

Formulación de mezclas de aceites esenciales como inhibidores de *Listeria monocytogenes*

María-Elena Cazar R.²⁵

Introducción

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados tienen un alto impacto económico y en la salud pública. Las contaminaciones de alimentos causadas por patógenos como *Campylobacter* y *Salmonella* son las más comúnmente reportadas. No obstante, patógenos como *Listeria monocytogenes* pueden adaptarse, sobrevivir y crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, causando patologías con elevadas tasas de hospitalización y mortalidad (Gandhi y Chikindas, 2007).

Las infecciones humanas producidas por *Listeria monocytogenes* forman parte, desde hace poco tiempo, de las mayores preocupaciones de los médicos, epidemiólogos e higienistas de alimentos. La razón principal es, sin duda, la gravedad de los problemas materno/fetales, septicémicos o neurológicos, constatados en las últimas décadas con ocasión de los focos de listeriosis en Francia y Estados Unidos. Los casos mortales no son, por desgracia, infrecuentes (cerca del 40% de los enfermos) (Bourgeois, 2004).

Existen algunos factores que hacen a *L. monocytogenes* particularmente peligrosa en los productos cárnicos. Este bacilo Gram-positivo es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (4° C) y soporta la congelación y la desecación. También puede crecer a pH ácido, y tolera altas concentraciones de sal, en casos extremos de hasta el 30%. Además, es cuatro veces más resistente al tratamiento térmico que otro patógeno conocido: *Salmonella sp.* Debido a que *L. monocytogenes* puede crecer en una variedad de productos cárnicos procesados a temperaturas de refrigeración, se han probado una variedad de productos químicos que destruyen o limitan el desarrollo de microorganismos peligrosos para conservar la carne. Sustancias como: cloruro de sodio, nitritos, fosfato trisódico, humo, humo líquido, lisozimas, sorbato (ácido sórbico), quelantes, monolaurín, monoglicéridos, eritorbato sódico, parabeno de metilo (p-hidroxibenzoato) (López, 2009).

El riesgo asociado al uso de nitratos y nitritos es la formación de nitrosaminas, sustancias que son agentes cancerígenos. En el caso de los benzoatos si se consumen de manera excesiva pueden llegar a producir alteraciones gástricas y neurológicas. Aditivos como los sorbatos presentan cierta inestabilidad a elevadas temperaturas (Brooks *et al.*, 2002).

Las plantas elaboran aceites esenciales con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización (Buchanan, 2000). En el organismo, los aceites esenciales pueden actuar de modo

25 Universidad del Azuay, Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales, Cuenca-Ecuador.

farmacológico, fisiológico y psicológico. El uso de aceites esenciales como preservantes de alimentos constituye un promisorio tema de estudio, orientado a sustituir el uso de compuestos químicos como aditivos de alimentos y potenciar las características organolépticas de los productos cárnicos. La propuesta de este trabajo experimental se orienta a la evaluación de aceites esenciales, puros y en mezclas, como inhibidores potenciales de *L. monocytogenes* en ensayos *in vitro* y su posterior aplicación como preservantes de productos cárnicos.

Metodología

Recolección de material vegetal

Las especies vegetales evaluadas en este trabajo se adquirieron en mercados locales de la ciudad de Cuenca. Se seleccionaron las partes aéreas desechando material vegetal seco o con síntomas de enfermedades. Las especies seleccionadas para obtención de aceites esenciales fueron: romero (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), menta (*Mentha pulegium*), pino (*Pinus patula*), laurel (*Laurus nobilis*) y hierba luisa (*Cymbopogon citratus*).

Obtención de aceites esenciales

Los aceites esenciales de las especies en estudio, a excepción de *O. vulgare*, fueron obtenidos mediante extracción por arrastre de vapor en un equipo de hidrodestilación. Un proceso de extracción líquido-líquido con diclorometano fue aplicado para la obtención de aceite de *O. vulgare*. Las muestras fueron centrifugadas a 5.000 rpm con el fin de eliminar restos de agua, y almacenadas al resguardo de la luz solar.

Aislamiento, purificación y mantenimiento de L. monocytogenes

El microorganismo de prueba fue aislado a partir de muestras de carne provenientes del Camal Municipal de Cuenca, con presunta presencia de *L. monocytogenes*. Se realizó un hisopado y posterior enriquecimiento de las muestras en medio Listeria Fraser Broth, manteniéndose en incubación por 24 horas, a 37° C. Los tubos que mostraron crecimiento en este sistema fueron repicados en medio sólido enriquecido con un indicador de crecimiento de *Listeria*. Las colonias bien definidas, de un color verde azulado, fueron sometidas a pruebas bioquímicas y de características culturales, con el fin de confirmar género y especie del patógeno aislado. Luego de confirmar el aislamiento de *L. monocytogenes* mediante el procedimiento descrito, las colonias fueron mantenidas en un medio nutritivo, a 4° C.

Ensayo in vitro de actividad antibacteriana ante L. monocytogenes

La técnica de microdilución, adaptada del trabajo de Eloff (1998), fue utilizada para identificar los aceites esenciales inhibidores del crecimiento del patógeno de prueba.

Se prepararon soluciones 1:1 con los aceites esenciales, disueltos en caldo nutritivo. El bioensayo se desarrolló en placas de microdilución de 96 pocillos. Se preparó una dilu-

ción seriada de las soluciones de aceites esenciales, con el caldo nutritivo, obteniendo un rango de concentraciones de 250 a 2 ml. Finalmente, se adicionó a cada pocillo el inóculo bacteriano, proveniente de un cultivo líquido enriquecido con *L. monocytogenes*. Además, se realizaron controles de esterilidad y crecimiento bacteriano para garantizar la calidad del bioensayo. La placa fue incubada en una estufa a 37° C por 24 horas. La viabilidad de los microorganismos se determinó a través de la adición de 20 ml de solución acuosa (0.5 mg/ml) del colorante MTT (bromuro de 3-[4.5-dimetiltiazol-2-il]-2.5-difenil-tetrazolium) a cada pocillo y posterior incubación durante 30 min a 25° C. La absorbancia fue leída a $\lambda = 515$ nm, OD = 630 nm (Cazar, 2006).

Formulación de mezclas de aceites esenciales

Los aceites esenciales que demostraron la mejor actividad antibacteriana en el ensayo *in vitro* fueron investigados con el fin de potenciar su efecto antibacteriano en mezclas. Para el efecto se aplicó un diseño de mezclas Simplex-Lattice, en el cual se desarrollan diez experimentos para evaluar el efecto sinérgico de los componentes de una mezcla. Las mezclas fueron evaluadas en el ensayo *in vitro* descrito en la sección previa. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar la mezcla adecuada para probarse como preservante de productos cárnicos. A continuación se presenta la formulación utilizada en el diseño de mezclas de aceites bioactivos.

Tabla 1
Proporciones aplicadas en la formulación de las mezclas de aceites bioactivos

Experimento	Aceite 1	Aceite 2	Aceite 3
1	100%	0	0
2	0	100%	0
3	0	0	100%
4	50%	50%	0
5	0	50%	50%
6	50%	0	50%
7	33%	33%	33%
8	16.5%	16.5%	66%
9	16.5%	66%	16.5%
10	66%	16.5%	16.5%

Resultados

Rendimiento de extracción de aceites esenciales

En la siguiente tabla se presentan los rendimientos de extracción de aceites esenciales, expresados como porcentaje peso/volumen.

Tabla 2
Rendimiento de extracción de aceites esenciales

Especie vegetal	Material vegetal (gr)	Aceite esencial (mL)	Rendimiento (% p/v)
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

Aceites esenciales con actividad antibacteriana ante L. monocytogenes

El desarrollo del bioensayo descrito permitió establecer la efectividad de los aceites esenciales evaluados como inhibidores del crecimiento de *L. monocytogenes*. A continuación se presentan los resultados obtenidos, expresados como concentración inhibitoria mínima (CIM).

Tabla 3
Actividad antibacteriana de aceites esenciales ante *L. monocytogenes*

Especie	Actividad antibacteriana	CIM (ml)
Orégano (<i>O. vulgare</i>)	+	12.5
Menta (<i>M. pulegium</i>)	-	ND
Pino (<i>P. patula</i>)	-	ND
Romero (<i>R. officinalis</i>)	-	ND
Laurel (<i>L. nobilis</i>)	+	12.5
Hierba luisa (<i>C. citratus</i>)	+	25

Potencial de mezclas de aceites esenciales como inhibidores del crecimiento

Las mezclas formuladas con los aceites esenciales bioactivos presentaron los siguientes resultados, en relación a su actividad inhibitoria del crecimiento del patógeno de prueba.

Tabla 4
Actividad antibacteriana de mezclas de aceites esenciales ante *L. monocytogenes*

Formulación de la mezcla	Bioactividad	CIM (ml)
50% orégano y 50% laurel	+	6.25
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

Discusión

Los aceites esenciales son mezclas complejas naturales, las cuales pueden contener de 20 a 60 componentes en muy diferentes concentraciones. Debido a esta característica, los aceites esenciales presentan variadas actividades biológicas, entre las cuales se incluye la citotoxicidad ante células bacterianas. Como típicos lipófilos, atraviesan las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos. Por consiguiente, el daño de membrana causado por estos mecanismos es el responsable de la actividad antibacteriana. En las bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada con pérdida de iones y reducción del potencial de membrana, colapso de la bomba de protones y agotamiento del ciclo de ATP (Bakkali *et al.*, 2008).

En el trabajo presentado, se obtuvieron aceites esenciales con rendimientos que oscilan entre 0.88 a 0.05%. El aceite que presenta el mejor rendimiento de extracción es el de romero (*R. officinalis*).

La actividad antibacteriana de los aceites puros fue evaluada mediante un ensayo de microdilución. Esta técnica presenta ventajas en relación a los ensayos tradicionales, ya que se puede evaluar el potencial de una sustancia en menor cantidad y con un amplio rango de concentraciones. Los resultados obtenidos permitieron identificar a tres especies vegetales como productoras de aceites esenciales bioactivos: Orégano (*O. vulgare*), laurel (*L. nobilis*) y hierba luisa (*C. citratus*).

El efecto sinérgico de mezclas de aceites esenciales es una materia de estudio que genera interés, debido al potencial de esta aplicación en la preservación de alimentos. Los aceites esenciales no solo inhiben el crecimiento de microorganismos, sino que, en ocasiones, potencian el sabor de un alimento. La eficacia del aceite de orégano, puro o en mezcla con aceite de timo ha sido reportado previamente como inhibidor del crecimiento de *Salmonella* y *E. coli*. (Gutierrez *et al.*, 2008).

En nuestro trabajo se formularon mezclas con mejor actividad antimicrobiana que los componentes puros. Los resultados obtenidos validan la estrategia utilizada con el fin de formular un preservante de alimentos formulado a partir de aceites esenciales de plantas comunes en nuestra región.

Conclusiones

En el presente trabajo se muestra una estrategia de búsqueda de aceites esenciales inhibidores del crecimiento de una bacteria contaminante de alimentos, *L. monocytogenes*. Con el fin de preservar la calidad y seguridad de los alimentos, es necesario buscar estrategias de preservación de alimentos basadas en el uso de productos naturales.

La investigación desarrollada muestra que las especies vegetales comunes en nuestro entorno producen aceites esenciales bioactivos, los cuales pueden servir de base para la formulación de preservantes de alimentos. La estrategia del diseño de mezclas permite estudiar el efecto sinérgico de las mezclas de aceites esenciales. Mediante esta aproximación se logró obtener un preservante con mejor actividad antibacteriana que sus precursores.

Referencias

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, S. y Idaomar, M.
2006 "Biological effects of essential oils-A review". *Food y Chemical Toxicology* **46**(2): 446-475.
- Bourgeois, C.
1995 *Microbiología alimentaria*. España: Acribia.
- Brooks G.F.J. Butel, y Morse S.
2002 *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Bogotá: El Manual Moderno.
- Buchanan, B., Grissem y Jones, R.
2000 "Biochemistry y Molecular Biology of plants". American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD.
- Cazar, M. E.
2006 "Fungicidas y bactericidas de microorganismos de suelo". Tesis de la Universidad de Talca. Chile.
- Gandhi, M., Chikindas, L.
2006 "*Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive". *International Journal of Food Microbiology*, 113: 1-15.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, D. y Bourke, P.
2008 "The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations y interaction with food ingredients". *International Journal of Food Microbiology*, 124(1): 91-97.
- Eloff, J.
1998 "A sensitive y quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria". *Planta Medica*, **64**: 711-713.
- 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, Sociedad Chilena de Microbiología e Higiene de los Alimentos, Santiago.