes de cárnicos, sin alterar sus propiedades organolépticas.

## CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo de investigación nos permite establecer las siguientes conclusiones:

- Se obtuvieron los aceites esenciales; por el método de arrastre de vapor; y los extractos vegetales de las plantas seleccionadas con potencial antilistelial Orégano (*O. vulgare*), Pino (*P. patula*), Laurel (*L. nobilis*), Menta (*M. pulegium*), Romero (*R. officinalis*), Hierba luisa (*C. citratus*), de las cuales el romero y la hierba luisa presentan un buen rendimiento.
- Se evaluó la actividad antilistelial de los aceites esenciales y extractos vegetales en ensayos “in Vitro”, con los datos obtenidos en los bioensayos se obtuvieron las especies más promisorias para inhibir *L. monocytogenes*, se puede observar que las especies que presentan mayor actividad antilistelial son Pino (*P. patula*), Orégano (*O. vulgare*), Laurel (*L. nobilis*). Se realizaron las mezclas de los tres aceites esenciales de Orégano (*O. vulgare*), Laurel (*L. nobilis*), Hierba luisa (*C. citratus*), mediante un diseño de mezclas siguiendo un modelo simplex aumentado. Se evaluó la actividad antimicrobiana de las mezclas de aceites esenciales en ensayos “in Vitro”, con los datos obtenidos en bioensayos se obtuvo la mezcla más promisorias para inhibir *L. monocytogenes*, se puede observar que la mezcla con mayor bioactividad fue la mezcla 50% orégano y 50% laurel.
- Con los resultados de los bioensayos se seleccionó los aceites esenciales, el extracto vegetal y la mezcla de aceites esenciales como preservantes de productos cárnicos. Fueron evaluadas su actividad antilistelial en tres productos cárnicos; jamón de pierna, salchicha de freír y hamburguesa de pollo, con los datos obtenidos en las pruebas microbiológicas se obtuvieron las sustancias naturales más promisorias para inhibir *L. monocytógenes*, se puede observar que todas las sustancias

naturales cumplen con el tiempo de almacenamiento de los productos cárnicos propuestos: excepto el aceite extracto de pino como conservante en la hamburguesa de pollo. Por lo tanto la mezcla de aceites y el aceite puro de orégano son los que tienen mejor efecto inhibitorio de *L. monocytogenes* en productos cárnicos.

- Se obtuvo una buena aceptación de los productos cárnicos con sustancias naturales como inhibidores de *L. monocytogenes* según resultados del análisis sensorial de las muestras.

De los resultados obtenidos, se puede demostrar que los aceites esenciales, los extractos naturales y la mezcla de aceite de orégano y laurel son eficientes como inhibidores de *L. monocytogenes* para productos cárnicos, por lo tanto el uso de sustancias naturales es una buena alternativa para la industria; además de tener un buen efecto antilisterial, presenta ventajas como que no presentan ningún riesgo para la salud humana, a diferencia de los conservantes químicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### Libros y Documentos Físicos

- ◆ ALVAREZ C., VÁZQUEZ J., CARRASCO M. (1997). Host cell heparan *sulfate proteoglycans* attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infection and Immunity magazine*; EEUU pp: 65-78-88.
- ◆ ANZALDÚA A. (2005). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica; 1ra Edición; Editorial Acribia, Zaragoza; España; pp: 45-92.
- ◆ ARMSTRONG D. (1995). *Listeria monocytogenes*; En: Mandell, G. *et al.* (Eds.). Principles and practice of infectious diseases, 4ta Edición. Editorial Willey and Sons, EEUU, pp: 1880-1885.
- ◆ BANDONI A. (2000). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica; S/N Edición; Editorial de la Universidad Nacional de La Plata; Argentina.
- ◆ <sup>1</sup>BADUI S. (1993). Química de los Alimentos; 2da Edición. Editorial Alhambra Mexicana S.A.; México; pp: 464-470
- ◆ <sup>2</sup>BADUI, S. (2006). Química de los Alimentos: 4ta Edición. Editorial Pearson Addison Wesley; México; pp: 282-295
- ◆ BOSAKEWICH, M., (1993). Questionable methods of cancer anagement, *Therapies CA; a cancer journal for clinicians*. vol. **43**; EEUU; pp: 47–56.
- ◆ BROOKS G., J. BUTEL, S. MORSE. (2002). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg; 17ta Edición; Editorial El Manual Moderno, México; pp:56-58.
- ◆ BUCHANAN, B. GRUISSEM, JONES, R, (2000). Biochemistry and Molecular Biology of plants; American Society of Plant Physiologists; vol.5; EEUU; pp: 32-35.

- ◆ BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review; *International Journal of Food Microbiology*; vol **94**; EEUU; pp: 223-253.
- ◆ CAZAR, M. (2006). Fungicidas y Bactericidas de Microorganismos de Suelo; Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias; Universidad de Talca; Instituto de Química de Recursos Naturales; Chile.
- ◆ DESROSIER N. (2004). Conservación de Alimentos; S/N Edición; Compañía Editorial Continental, Colombia; pp. 333 – 369.
- ◆ DOYLE E. (1999). Use of Other Preservatives to Control Listeria in Meat; Food Research Institute; UW-Madison American Meat Institute; EEUU; pp: 14-16.
- ◆ ELOFF, J. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria; *Planta Medica magazine*; vol. **64**; EEUU; pp: 711 – 713.
- ◆ FRAZIER, W., WESTHOFF D., (1978), Microbiología de los Alimentos; 3era Edición; Editorial Acribia S.A.; España., pp: 316-325.
- ◆ GLASS K, DOYLE M. (1989). Fate of Listeria monocytogenes in Processed Meat Products during Refrigerated Storage; Department of Food Microbiology and Toxicology, The Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison; Applied and Environmental Microbiology; Copyright © 1989; American Society for Microbiology vol. **55**; EEUU; pp: 1565-1569
- ◆ GUTIERREZ J., BARRY R. y BOURKE P. (2008), The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients; *International Journal of Food Microbiology*; vol **124**. EEUU; pp: 91-97.
- ◆ LÓPEZ V. (2009). Mecanismos para prevenir y minimizar la presencia de *L. monocytogenes* en la industria de alimentos; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; Universidad de Chile, *llopez09*, Sociedad Chilena de Microbiología e Higiene de los Alimentos; Chile; pp: 1 – 12
- ◆ LUNDSTEDT, T., SEIFERT, E., ABRAMO, L., THELIN, B., NYSTRÖM. A, PETTERSEN, J., BERGMAN, R. (1998). Experimental

Design and Optimization; *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*; vol. **42**; UK; pp: 3 - 40

- ◆ MOREIRA M., PONCE A., DEL VALLE C. y ROUSA S. (2007), Effects of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* in blanched spinach and mince cooked beef; *Journal of Food Processing and Preservation*; vol. **31**; EEUU; pp: 379-391.
- ◆ MORTON J. (1987). Fruits of warm climates; Creative Resource Systems Inc. ISBN 0-9610184-1-0; EEUU.
- ◆ PONCE A., ROUSA S., DEL VALLE C y MOREIRA M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *in vitro* and *in vivo* Studies; *Postharvest Biology and Technology magazine*; vol. **49**; México; pp: 294-300-679-684.
- ◆ SHIVA RAMAYONI C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento; Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad y Anatomía de Animales; Facultad de Veterinaria; Universidad Autónoma de Barcelona; España; pp: 173.
- ◆ SWAMINATHEN B., ROCOURT J., BILLE J. (1995). Listeria. En: Murray PR, et al. (eds.); *Manual of clinical microbiology*, 6ta Edición; American Society for Microbiology, EEUU, pp: 341-348.

### **Referencias Electrónicas**

- ◆ ANTÓN A., y LIZASO J. (2001), Nitritos, nitratos y nitrosaminas; Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria; disponible en: <http://mie.esab.upc.es/ms/formacio/Control%20%20Contaminacio%20Agricultura/biblio/nitratos%20y%20nitrosaminas.pdf>; España; (visitado en Mayo de 2010); pp:1 a 5
- ◆ CUTRE, C., MCELROY, D., PENN, S. (2006). El Control de Listeria monocytogenes en Establecimientos de Venta al Consumidor o al Detalle; disponible en: <http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/xk006.pdf>; EEUU (visitado en Mayo de 2010).

- ◆ Diccionario Enciclopedia Popular Ilustrado Salvat (1974). <http://es.wikipedia.org/wiki/>; Internacional; (Visitada Mayo 2010).
- ◆ MIRANDA, C. (2007). Antioxidant Activities of Flavonoids; disponible en: <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>; EEUU; (Visitada Mayo 2010).
- ◆ SÁNCHEZ, M. (2009). Situación de Listeria en el mundo: Hacia Planes Nacionales de Listeria, disponible en: <http://www.iica.int/Eng/regiones/sur/chile/Documents/Situaci%C3%B3n%20de%20Listeria%20en%20el%20Mundo,%20Hacia%20Planes%20Nacionales%20de%20Control%20de%20Listeria.pdf>; Chile; (visitado en Mayo de 2010)