



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta**

**Andrés Felipe Morales Castro**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos

Medellín, Colombia

2015

# **Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta**

**Andrés Felipe Morales Castro**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar título de:

**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Director:

Z. Esp. MSc. José Víctor Higuera Marín

Codirectora:

Ph.D. Edith Marleny Cadena Chamorro

Línea de Investigación:

Conservantes naturales en derivados lácteos

Grupo de Investigación:

Ingeniería Agrícola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos

Medellín, Colombia

2015

*“Lo que hacemos por nosotros mismos  
muere con nosotros, lo que hacemos por  
los demás y por el mundo permanece y es  
inmortal.”*

*Albert Pike (1809-1891)*

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por darme sabiduría y paciencia en este camino, solo en él glorificare mis triunfos. De manera especial quiero agradecer a mis directores de Tesis, al Profesor José Víctor Higuera Marín y la Profesora Edith Marleny Cadena Chamorro, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este arduo trabajo y por su gran dedicación y empeño en lo que es realmente importante, mi formación; son un ejemplo como profesionales y como personas. A la Universidad Nacional de Colombia, mi amada Alma Máter que me dio la oportunidad de ingresar a su programa de posgrados, además de apoyarme para integrar el selecto grupo de jóvenes investigadores de COLCIENCIAS y por la financiación a través del programa de fortalecimiento de proyectos de investigación de posgrados; todo esto bajo el amparo del grupo de investigación de Ingeniería Agrícola; gracias a usted Profesor Iván Darío Aristizábal Torres quien confió en nosotros.

Al laboratorio de Frutas y Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por su disponibilidad en la investigación; especialmente al Ingeniero Fernando Arenas Gil quien siempre estuvo presente para mis constantes dudas; ingeniero es usted un gran modelo a seguir en este camino científico.

Estas últimas líneas se las dedico a mi familia, quienes me han apoyado incondicionalmente. Para mis padres ya que sus esfuerzos me han dado la oportunidad de vivir mis sueños, jamás tendré como pagar todo lo me han dado. Para mis hermanos ya que de ellos aprendí la esencia del respeto y el deseo de salir adelante; gracias a cada uno de ustedes por estar presentes.

## Resumen

Se evaluó el uso del Aceite Esencial (AE) del tomillo como un aditivo alimentario, con el objetivo de otorgar efecto antimicrobiano, prolongando la vida de anaquel del queso Ricotta. El efecto biocida es atribuido principalmente a la acción de los componentes bioactivos sobre la membrana celular de algunas bacterias. Por ende se llevó a cabo la extracción del AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) a través del método de arrastre por vapor, alcanzando rendimientos cercanos al 0.6%. La caracterización del quimiotipo demostró que el componente activo mayoritario es el Timol con una abundancia relativa de 30.97%. Con respecto al efecto antimicrobiano, contra la actividad patógena de *Listeria monocytogenes*; se desarrolló un protocolo de prueba *In Vitro* donde a través de la formación de halos de inhibición se determinó la menor concentración con efecto inhibitorio. El aceite esencial de tomillo presentó actividad al ser usado en concentraciones no menores del 1.6%, mostrando halos de inhibición de 11.67 mm. El queso Ricotta formulado con AE de tomillo, presentó características fisicoquímicas propias de un queso firme/semiduro descremado. En cuanto al perfil sensorial, el queso con AE presentó calidad alta en aspectos como textura y apariencia general. La evaluación microbiológica a las 48 horas de elaboración cumplió con los requerimientos exigidos por la normatividad colombiana (Resolución 02310 y NTC 750). La prueba de estabilidad microbiológica realizada durante un periodo de 28 días, determinó que el recuento de *L. monocytogenes* pasó de valores de  $1.5 \times 10^6$  UFC/g a valores de 5000 UFC/g al día 14 de evaluación.

**Palabras clave.** Aceite esencial, Análisis sensorial, Arrastre de vapor, Concentración inhibitoria, Halos de inhibición, Quimiotipo, Timol.

## Abstract

The use of essential oil (EO) of thyme as a food additive was evaluated with the aim of providing an antimicrobial effect for prolonging the shelf life of Ricotta cheese. The biocidal effect is chiefly attributed to the action of bioactive compounds on the cell membrane of some bacteria. Thus, the EO extraction of thyme (*Thymus vulgaris*) was carried out through the steam stripping method, reaching yields close to 0.6%. Chemotype characterization showed that the majority active component is Thymol with a relative abundance of 30.97%. Regarding antimicrobial effect against the pathogenic activity of *Listeria monocytogenes*, the test protocol was developed *In Vitro* of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which determined that the essential oil of thyme has activity when used in concentrations no less than 1.6%, showing halos of inhibition of 11.67 millimeters. Ricotta cheese made with thyme AE, presented physicochemical characteristics typical of a firm/semi-hard skim cheese. As for the sensory profile, cheese with oil presented high quality in areas such as texture and overall appearance. Microbiologically, at 48 hours of preparation, the requirements established by Colombian law were fulfilled. Microbiological stability testing for cheese during 28 days of evaluation determined that *L. monocytogenes* counts went from values of  $1.5 \times 10^6$  CFU/g to values of 5000 CFU/g during 14 days of assessment.

**Keywords.** Essential oil, Sensory Analysis, Steam stripping, Inhibitory concentration, Halos of inhibition, Chemotype, Thymol.

# Contenido

<b>CONTENIDO</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	<b>12</b>
<b>1 CAPÍTULO. ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b>33</b>
1.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs).....	33
1.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
1.2. MÉTODOS DE PREVENCIÓN DE ETAS .....	23
1.2.1. <i>Tratamientos Térmicos</i> .....	24
1.2.2. <i>Conservantes Químicos</i> .....	24
1.2.3. <i>Conservación con sustancias naturales</i> .....	25
1.3. ACEITES ESENCIALES (AEs) .....	27
1.3.1. <i>Métodos de Extracción de los Aceites Esenciales</i> .....	27
1.3.2. <i>Caracterización del Quimiotipo de los AEs</i> .....	29
1.4. CONCENTRACIONES O DILUCIONES MÍNIMAS PARA EVALUAR EL EFECTO BIOCIDA DE LOS AEs.....	30
1.4.1. <i>Método de Difusión en Agar</i> .....	30
1.5. MERCADO NACIONAL DE LOS AEs .....	31
1.6. TOMILLO ( <i>THYMUS VULGARIS</i> ) .....	33

1.6.1. <i>Cultivo del Tomillo en Colombia</i> .....	34
1.7. QUESO RICOTTA.....	38
BIBLIOGRAFÍA. ....	40
<b>2 CAPÍTULO. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL (AE) DEL TOMILLO (<i>THYMUS VULGARIS</i>) SOBRE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>.....</b>	<b>44</b>
2.1. RESUMEN.....	44
2.1 SUMMARY .....	46
2.2 INTRODUCCIÓN.....	47
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
2.1.1. <i>Lugar de estudio</i> .....	49
2.1.2. <i>Material vegetal</i> .....	49
2.1.3. <i>Proceso de Extracción</i> .....	50
2.1.4. <i>Caracterización del AE de Tomillo</i> .....	50
2.1.5. <i>Preparación del inóculo</i> .....	50
2.1.6. <i>Preparación del AE de Tomillo</i> .....	51
2.1.7. <i>Determinación de la menor concentración con efecto inhibitorio del AE de Tomillo</i> .....	51
2.1.8. <i>Análisis estadístico</i> .....	52
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	52
2.1.9. <i>Proceso de extracción del aceite esencial de Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)</i>	
52	
2.1.10. <i>Caracterización del AE de Tomillo</i> .....	55
2.1.11. <i>Determinación de la menor concentración con efecto inhibitorio del AE de Tomillo</i> .....	59

2.5 CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA .....	68
<b>3 CAPÍTULO. ACTIVIDAD BIOCIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (<i>THYMUS VULGARIS</i>) CONTRA <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN QUESO RICOTTA .....</b>	<b>74</b>
3.1. RESUMEN.....	74
3.1 SUMMARY .....	76
3.2. INTRODUCCIÓN.....	77
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
3.3.1. <i>Lugar de estudio</i> .....	79
3.3.2. <i>Elaboración de queso Ricotta con adición de AE de tomillo</i> .....	79
3.3.3. <i>Caracterización físico química del queso Ricotta con AE de tomillo ..</i>	80
3.3.4. <i>Evaluación microbiológica del queso adicionado con Aceite Esencial</i>	80
3.3.5. <i>Evaluación sensorial del Queso Ricotta con AE</i> .....	81
3.3.6. <i>Recuento Listeria monocytogenes en queso Ricotta con AE</i> .....	81
3.3.7. <i>Análisis estadísticos</i> .....	82
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	82
3.4.1. <i>Caracterización del queso Ricotta con AE de tomillo</i> .....	82
3.4.2. <i>Evaluación sensorial del queso Ricotta con AE</i> .....	85
3.4.3. <i>Efecto Inhibitorio del AE de tomillo sobre el Recuento de L.monocytogenes en queso Ricotta</i> .....	87
3.5. CONCLUSIONES.....	90
BIBLIOGRAFÍA .....	92
<b>RECOMENDACIONES GENERALES.....</b>	<b>96</b>

## Lista de tablas

Tabla 1-1. Total casos enfermedad transmitidas por alimentos año 2007-2010. . 17	
Tabla 1-2. Estudios de prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en quesos frescos en Colombia (2005-2009).....	20
Tabla 1-3. Composición química de 6 especies aromáticas. ....	26
Tabla 1-4. Área sembrada (ha) y producción en fresco (t) de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias por departamento y año en Colombia. ....	37
Tabla 1-5. Área cosechada en hectáreas y volumen de cosecha en toneladas de hierba aromática en Colombia.....	38
Tabla 2-1. Análisis de varianza para determinar diferencia en el rendimiento de extracción del AE esencial a diferentes edades de corte. ....	53
Tabla 2-2. Composición química del AE de <i>Thymus vulgaris</i> a diferentes edades a cosecha .....	56
Tabla 2-3. Composición general del AE de tomillo de 14 semanas al corte.....	59
Tabla 2-4. Efecto inhibitorio del AE de tomillo sobre <i>L. monocytogenes</i> .....	60
Tabla 2-5. Análisis de varianza del halo de inhibición de las concentraciones del AE de tomillo. ....	61
Tabla 2-6. Prueba de Tukey con nivel de significancia del 95%.....	62
Tabla 3-1. Efecto de la inclusión del AE de tomillo sobre las propiedades fisicoquímicas del queso Ricotta. ....	83
Tabla 3-2. Análisis microbiológico del queso Ricotta formulado con AE de tomillo. ....	84
Tabla 3-3. Requisitos microbiológicos para queso fresco. ....	84

## Lista de figuras

Figura 1-1. Incidencia de ETA en el departamento de Antioquia, años 2007-2009 .....	17
Figura 1-2. Frecuencia de <i>L. monocytogenes</i> aisladas según categorías de alimentos, Colombia 2000-2009.....	19
Figura 1-3. Muestras de queso positivas para <i>L. monocytogenes</i> distribuidas por departamentos (2000-2009).....	21
Figura 1-4. Equipo de laboratorio para arrastre con vapor.....	29
Figura 1-5. Cadena de plantas aromáticas, medicinales, condimentarías y afines. .....	36
Figura 2-1. Rendimientos de extracción del aceite esencial del tomillo .....	54
Figura 2-2. Porcentaje de los componentes mayoritarios del AE de Tomillo a 12, 14 y 16 semanas de edad al corte. ....	58
Figura 3-1. Perfil sensorial por aproximación multidimensional.....	86
Figura 3-2. Efecto antimicrobiano del AE de tomillo adicionado en queso Ricotta.	88

## Introducción

Las enfermedades de origen alimentario, denominadas ETAs, son originadas por la ingestión de alimentos incluida el agua, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan al consumidor. Estos agentes ya sean químicos o microbiológicos son debidos a la deficiencia en el proceso de elaboración, manipulación, conservación, transporte, distribución o comercialización (Peña *et al.*, 2013). La preocupación por el control de microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* se ha aumentado debido a las altas tasas de mortalidad y morbilidad que estos generan al ser ingeridos en alimentos contaminados; por ende atender la presencia de estos Bacilos Gram-positivos, es de gran importancia debido a que tienen la capacidad de crecer en alimentos ácidos (*B. cereus*) y no ácidos (*L. monocytogenes*). En este selecto grupo de alimentos la leche, los quesos, helados, verduras crudas y carne cruda se convierten en un perfecto medio de cultivo (Carrascal *et al.*, 2006). Debido al alto riesgo que presentan estos agentes patógenos, la industria alimentaria ha desarrollado diferentes métodos con el fin de garantizar inocuidad y lograr prolongar la vida de anaquel de diferentes productos; dichos procesos tienen como fin evitar la proliferación microbiana. Dentro de los métodos de control más utilizados se encuentran los tratamientos térmicos (pasterización, esterilización), la irradiación, el almacenamiento a bajas temperaturas, el uso de conservantes químicos y la tendencia actual hacia el uso de conservantes naturales con actividad antimicrobiana, grupo en el cual se enmarca el uso de los Aceites Esenciales (AEs) derivados de las plantas. El aumento en el consumo de alimentos funcionales y naturales, ha obligado a la industria de alimentos crear alternativas en la innovación y uso de aditivos alimentarios que otorguen además de características

organolépticas, mejoras en procesos de elaboración y conservación. Las sustancias de origen natural han sido usadas con el propósito de proveer calidad sensorial, microbiológica y reemplazar sustancias químicas que han sido catalogadas desde hace varios años como los grandes actores en la causa de las enfermedades modernas. Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades denominadas en la industria como nutracéuticas además de la gran capacidad biocida contra una amplia gama de organismos como bacterias y hongos, además de presentar mejor biodegradabilidad comparado con antibióticos y conservantes disponibles en el mercado (García *et al.*, 2010). Las plantas tienen la capacidad para sintetizar sustancias aromáticas, siendo la mayoría de sus componentes, fenoles o sus derivados oxigenados. Dentro de los extractos vegetales que se han logrado extraer se pueden resaltar al Timol y el Carvacrol presentes en AEs de Orégano y Tomillo, de estos se han reportado efectos inhibitorios sobre bacterias y hongos. Debido a su naturaleza hidrófoba, el efecto consiste en la capacidad de incrementar la fluidez de la membrana y salida de iones de potasio, conduciendo a una disminución en el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática y un colapso en el potencial de membrana, además de la inhibición en la síntesis de ATP, finalmente estos eventos son seguidos de la muerte celular (Solís, 2012). Se ha planteado que las bacterias expresan diferentes grados de resistencia a la presencia de antimicrobianos. Los AEs tienden a afectar a un mayor número de bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes*) con respecto a las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *S. typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosas*), comportamiento atribuido a la presencia de lipopolisacáridos (LPS) que componen la superficie de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Dussault *et al.*, 2013). La presencia niveles de Magnesio en la membrana externa aumentan la reticulación entre los LPS, lo que reduce el tamaño de las porinas y en última instancia limitan la migración de moléculas antimicrobianas. Además bacterias que tienen la capacidad de producir biofilms tienen una protección adicional de sus exopolisacaridos hidrófilos contra una amplia gama de compuestos biocidas (Kavanaugh y Ribbeck, 2012). Los AEs se utilizan en variedad de productos alimenticios, como los extractos de sabores, jugos de fruta, en los

derivados cárnicos, para productos horneados, en dulces, condimentos y jarabes. Un gran número de AEs han sido registrados por la Comisión Europea como saborizantes en alimentos debido a que no presentan riesgos en la salud del consumidor; la FDA los ha considerado como sustancias GRAS (Generally Regarded as Safe) y han sido aprobados como aditivos (Sauceda, 2011). Estos Aceites son extraídos desde hace muchas décadas de plantas empleadas con fines medicinales, podemos resaltar entre ellas al Tomillo que tradicionalmente ha sido utilizado en la medicina popular como astringente, expectorante, antihelmíntico, antiespasmódico, antiséptico y antifúngico. De hecho, en el siglo XIX cuando todavía no se conocían los antibióticos, el Tomillo era considerado como un eficaz desinfectante y desde entonces sus propiedades farmacológicas han sido estudiadas en detalle, esto ha conllevado a importantes contribuciones en la industria para ser usado como aditivo en los alimentos (Bach *et al.*, 2003). En la actualidad el reporte del uso de AEs en productos lácteos es escaso, en comparación con investigaciones desarrolladas en cárnicos y en la industria de confitería. Los derivados lácteos, principalmente los quesos han sido desde tiempos ancestrales productos alimenticios de mayor consumo y tradición convirtiéndose en un producto importante en la dieta de casi todas las sociedades, por presentarse como gran fuente de calcio y permitir la ingesta de nutrientes que proporciona la leche cuando esta no es consumida por salud, preferencias o accesibilidad. Los quesos debido a su composición físico-química han sido considerados como un alimento de cuidado en salud pública al ser asociados a casos de abortos en mujeres embarazadas y meningitis infantil; en este sentido, los análisis microbiológicos han reportado prevalencias para *L. monocytogenes*; microorganismo que en Colombia se ha reportado para algunos casos de infección con índices de mortalidad del 26%, aunque en la actualidad se habla de subregistros (Gallegos *et al.*, 2007). Los reportes sobre ETAs en Colombia permiten evidenciar que los alimentos procesados, los productos cárnicos y los productos lácteos son los que frecuentemente están relacionados como fuente de contaminación con microorganismos patógenos (Campo *et al.*, 2008).

El factor más alarmante no es la incidencia, sino la tasa de hospitalización que supera a la mayoría de los patógenos implicados en enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Gallegos *et al.*, 2007). La preocupación sobre este patógeno surge teniendo en cuenta que entre 1995 y 2009 se identificaron en el mundo 11 brotes de listeriosis asociados al consumo de quesos, con 545 personas afectadas, tasas de mortalidad estimadas entre el 14 y 30 % y aunque en Colombia no existen datos similares, se supo según el reporte al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) de 2009, de un caso con manifestaciones de meningitis en un niño de nueve años, debido al consumo de queso fresco contaminado (Muñoz *et al.*, 2013); además surge la gran preocupación en la prevalencia de *L. monocytogenes* en manipuladores de alimentos de empresas dedicadas a la producción de derivados lácteos.

El queso en Colombia hace parte de la canasta básica, son elaborados de manera industrial y artesanal, existiendo mayor riesgo de contaminación con patógenos en la producción artesanal debido principalmente a la falta de implementación de Buenas Prácticas de Manufactura. Como consecuencia del impacto de estos patógenos en la salud pública, el Sistema Nacional de Salud y Ministerio de Protección Social reporta que en el 2010, la Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA) recolectó y consolidó los resultados de acciones de inspección, vigilancia y control de once direcciones territoriales de salud del país, en los cuales se incluían 3.700 muestras de queso analizadas para *L. monocytogenes* en el periodo 2000-2009, de estas el 18,78% resultaron positivas y el 96% de las muestras correspondían a queso fresco tipo campesino; además los datos recopilados para los departamentos de Antioquia, Bogotá, Caldas, Córdoba, Cundinamarca, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Valle y Vichada la prevalencia de *Listeria* para queso fresco fue de 18,40%, donde la mayor prevalencia se presentó en el departamento de Antioquia. Por ende se hace necesario e indispensable el estudio y desarrollo de alternativas sobre el control e inhibición de microorganismos causantes de ETAs, con el fin de preservar alimentos y proporcionar seguridad a los consumidores; una alternativa es el uso de aditivos

naturales como lo son los AEs, que pueden otorgar a los alimentos calidad microbiológica, debido a su actividad biocida, reduciendo el riesgo de contraer enfermedades, además de atribuir características organolépticas que den valor agregado a los productos. A través del uso de los AEs, se buscan características antimicrobianas, que son atribuidas principalmente a la acción de los compuestos bioactivos sobre la membrana celular de algunas bacterias prolongando la vida de anaquel (Ben Arfa *et al.*, 2006).

Por este motivo nace la necesidad de profundizar en el estudio y uso de estos conservantes naturales en derivados lácteos, enfatizando en uno de los productos con gran aceptación y consumo como son los quesos frescos; específicamente en la elaboración del Queso Ricotta de gran aporte nutricional gracias al alto valor biológico de los aminoácidos presentes. El consumo de este queso se ha visto disminuida esencialmente por dos factores; desconocimiento de su aporte nutricional y su tiempo de vida útil menor, comparado con otro tipo de quesos posicionados en el mercado. Dado lo anterior, se llevó a cabo la extracción del AE del Tomillo (*Thymus vulgaris*) a través del método de arrastre por vapor, con el propósito de evaluar sus efectos antimicrobianos al ser utilizados en la elaboración del queso Ricotta, con el fin de inhibir la actividad patógena de la *L. monocytogenes*, microorganismo causante de ETAs e indicador de malas prácticas de higiene. En la evaluación se desarrolló un protocolo de prueba de la actividad del AE utilizando métodos *In Vitro*, con el objetivo de determinar la menor concentración con efecto inhibitorio, que impide el crecimiento de la bacteria, enfrentado a un número concreto de unidades formadoras de colonia (UFC) y la metodología de pruebas *In Vivo* realizando recuentos microbiológicos durante el tiempo de vida de anaquel estipulado para los quesos frescos. Con esta investigación se pretende profundizar en los conocimientos relacionados con la tendencia en el consumo de alimentos funcionales y naturales, basados en el estudio de sustancias con efectos nutraceuticos y aportando valiosa información sobre los efectos en el uso de los AE como aditivos alimentarios.

Por todo lo anterior el objetivo principal del proyecto consiste en determinar el efecto del AE del tomillo (*Thymus vulgaris*), en términos de estabilidad microbiológica, con

respecto a su mecanismo biocida sobre *L. monocytogenes* y la calidad sensorial al ser utilizado en la elaboración del queso Ricotta. Para esto se hace necesario:

- Determinar el mecanismo de acción de los AEs que otorga efecto antimicrobiano.
- Identificar los componentes químicos mayoritarios del AE del tomillo con efecto biocida.
- Determinar la menor concentración inhibitoria in-vitro, del AE de tomillo sobre *L. monocytogenes*.
- Evaluar el crecimiento de *L. monocytogenes* sobre el queso Ricotta formulado con AE de tomillo.
- Evaluar posibles cambios en características organolépticas y microbiológicas durante el tiempo de vida útil del queso Ricotta.

Los resultados de la presente investigación serán relacionados con la elaboración de tres capítulos (donde dos de ellos son artículos de revista), dando cumplimiento a cada uno de los objetivos específicos establecidos en el desarrollo del proyecto de la siguiente manera:

**Capítulo 1.** Estado de Arte.

**Capítulo 2.** Artículo 1. “Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial (AE) del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre *Listeria monocytogenes*”.

**Capítulo 3.** Artículo 2. “Actividad biocida del Aceite Esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Listeria monocytogenes* inoculada en queso Ricotta”.

## Bibliografía.

- Bach, E., Lagos, R., & Rosa, L. (2003). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. "Tomillo" frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis, (Mic).
- Ben Arfa, A., Combes, S., Gontard, N., & Chaliier, P. (2006). y hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154.
- Campo, A., Espinosa, J., Vargas, M., Álvarez, C., Rodríguez, S., & Chávez, J. (2008). Prevalencia de agentes patógenos asociados a grupos de alimentos de alto riesgo en salud pública, Colombia, 2007. *Inf Quinc Epidemiol Nac*, 13, 351–366.
- Carrascal, A. K., Sarmiento, P., Albarracin, F. Y., & Mercado, M. (2006). Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 4(2), 30–41.
- Dussault, D., Vu, K. D., & Lacroix, M. (2013). In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 96(1), 514–20.
- Gallegos, J., Arrieta, G., Máttar, S., Poutou, R., Trespalacios, A., & Carrascal, A. (2007). frecuencia de *Listeria spp.*, en quesos Colombianos costeños, 12(2), 996–1012.
- García, C., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.
- Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057–4061.
- Muñoz, Á. B., Chaves, J. A., Rodríguez, E. C., & Realpe, M. E. (2013). *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria . *Biomédica*.
- Peña, Y. P., Castillo, I. V. L., Antonia, I. B., Maceo, R., Lic, I. I., & Pérez, Y. (2013). Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana , 2006-2010, 51(1), 74–83.

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

Sistema nacional de Salud y Ministerio de protección social. (2011). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. *Ministerio de Salud Y Protección Social Unidad de Evaluación de Riesgos Para La Inocuidad de Los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud INS 2011 Bogotá D.C., 2011.*

Solís, P. N. (2012). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de Orégano (*Origanum vulgare l.*) y Tomillo (*Thymus vulgaris l.*) como Potenciales Bioconservadores en Carne de Pollo.

# 1 Capítulo. Estado del arte

## 1.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son definidas como una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico causada por el consumo intencional, accidental o incidental de alimentos o agua, que sufrieron contaminación en cantidades suficientes con agentes químicos o microbiológicos (Orberá, 2004). Con estudios realizados durante varios años por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Organización Panamericana de Salud (OPS) y el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) se ha demostrado que las ETA pueden manifestarse de tres formas (Estibaliz y López, 2008):

- a) Intoxicaciones causadas por alimentos; cuando las toxinas o venenos de bacterias u hongos están presentes en el alimento.
- b) Toxi-infecciones causadas por alimentos; cuando ocurre ingesta de alimentos contaminados con microorganismos capaces de producir toxinas.
- c) Infecciones transmitidas por alimentos; causadas por la ingesta de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos.

Las ETAs tienen gran impacto en la salud pública y en la economía en todo el mundo asociado a factores como el crecimiento de la población, la pobreza, la urbanización en países subdesarrollados, el comercio internacional de alimentos para humanos y animales y sin dejar de lado la aparición de nuevos agentes productores de ETA debido a mutaciones dando mayor patogenicidad (Gandhi y Chikindas, 2007). En los países latinoamericanos donde estos problemas se han intensificado desde 1989 hasta la fecha; la Organización Panamericana de Salud (OPS) ha trabajado con estados miembros para fortalecer los programas nacionales de vigilancia. Sin embargo la debilidad en dichos programas de control epidemiológico, en cuanto a notificación de enfermedades, investigación de los brotes y el análisis de datos para

la toma de decisiones, ha dificultado identificar realmente el tipo de microorganismos causantes de la patogenicidad debido al consumo de alimentos contaminados (Kopper *et al.*, 2009).

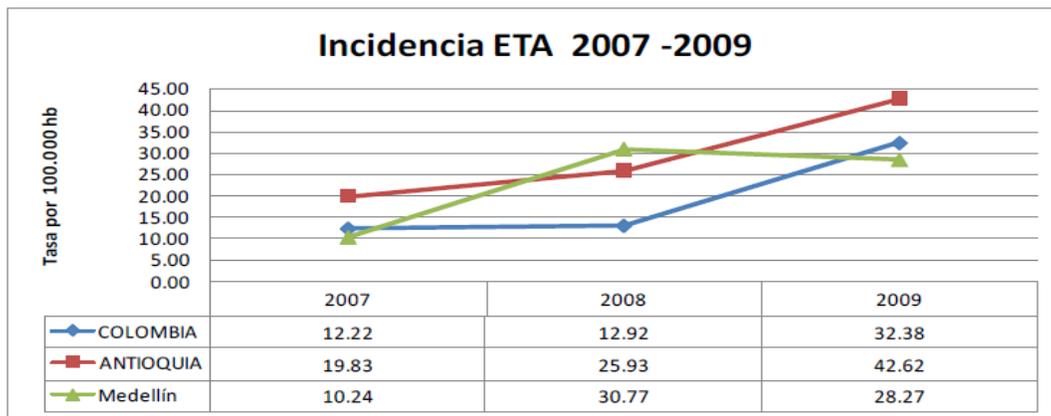
La información disponible sobre las ETAs para Latinoamérica indica que están entre las cinco grandes causas de muerte en niños menores de cinco años, teniendo episodios diarreicos anuales por niño y un significativo aumento en la morbimortalidad, lo que hace necesario mantener su vigilancia epidemiológica para aplicar medidas oportunas que permitan su control y prevención. Según los informes para el año 2005, se reporta que 1,8 millones de personas murieron a causa de enfermedades diarreicas. Una gran proporción de estos casos se puede atribuir a la contaminación de alimentos y fuentes de agua potable (Estibaliz y López, 2008). Para Colombia se ha identificado incremento en los últimos años según los reportes de brotes de enfermedades alimentarias ante el sistema nacional de vigilancia, en el caso específico, el departamento de Antioquia registró alta participación en los casos reportados en el país (Tabla1-1), además de una alta incidencia de ETAs comparada con el resto del país, como se evidencia en la Figura 1-1. Cabe resaltar que este comportamiento es de acuerdo a los diferentes desarrollos en los sistemas de diagnóstico y vigilancia (realmente deficientes para el reporte de casos de intoxicación por algunos microorganismos patógenos); no necesariamente indica que exista mayor número de casos o brotes en el departamento de Antioquia. El Instituto Nacional de Salud (INS), en el 2010 registró para el caso específico de la ciudad de Bogotá, que enfermaron 2.715 personas por ETAs, de las cuales 241 fueron hospitalizadas y murieron dos personas. En el 28% de los brotes se realizó estudio de muestras clínicas y en el 32% se analizaron alimentos posiblemente involucrados.

**Tabla 1-1.** Total casos enfermedad transmitidas por alimentos año 2007-2010.

AÑO	COLOMBIA	ANTIOQUIA	MEDELLÍN
2007	5366	1157	232
2008	5743	1533	705
2009	14562	2552	655
2010 (Semana 34)	6521	1814	306

**Fuente:** Instituto Nacional de Salud, DSSA y SIVIGILA Secretaria de Salud Medellín, 2010

En los brotes donde se logró la identificación del agente causal, el 16% correspondió a Coliformes totales y el 14% a *Salmonella spp*; el 2% restante de los análisis no se identificó ningún agente, atribuido a la deficiencia en reporte y análisis que existe en el país para algunos microorganismos patógenos, como es el caso de *L. monocytogenes*.



**Fuente:** Instituto Nacional de Salud, DSSA y SIVIGILA Secretaria de Salud Medellín, 2010

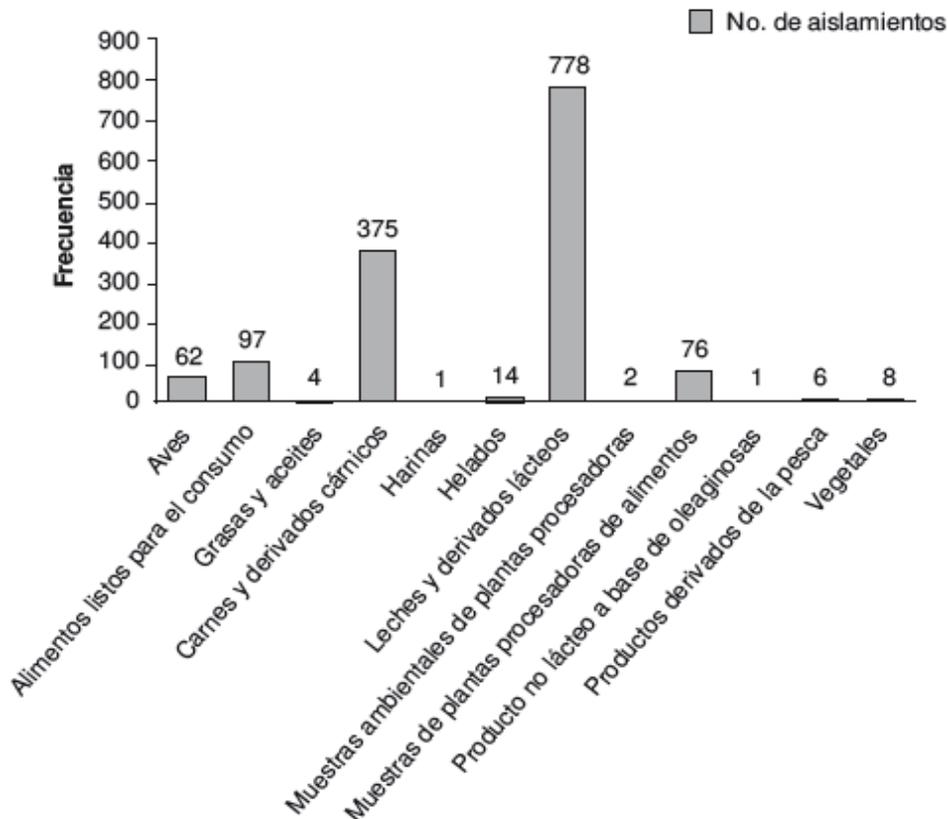
**Figura 1-1.** Incidencia de ETA en el departamento de Antioquia, años 2007-2009

Alimentos con características fisicoquímicas como pH cercano a la neutralidad, actividad de agua superior a 0,92 y alto contenido de proteínas y grasas, permiten que su superficie se contamine con diversos microorganismos, donde se incluyen los patógenos como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. En este sentido el laboratorio del Instituto Nacional de Vigilancia de

Medicamentos y Alimentos (INVIMA), confirmó la frecuencia de *L. monocytogenes* aislada de alimentos obtenidos en diferentes zonas del país; la información obtenida registró 1,035 alimentos contaminados en Bogotá (73 %); 199 en Antioquia (14 %); 109 en Nariño (8 %); 50 en el Valle del Cauca (3,5%), y 33 (2,3%) en los departamentos de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Caldas, Córdoba, San Andrés, Magdalena y Norte de Santander. Las categorías de alimentos, más frecuentes, según su procedencia, fueron leche y sus derivados con 486 (34,1%) y carnes y sus derivados con 326 (22,9%) aislamientos en Bogotá.

Cuando se habla de categorías, para alimentos con la mayor frecuencia de aislamientos de *L. monocytogenes*, los lácteos y derivados cárnicos son el mayor renglón de preocupación (Figura 1-2), debido a esto los derivados lácteos toman gran importancia en Colombia, donde se han reportado casos en brotes causados por enfermedades alimentarias; particularmente en la comercialización de quesos frescos que representa alto margen en la economía del sector agroindustrial. (Muñoz, 2012).

*L. monocytogenes* es el agente causal de la Listeriosis, una de las enfermedades más importantes adquirida en el 99% de los casos por el consumo de alimentos contaminados. Es una bacteria patógena, de carácter zoonótico y de amplia distribución en la naturaleza (agua, suelo, vegetación, entre otros). Esta bacteria ha sido asociada a alimentos tales como la leche, quesos y productos cárnicos. Afecta principalmente a los niños, ancianos, mujeres gestantes y personas inmunosuprimidas, ocasionando abortos, meningoencefalitis y meningitis (Heiman *et al.*, 2015).



Fuente: Muñoz ,2012

**Figura 1-2.** Frecuencia de *L. monocytogenes* aisladas según categorías de alimentos, Colombia 2000-2009.

Entre 1995 y 2009 se identificaron en el mundo 11 brotes de Listeriosis asociados al consumo de quesos, con 545 personas afectadas, con tasas de mortalidad estimadas entre el 14% y 30% y de hospitalización hasta del 100% (Fretz *et al.*, 2010). En Colombia no hay reportes de brotes de Listeriosis asociados al consumo de queso, sin embargo, en el 2009, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) reportó un caso con manifestaciones de meningitis en un niño de 9 años debido al consumo de queso fresco (Sistema Nacional de Salud y Ministerio de protección social, 2011). El Instituto Nacional de Salud conjunto con el Ministerio de Protección Social en el año 2010 evaluó los riesgos de la contaminación de quesos frescos con *L. monocytogenes*, reportando que el queso campesino aparece como aquel que presenta mayor prevalencia de este microorganismo. Con esta información establecieron que las zonas geográficas con

mayor riesgo de contaminación eran Antioquia, Nariño y el Distrito de Bogotá, como se puede evidenciar en la Tabla 1-2, donde se presentan los datos de *L. monocytogenes* aisladas de quesos frescos reportados en algunos estudios de investigación.

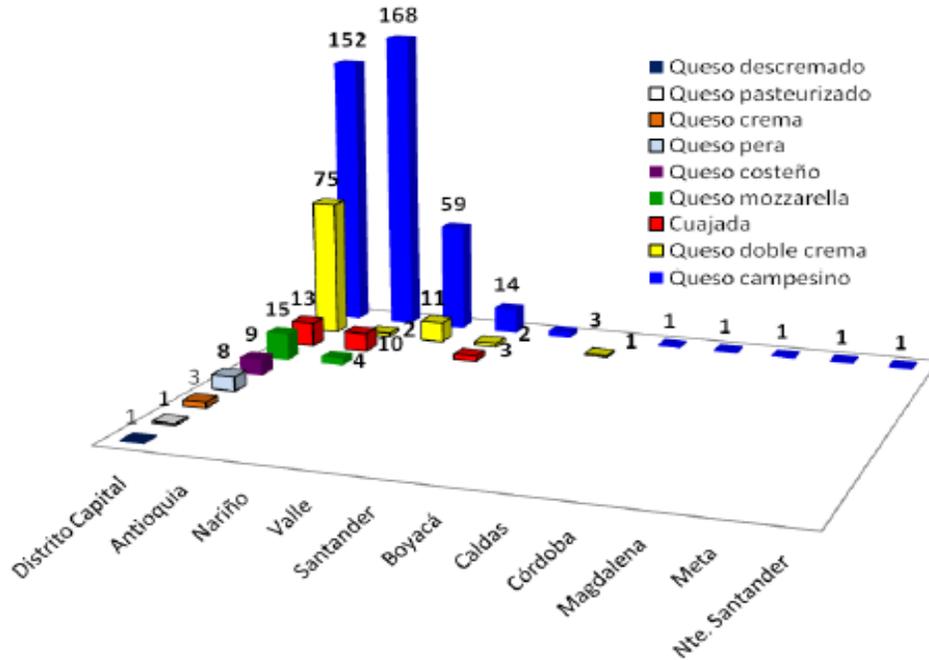
**Tabla 1-2.** Estudios de prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos en Colombia (2005-2009).

Producto	Lugar	Muestras analizadas (n)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
Queso blanco	Antioquia	172	57 (33,1%)
Queso blanco artesanal	Cundinamarca (Cáqueza)	30	(13,3%)
Queso fresco	Norte de Santander (Pamplona)	74 Doble crema	5 (6,75%)
		83 queso de hoja	5 (6,02%)
		28 cuajada	1 (3,57%)
Queso costeño	Córdoba (Montería y Cereté)	217	0 (0)

**Fuente:** Sistema Nacional de Salud, Ministerio de Protección Social, 2011

La Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA), recolectó y consolidó los resultados de las acciones de inspección, vigilancia y control de once direcciones territoriales de salud del país. Los reportes incluían, 3.700 muestras de queso analizadas para *L. monocytogenes* en el periodo 2000-2009, de las cuales el 18,78% resultaron positivas para este patógeno. De estas muestras el 96% corresponde a queso fresco tipo campesino (Sistema Nacional de Salud y Ministerio de protección social, 2011).

En la Figura 1-3, se muestra la prevalencia de *L. monocytogenes* en diferentes tipos de quesos provenientes de los departamentos de Antioquia, Nariño y el Distrito Capital. Es importante aclarar que algunos tipos de quesos se podrían encontrar clasificados inapropiadamente, tal como el reportado como “queso pasteurizado”, de igual forma no aparecen datos sobre el “quesito antioqueño” en el departamento de Antioquia siendo éste el de mayor producción en la zona.



Fuente: Invima, 2010; Ministerio de Protección Social, 2011

**Figura 1-3.** Muestras de queso positivas para *L. monocytogenes* distribuidas por departamentos (2000-2009).

### 1.1.1. *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* es una bacteria Gram-positiva, aerobia o anaerobia facultativa, móvil, no esporulado, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas entre 1°C y 45°C con un óptimo a 37°C. Se le considera un patógeno psicrótrofo, es decir, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración, lo cual le diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas. En cuanto al pH, desarrolla en un rango entre 4,4 y 9,4, crece en presencia de un 10% de NaCl y sobrevive a un 16 a 20% (Mercado y Llenque, 2012). Se encuentra ampliamente distribuida tanto en el ambiente terrestre (suelo, plantas, ensilaje, materia fecal, aguas residuales), en el ambiente acuícola y también en lugares donde se procesan alimentos. En plantas de producción de alimentos puede encontrarse en el suelo, aguas estancadas, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, cámaras de frío y túneles de congelación,

entre otros. Su crecimiento en este entorno se ve favorecido por la alta humedad y la presencia de nutrientes (Pérez y Sigarán , 2012). Este patógeno es adquirido por el consumo de alimentos o por el contacto con mucosas de animales infectados, causando listeriosis, una enfermedad invasiva que involucra serias complicaciones que pueden llevar hasta la muerte. Aunque sea una enfermedad infecciosa de baja morbilidad, presenta una alta letalidad. Puede presentarse como brotes o en forma de casos esporádicos y es principalmente de carácter oportunista, debido a que su tasa anual de infección es 3 veces más alta en mayores de 70 años y 17 veces más alta en embarazadas. Desde mediados del siglo XX, dicha bacteria se considera un patógeno emergente en alimentos, mostrando habilidad de multiplicarse en leche, en carne y vegetales almacenados en refrigeración, siendo la principal vía de infección de Listeriosis humana (Gallegos *et al.*, 2007).

Entre las graves manifestaciones clínicas características de esta enfermedad, tenemos meningitis y/o encefalitis, abortos o infecciones neonatales y septicemias. El género *Listeria* contiene especies con una extensa distribución en ambientes como tierra, aguas de desecho y fluviales, afluentes y hasta en plantas de tratamiento de aguas. Además, se puede encontrar en aves, pescados, moluscos, crustáceos, insectos, leche, productos cárnicos, frutas y vegetales.

El género *Listeria* está formado por seis especies diferentes: *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Donde las dos últimas especies son patógenas; *L. monocytogenes* produce una enfermedad de forma invasiva que puede afectar el Sistema Nervioso Central (SNC) conduciendo a la muerte y una forma no invasiva que ocasiona síndrome gastrointestinal. Se cree que el 99% de los casos de Listeriosis son de origen alimentario, el resto obedece a infección de recién nacidos a través de la madre (González, *et al.*, 2009). *L. monocytogenes* puede invadir el ojo y la piel del hombre después de una exposición directa, se ha observado en accidentes de laboratorio y en veterinarios. Sin embargo en la mayoría de los casos humanos la puerta de entrada no es evidente. Se piensa que el tracto gastrointestinal sea la vía de acceso más importante en el caso de las infecciones extrauterinas. Se presenta el hígado como el primer órgano blanco donde se multiplica activamente antes que la infección sea controlada por la

inmunidad mediada por células. Este patógeno (parásito intracelular facultativo), puede sobrevivir en macrófagos e invadir células no fagocíticas como las células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales. El período de incubación de la listeriosis es en promedio de 3 a 4 semanas, con extremos de 3 a 90 días. El riesgo de listeriosis está marcadamente elevado en las mujeres embarazadas y sus fetos, los ancianos y los individuos con cuadros de inmunodepresión (Heiman *et al.*, 2015). El patógeno a pesar de no formar endosporas es capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, en las plantas procesadoras de alimentos y al interior de los refrigeradores domésticos, ha sido aislada de alimentos sin procesar como leche, carne y vegetales y de alimentos procesados como quesos suaves, helado, mantequilla, carne cruda, carne procesada, pescado crudo y ahumado en frío. A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de Listeriosis generalmente se relacionan con aquellos listos para el consumo, los que se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los contaminados después de proceso térmico (Schobitz *et al.*, 2009).

La capacidad del microorganismo para penetrar en el citoplasma de la célula, proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patogénico. Su unión a la célula huésped se produce por una proteína (integrina), luego es fagocitada por la célula huésped. En el fagolisosoma es sometida a un ambiente hostil con pH bajo, activando una exotoxina que es capaz de lisar la membrana del fagolisosoma en 30 minutos y escapar al citoplasma. Esta exotoxina hemolítica y citolítica es un factor crítico de virulencia de *L. monocytogenes*, conduce a una interrupción de las membranas fagolisosómicas y a un crecimiento sin restricciones de *Listeria* dentro del citoplasma del fagocito (Núñez *et al.*, 2014).

## **1.2. Métodos de prevención de ETAs**

En la búsqueda de proporcionar inocuidad a los alimentos, se han utilizado diferentes métodos para evitar la proliferación microbiana, evitando así el

crecimiento de agentes que otorgan dicha patogenicidad. Dentro de los métodos de control más utilizados se encuentran los tratamientos térmicos, el almacenamiento a bajas temperaturas, el uso de conservantes químicos y la tendencia que aunque no es nueva es de gran aceptación actual hacia el uso de conservantes naturales.

### **1.2.1. Tratamientos Térmicos**

Tratar alimentos con calor ha sido usado desde ciento de años, con el propósito de elaborar alimentos microbiológicamente seguros y con actividad enzimática baja. Para algunos de productos alimenticios los tratamientos térmicos representan solo una parte de la conservación, haciendo básico la combinación de procesos. Las bacterias, levaduras y hongos se destruyen casi en su totalidad a los 100°C y normalmente no constituyen problemas en tratamientos de conservas, sin embargo las esporas y toxinas de algunos microorganismos suelen presentar extraordinariamente resistencia al calor y necesitan ser expuestos durante periodos prolongados. Los dos tratamientos térmicos más usados en la actualidad son la esterilización y la pasteurización (Forsythe *et al.*, 2002).

### **1.2.2. Conservantes Químicos**

Se basan en el mismo principio de retrasar el deterioro y pudrición de los alimentos debida a la acción de los microorganismos. Es preciso recordar que los microorganismos también se controlan mediante la reducción del pH y de la actividad acuosa, por lo que el vinagre, la sacarosa o el cloruro de sodio, además de ejercer una acción protectora, funcionan como conservadores. En esta categoría de conservantes se destacan los siguientes: benzoatos, parabenos, propionatos, acetatos, sorbatos, sulfitos, nitritos, nitratos, antibióticos, entre otros tienen un efecto bactericida (destruyen las bacterias) o actúan fundamentalmente como inhibidores (bacteriostático) del crecimiento microbiano. Las condiciones de uso de los conservantes están reglamentadas estrictamente en todos los países del mundo. Usualmente existen límites a la cantidad que se puede añadir de un conservante y a la de conservantes totales. Los conservantes alimentarios, a las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación (Sauceda, 2011).

### 1.2.3. Conservación con sustancias naturales

Las sustancias de esencias naturales, se han utilizado desde épocas antiguas, como sustancias aromáticas y como conservantes. Las plantas tienen la capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, siendo la mayoría fenoles o sus derivados oxigenados. Dentro de los extractos vegetales que se han logrado extraer se pueden resaltar los aceites esenciales de orégano y tomillo, de estos se han reportado efectos inhibitorios sobre bacterias y hongos. Muchas hierbas y especias exhiben actividad antimicrobiana; entre las usadas en alimentos se encuentran por ejemplo el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, angélica, puerro, rábano picante, hierbabuena y tomillo. Los compuestos presentes en estas poseen actividad antimicrobiana por ser derivados simples y complejos del fenol; los cuales son volátiles; en la Tabla 1-3, se reporta la composición química de algunas plantas aromáticas. Las especias con raíces, cortezas, semillas, brotes, hojas o frutos de plantas aromáticas que se añaden a los alimentos como agentes saborizantes. Sin embargo, se sabe desde tiempos antiguos que las especias y sus aceites esenciales tienen diferentes grados de actividad antimicrobiana (Acevedo *et al.*, 2007). En general son más efectivos las especias frente a organismos Gram-positivos, que frente a bacterias Gram-negativas; por ejemplo la canela, clavo y mostaza presentan gran poder conservante, en cuanto a la pimienta negra/roja, jengibre son inhibidores débiles, el laurel, cilantro, comino, orégano, romero, salvia y tomillo tienen actividad intermedia. La función conservadora se debe a los aceites esenciales que poseen. Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades tales como efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes y con capacidad biocida contra una amplia gama de organismos como bacterias y hongos, además de presentar mejor biodegradabilidad comparado con antibióticos y conservantes disponibles en el mercado (Ríos y Recio, 2005). Su efecto consiste en la capacidad de incrementar la fluidez de la membrana y salida de iones de potasio, conduciendo a una disminución en el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática y un colapso en el potencial de membrana, además de la inhibición en la síntesis de ATP, finalmente estos eventos son seguidos de la muerte celular (Ben Arfa *et al.*, 2006).

**Tabla 1-3.** Composición química de 6 especies aromáticas.

PLANTAS		Parte Usada	Procedencia	Compuesto Mayoritario, Cantidad Relativa (%)	
Nombre común	Nombre científico			Sustancia	Abundancia (%)
Orégano común	<i>Origanum vulgare</i>	Hojas	Cultivo experimental	Carvacrol γ-Terpineno p-Cimeno	62.0 9.5 7.5
Orégano Cimarrón	<i>Lippia origanoides</i>	Flores	Cultivo experimental	Carvacrol p-Cimeno γ-Terpineno Timol	42.5 9.8 8.9 6.7
		Hojas	Cultivo experimental	Carvacrol Timol γ-Terpineno p-Cimeno	ND ND 8.2 10.1
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Hojas	Cultivo experimental	Timol p-Cimeno γ-Terpineno Carvacrol	35.8 19.5 9.7 4.3
Orégano Castilla	<i>Lippia micromera</i>	Hojas	Mercado Local	Timol p-Cimeno γ-Terpineno	29.4 8.4 14.3
		Hojas	Cultivo experimental	Timol γ-Terpineno Eucaliptol p-Cimeno	34.1 9.6 6.6 6.3
Orégano Rastrero	-----	Hojas	Mercado Local	Mentona Pulegona Timol+Carvacrol	36.0 33.5 6.9
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Hojas	Cultivo experimental	Terpinen-4-ol γ-Terpineno Linalol Alfa-Terpineno	25.9 11.6 10.3 8.1

Fuente: Adaptado de Acevedo, 2007

### **1.3. Aceites Esenciales (AEs)**

Los AEs son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos. Son mezclas de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos, que responden a la fórmula  $(C_5H_8)_n$  junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) que son los que transmiten a los aceites el aroma que los caracteriza. Estas fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (García *et al.*, 2010).

#### **1.3.1. Métodos de Extracción de los Aceites Esenciales**

La extracción es el primer paso en la obtención de un AE crudo; para llevarlo a cabo se han reportado y creado una serie de métodos como, el enfleurage, arrastre con vapor y fluidos supecríticos; técnicas usadas de acuerdo a las necesidades y la relación de costo beneficio determinada por la industria (Martinez , 2003). En la actualidad la mayoría de los AEs son extraídos a través de métodos de destilación simple, como la hidrodestilación y la metodología del arrastre por vapor por ser métodos de fácil empleo y de bajos costos de producción.

El método del Arrastre con Vapor de Agua, consiste en tomar una muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así

arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y no requiere tecnología sofisticada (Peredo *et al.*, 2009).

La Figura 1-4, representa un equipo tipo laboratorio para extraer AE usando arrastre con vapor. Estos sistemas son muy utilizados y fáciles de instalar, se pueden llevar de un sitio a otro, “trashumantes”, son baratos, seguros, fáciles de operar y presentan un consumo energético bajo. El fundamento físico se basa en la ley de Dalton que dice: cuando dos o más gases o vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión que si estuviera solo y la suma de las presiones de cada uno, es igual a la presión total del sistema. Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil. Si uno de los líquidos es agua (destilación por arrastre con vapor de agua) y si se trabaja a la presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el agua a una temperatura inferior a 100°C (Peredo *et al.*, 2009). Esto es muy importante cuando el compuesto se descompone a su temperatura de ebullición o cerca de ella. En general, esta técnica se utiliza cuando los compuestos cumplen con las condiciones de ser volátiles, inmiscibles en agua, tener presión de vapor baja y punto de ebullición alto.

Cuando la materia prima se calienta por contacto del vapor de agua se va liberando el aceite esencial contenido, el cual debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”, corriente arriba. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable que es separada en un decantador. El vapor condensado que acompaña al aceite esencial es llamado agua floral o hidrosol. Posee una pequeña concentración de los compuestos químicos

solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido.



Fuente: Autor

**Figura 1-4.** Equipo de laboratorio para arrastre con vapor.

### 1.3.2. Caracterización del Quimiotipo de los AEs

Las investigaciones realizadas acerca de los AEs, han llevado hacia la identificación de los componentes individuales mediante largas y costosas metodologías que incluyen el aislamiento y purificación. La cromatografía de gases es una técnica que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la

asociación de las dos técnicas, GC (“Gas Chromatography”) y MS (“Mass Spectrometry”) da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM), requiere sistemas especiales de conexión (Gutiérrez y Droguet, 2002).

## **1.4. Concentraciones o diluciones mínimas para evaluar el efecto biocida de los AEs**

Son relativamente pocos los estudios sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en sistemas modelo de alimentos o en alimentos propiamente dichos. Para poder evaluar la actividad antimicrobiana de los AE sobre microorganismos patógenos, se aplican convencionalmente dos técnicas básicas: Método de difusión en agar y Método de dilución (agar o caldo líquido).

### **1.4.1. Método de Difusión en Agar**

El método permite cuantificar el grado de inhibición para el crecimiento de los microorganismos y posiblemente cambios en su morfología de una manera simple. En cajas de Petri se inocula la especie a evaluar; existen dos métodos posibles para la incorporación del Aceite Esencial que son: en un disco de papel o en un pozo hecho en medio del agar. Se preparan en cajas de Petri, soluciones del AE en diferentes concentraciones y los discos de papel son sometidos a inmersión. La eficacia del AE se demuestra por el tamaño de la zona de inhibición alrededor del disco y se expresa como el diámetro de esta zona en milímetros o centímetros (Cano *et al.*, 2008). Este método es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco. Un disco que tiene una cantidad específica de antimicrobiano y es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo, este inóculo se realiza de acuerdo a un punto de turbidez, que es una suspensión directa de la colonia ajustada a 0.5 patrón de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) (Cano *et al.*, 2008). El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de

inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano.

El fundamento teórico de la prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer), se basa en la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando un gradiente continuo de concentración. Si el disco que contiene el antimicrobiano se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco de inhibición del crecimiento.

De acuerdo al Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico de los Estado Unidos (CLSI), la interpretación del halo de inhibición está basada en la correlación entre el diámetro con la CMI, al ser proporcional permitirá la distinción de cepas sensibles, resistentes o intermedias. Para realizar la prueba bien estandarizada y ser aceptada universalmente, se recomienda:

- La concentración ideal del inóculo corresponde a una dilución de turbidez 0.5 en la escala de McFarland.
- El medio adecuado para realizar la prueba es el Mueller-Hinton (MH), avalado por el CLSI.
- Para cada antimicrobiano se deberían ajustar concentraciones estándar, se debe resaltar que falta de información sobre las concentraciones adecuadas para el uso de AEs, por ende la variación de estas concentraciones ha implicado variar los criterios de interpretación.

## **1.5. Mercado Nacional de los AEs**

Colombia se ha clasificado como un país biodiverso, sin embargo, esta ventaja no ha repercutido en su desarrollo socio económico, atribuido a las pocas investigaciones de mercado que puedan identificar oportunidades de negocios

permitiendo así adelantar programas y proyectos productivo con rentabilidad de nuestra biodiversidad. Enfocándose claramente en las investigaciones previas, sobre la potencialidad del renglón de los AEs, se ha llegado al planteamiento sobre la posibilidad de producir AEs y sustituir las importaciones que se realizan en Colombia. Es claro que los AEs no son un bien de consumo directo, se han utilizado como materias primas o insumos industriales, utilizados en la industria de fragancias, aromas o sabores, medicamentos y otras actividades químicas. En el país, la industria de alimentos constituye el 85% de la industria nacional con relación al número de industrias establecidas y sin duda la industria de confitería, snack, galletería, lácteos, cárnicos, condimentos salados y bebidas son aquellas que generan el mayor consumo de AEs.

Desde la década de los 80 es cada vez más notoria la tendencia por concentrar los esfuerzos en grandes corporaciones, con el objeto de reducir los gastos fijos y optimizar los recursos tecnológicos y humanos logrando una llamada más crítica de investigación y desarrollo que permite competir a nivel internacional, así plantean una serie de factores a tener en cuenta (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003):

- Cada vez se concentra más la producción de sabores, fragancias en los países desarrollados y por consiguiente de la demanda de materias primas, entre ellas los AEs.
- La industria de fragancias y sabores utiliza unas 700 materias primas (naturales o sintéticas) en cantidades mayores a 100tn/ año. También usa otros 300 a 400 productos más en menor proporción. De todos estos, unos 300 son de origen vegetal, y se pueden dividir en dos grandes categorías, aceites esenciales y productos aislados de esencias (eugenol, anetol y citral).
- Diez esencias representan el 85% del mercado mundial, de las cuales se resaltan, los cítricos (naranja y limón), mentas, citronela, cedro y eucalipto.
- En un mercado tan competitivo como el de alimentos, surge la necesidad de una renovación continua, de encontrar nuevos productos. Entre estos se han puesto de moda los llamados alimentos ecológicos, y los étnicos,

provenientes de tradiciones o artes culinarias exóticas, generalmente tropicales, donde abundan las especias y los sabores fuertes.

- Es evidente la preferencia del usuario por consumir productos naturales y en este aspecto juega un papel preponderante el consumo de productos orgánicos.
- El mercado globalizado trajo consigo la eliminación de fronteras culturales, algo así como la transculturización del consumo y los gustos, donde lo exótico es uno de los principales valores, y la variedad es un logro indiscutible.
- Aunque en algunos casos se ha exagerado, la concientización de los probables efectos tóxicos producidos por materiales sintéticos es hoy una realidad.

## **1.6. Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

Pertenece a la familia de las Labiadas, que posee cerca de 215 especies, el género *Thymus* es uno de los ocho géneros más importantes. En términos generales, el Tomillo es una planta aromática utilizada con fines medicinales y como condimentos en casi todo el mundo. Es muy frecuente en la región mediterránea, donde algunas especies forman un tipo de vegetación arbustiva no más de 50cm de altura (Ghasemi *et al.*, 2013).

Una característica común de estas plantas aromáticas es la presencia de un sin número de pelos glandulares de diferentes formas que contienen AEs volátiles que se evaporan cuando los pelos glandulares están dañados, forma en la que producen una fragancia intensa que abarca la planta. Es una planta perenne, subarbustos o arbustos, a veces con forma herbácea, pero leñosa en la base, aromático, tallo erecto a postrado, hojas simples, enteras o algunas lanceoladas, en el extremo de las ramitas las flores se agrupan en una especie de cabezuelas y tienen el cáliz de

color rojizo vinoso, de una sola pieza, con la garganta obstruida por pelitos blancos, dividido en dos labios.

Esta planta despide un intenso olor a timol; es el típico olor a tomillo. La floración en países con estaciones aparece a mediados de primavera; en países tropicales el estado de estrés en el cultivo genera la floración. Su lugar de origen es del mediterráneo, ampliamente cultivada en clima montañoso, templado y subtropical de América y el Caribe (Fuentes, 2005).

La planta tiene gran tradición en la herboristería, al ser utilizada para aliviar la tos, los trastornos digestivos y para combatir la inapetencia. Como aromatizante en la cocina se puede utilizar para dar sabor a los platos, dándole un toque típico de sabor a los preparados que aumentan sus propiedades medicinales. Se ha utilizado también para aromatizar los quesos (Fuentes, 2005).

### **1.6.1. Cultivo del Tomillo en Colombia**

Para Colombia los cultivos de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y la industria de los AEs ha tomado fuerza como un importante componente del ingreso de la población rural, especialmente de pequeños y medianos productores y grupos de mujeres cabeza de familia. Esta cadena productiva sirve como escenario para diseñar estrategias encaminadas a proteger éste subsector productivo naciente y lo prepara para insertarse en los nuevos escenarios de comercialización tanto nacional como internacional (Cardona y Barrientos, 2012)

Podemos hablar de las plantas aromáticas como aquellas que tienen hojas, tallos o flores que desprenden un aroma. De acuerdo a su familia y especie pueden ser clasificados como árbol, arbusto o una planta herbácea. Según su uso son llamadas plantas culinarias o condimentarias usadas en la cocina, claro ejemplo de estas son: Albahaca, Laurel, Menta, Orégano, Perejil, Romero, Salvia y Tomillo. Algunos reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) conjunto con la FAO, calculan que las dos terceras partes de la población mundial, que oscila cerca de

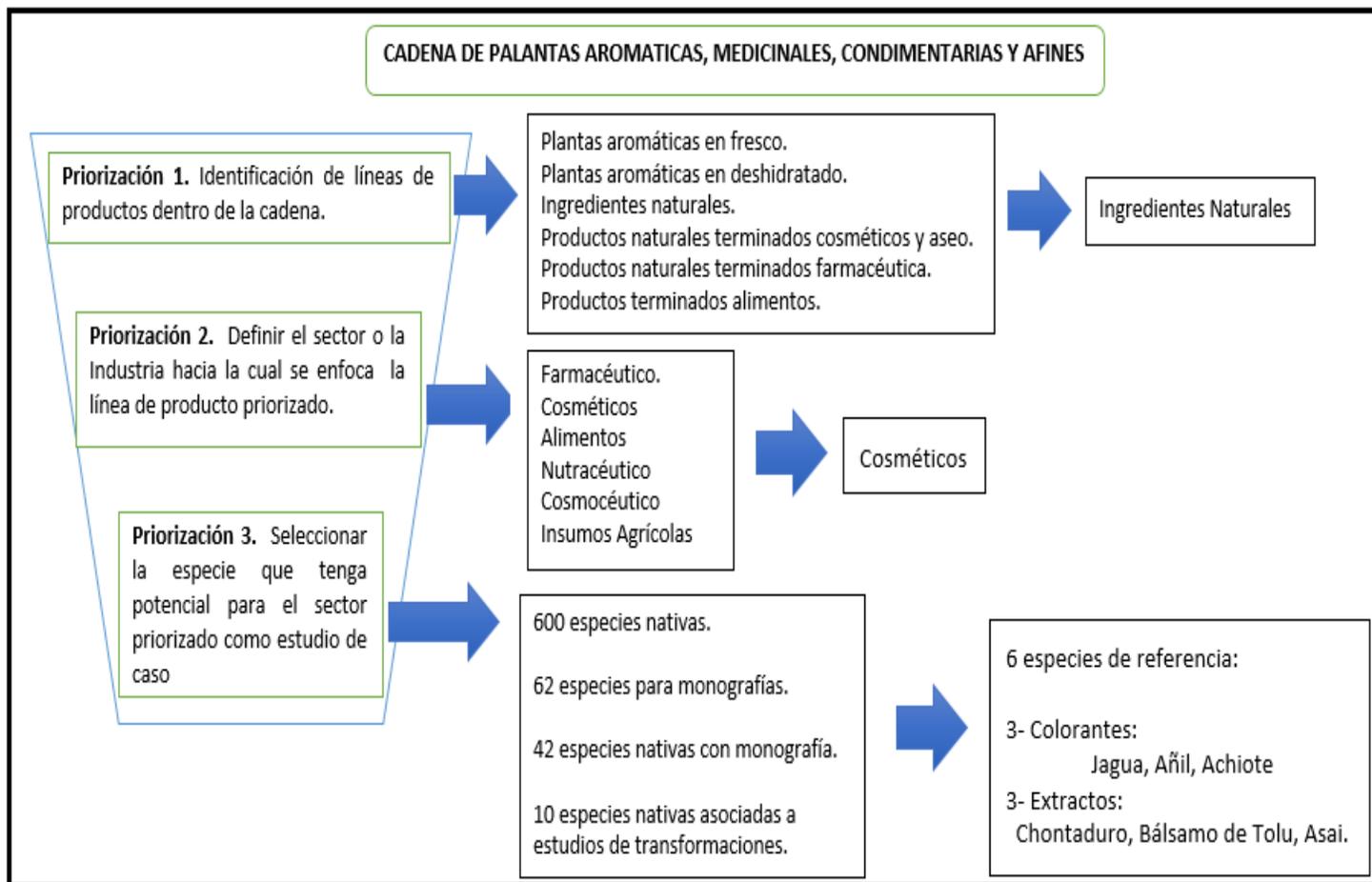
cuatro mil millones de personas, recurre a las hierbas aromáticas y medicinales para su alimentación y para curar sus dolencias (Restrepo, 2011).

El cultivo de tomillo en el país se comporta de acuerdo a lo establecido en la cadena productiva de las plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y AEs; una cadena establecida con la denominada “Declaración de Voluntades”, firmada el 20 de abril de 2004; en la Figura 1-5, se representa la Cadena Productiva de Aromáticas, Medicinales, Condimentarias y Afines (PAMC) (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2009).

Para Colombia incursionar en el mercado agrícola, se ha convertido en ventaja económica, pero la falta de inversión en el mercado de las plantas aromáticas se ha identificado que la demanda supera la oferta del país, causa de la limitada producción. Los principales productores de hierbas aromáticas se encuentran en Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Risaralda, Norte de Santander, Tolima y Valle del Cauca (Tabla 1-4). Dentro del grupo de mayor venta de las aromáticas, el Tomillo representa un renglón importante como se puede observar en la Tabla 1-5 (Lozano, 2010).

El sector de las plantas medicinales y aromáticas es naciente, y presenta un gran problema que es la ausencia de información. Es así como no existen datos realmente consolidados sobre las especies comercializadas a nivel nacional o internacional o por lo menos no para la mayoría de especies medicinales nativas colombianas, los volúmenes transados o la distribución y el estado de conservación de las mismas. Nada de esto se conoce ni se encuentra registrado en la literatura de una forma sistematizada.

El mayor consumo de las especies aromáticas se hace como producto fresco para la gastronomía, las otras dos formas de consumo de aromáticas frescas es como medicamento en infusiones, baños, emplastos, y como materia prima o básica para laboratorios y tiendas naturistas que le dan al producto un valor agregado (Flórez y Méndez, 2003).



Fuente: Adaptado de PAMC/MADR, 2009.

**Figura 1-5.** Cadena de plantas aromáticas, medicinales, condimentarías y afines.

En la exportación las plantas que se destacan son el albahaca (23%), romero (16%), menta (14%), tomillo (11%), estragón (7%), mejorana (7%), laurel (6%) y eneldo (5%), sin contar en este grupo con el cardamomo que representa un porcentaje significativo de las exportaciones (Flórez y Mendez, 2003). Los principales destinos de las aromáticas exportadas donde el tomillo toma papel importante, son: Estados Unidos de Norteamérica (74%), Canadá (12%), Inglaterra (8%), Alemania (2%), Holanda (2%) y otros. Por otro lado, el mercado nacional, fuera de consumir las especies de exportación, también demanda: cúrcuma, limoncillo, toronjil, ruda, citronella, poleo y sábila. Los departamentos abastecedores del mercado nacional son: Cundinamarca, Antioquia, Valle del Cauca, Cauca y Tolima (Cardona, 2011).

**Tabla 1-4.** Área sembrada (ha) y producción en fresco (t) de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias por departamento y año en Colombia.

Departamento	Unidad	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2008 <sup>1</sup>
Antioquia	ha										369
	t										
Boyacá	ha	5	15	15	15					18	30
	t	31	90	90	90					10	
Cauca	ha			28	30		60			160	97
	t			28	30		60			160	
Cundinamarca	ha	142	140	170	190	280	289	316	331	354	454
	t	828	913	1077	1113	3798	2217	2711	2294	1995	
Eje Cafetero	ha										28
	t										
Norte Santander	ha	16	15	10	10	10	10	10	16	16	20
	t	344	300	200	200	100	88	100	151	211	
Risaralda	ha	8	8	8	8	11	17	15	23		
	t	30	30	40	32	589	172	177	279		
Tolima	ha										48
	t										
Valle del Cauca	ha	23	107	116	120	103	116	120	114	165	200
	t	70	274	294	300	535	619	674	1541	941	
Total Colombia	ha	194	285	347	358	404	492	461	484	713	1.246
	t	1.303	1.607	1.729	1.675	5.022	3.156	3.662	4.265	3.237	33.127
Rendimiento promedio (t ha <sup>-1</sup> )		6,700	5,600	5,000	4,700	12,400	6,400	7,900	8,800	4,500	26,600

Fuente: Portilla, 2007; Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2009.

**Tabla 1-5.** Área cosechada en hectáreas y volumen de cosecha en toneladas de hierba aromática en Colombia.

<b>CULTIVO</b>	<b>AREA COSECHADA (has)</b>	<b>VOLUMEN (tons)</b>
Poleo	94	567
<b>Tomillo</b>	<b>184</b>	<b>553</b>
Manzanilla	91	341
Albahaca	61	150
Mafafa	12	135
Orégano	94	132
Pimienta Negra	18	130
Salvia	14	61
Ruda	3	54
Limonaria	16	39
Romero	182	37
Achiote	80	28
Hinojo	1	25
<b>TOTAL</b>	<b>849</b>	<b>2253</b>

Fuente: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2009

## 1.7. Queso Ricotta.

Los quesos son un alimento de características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales diferentes de acuerdo a cada tipo, se estiman más de 2000 variedades de quesos entre madurados, semi-madurados y frescos. De los tipos de quesos que existen, los frescos son considerados ligeros, pues retienen gran parte del suero y son constituidos en gran parte por agua alcanzando niveles hasta del 80%. Por este motivo los quesos frescos son ideales para dietas y su aporte calórico es minúsculo si se compara con todos los nutrientes que aportan además del calcio, es rico en proteínas, fósforo y vitaminas A y E (Vásquez *et al*; 2012). Los quesos frescos son aquellos con mayor tradición en Colombia, lideran el mercado con aproximadamente el 70% de las ventas. Estos quesos se empezaron a producir en nuestro país desde la época de la colonización y ya que estos quesos tienen una vida útil corta, se fueron diversificando según las condiciones geográficas y climáticas de las diferentes regiones donde podemos encontrar la Cuajada, el

Quesito, el Queso Campesino, el Queso Costeño y por supuesto el Queso Blanco, el de mayor consumo. Sin duda alguna dentro de esta clasificación se encuentra el queso Ricotta, queso de origen italiano cuya denominación proviene del latín *recocta* “recocida”, de bajo consumo en Colombia, pero aprovechado por su aporte nutricional y por fácil elaboración. Este queso deriva de la familia de los quesos de suero. Se ha fabricado diversos tipos que van desde las cuajadas del tipo Cottage blando a los quesos duros para gratinar. Se elaboran con leche entera o mezclada con lactosuero, en el caso de elaborar ese tipo de queso solamente de lactosuero se denomina Ricottone o el conocido requesón en Latinoamérica. Su coagulación es del tipo ácido y por calor. El mecanismo principal para la elaboración del Ricotta o del Requesón, es la desnaturalización controlada de las proteínas (Monsalve y González, 2005). En sentido estricto se busca alcanzar el punto isoeléctrico de las caseínas y/o la desnaturalización de las proteínas séricas que no involucra ruptura de enlaces peptídicos; sino un cambio en la estructura tridimensional de la proteína, a partir de la forma que existe en su estado nativo.

Las proteínas lactoséricas se pueden desnaturalizar elevando la temperatura a un valor suficientemente alto y generalmente ya se comienzan a ver algunos efectos entre 60 y 70°C. En la elaboración del queso Ricotta, la leche se acidifica hasta alcanzar un pH de 6.0 o en términos de acidez un porcentaje de 0.3% de ácido láctico, estos valores se pueden alcanzar adicionando cultivos ácido lácticos o agregando ácidos orgánicos como el ácido acético o ácido cítrico. La temperatura que debe alcanzar es de 80°C, en este punto se alcanza la coagulación de la leche (Magarinos *et al.*, 2009). Este tipo de queso se caracteriza por alta humedad, con respecto a la cantidad porcentual de grasa y proteína, dependerá de la leche de partida; para el caso de ser elaborado a partir de leche entera puede alcanzar valores para grasa del 12% y proteína del 11.3% o para el caso del Ricottone la grasa es de 0.5% y proteína del 11.2%.

## Bibliografía.

- Acevedo, A. M., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Reyes, J. A., Kouznetsov, V., Y Stashenko, E. E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol. In *Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Centro de Investigación en Biomoléculas – CIBIMOL y Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander* (pp. 125–128).
- Ben Arfa, A., Combes, S., Gontard, N., Y Chalier, P. (2006). y hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154.
- Cano, C., Bonilla, P., Y Roque, M. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica*, 25(3), 298–301.
- Cardona, J. O., Y Barrientos, J. C. (2012). Producción, uso y comercialización de especies aromáticas en la región Sumapaz, Cundinamarca. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(1), 114–129.
- Estibaliz, M., Y López, M. (2008). Estimación de la incidencia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Colombia en la década 1996-2006. *Tesis de Pregrado En Microbiología Industrial. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá DC*, 148 p.
- Flórez, J. M. O., Y Mendez, J. (2003). *Guía de plantas y productos medicinales* (Vol. 7). Siglo Del Hombre Editores SA.
- Forsythe, S. J., Hayes, P. R., Pérez, B. S., Y Scott, R. (2002). *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. Acribia.
- Fretz, R., Sagel, U., Ruppitsch, W., Pietzka, A. T., Stöger, A., Huhulescu, S., Pfaff, G. (2010). Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese “Quargel”, Austria and Germany 2009.
- Fuentes, A. (2005). Evaluación del rendimiento y calidad de Aceite Esencial crudo de Tomillo (*Thymus vulgaris* L.); Cultivado en Chaquijyá, Sololá extraído a nivel

laboratorio y planta piloto. *Trabajo de Grado. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala.*

Gallegos, J., Arrieta, G., Máttar, S., Poutou, R., Trespalacios, A., Y Carrascal, A. (2007). Frecuencia de *listeria spp.*, en quesos colombianos costeños, 12(2), 996–1012.

Gandhi, M., Y Chikindas, M. L. (2007). Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1–15.

García, C., Martínez, A., Ortega, J. L., Y Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.

Ghasemi P, A., Hashemi, Y Ghahfarokhi, F. . (2013). Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated Thymus daenensis Celak and Thymus vulgaris L. *Industrial Crops and Products*, 48, 43–48.

González, E. R., Salas, L. C., Y Phillips, G. C. (2009). Listeria monocytogenes en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. *Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad Del Zulia. Maracaibo, Venezuela.*, 71–79.

Gutiérrez, M. C., Y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (upc) Numero*, 122.

Heiman, K. E., Galalde, V. B., Gronostaj, M., Jackson, K. A., Beam, S., Joseph, Y L., Wellman, A. (2015). Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012. *Epidemiology and Infection*, 1–11.

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. (2003). Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá*, 109.

Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G., Rosell, C., Y Mejía, D. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. *Estudio de Caso En Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras Y Nicaragua. Informe Técnico Sobre Ingeniería Agrícola Y Alimentaria*, 13–39.

Lozano, M. T. (2010). Componentes de política. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. *Coordinador de La Cadena: Álvaro Portilla.*

- Magarinos, H., Gonzalez, M., Y Villarroel, S. (2009). Elaboración de queso Ricotta a partir de concentrado proteico de suero (CPS). *Agro Sur*.
- Martinez M., A. (2003). Aceites Esenciales. *Medellín, Colombia: Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia*, 1–34.
- Mercado, P., Y Llenque, L. (2012). Efecto del cloruro de sodio, sales biliares y pH en la actividad antibacteriana de *Bifidobacterium animalis* sobre *Listeria monocytogenes*. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 8(22), 23–33.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2009). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y afines con énfasis en ingredientes naturales para la industria cosmética en Colombia. Bogota.
- Monsalve, J., Y González, D. (2005). Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. *Revista Científica*, 15(6), 543–550.
- Muñoz, A. I. (2012). Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos , Colombia , 2000-2009, 0-35.
- Núñez, K., Kühbacher, A., Peraza, J., Cossart, P., Y Pizarro, J. (2014). Rol de la Tropomiosina y del Adaptador NEDD9 durante la invasión celular de *Listeria Mnocytogenes*. *Tecnología En Marcha*, 27(8), 41–48.
- Orberá R., T. de los M. (2004). Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Revista Cubana de Salud Pública*, 30(3), 0–0.
- Peredo, L. H. A., Garcia, P. E., Y Lopez, M. A. (2009). Aceites esenciales: Métodos de extracción. *Departamento de Ingeniería Química Y Alimentos. Universidad de Las Americas. Puebla.Mexico*.
- Pérez Escobar, N. L., Y Sigarán Alvarado, M. P. (2012). Determinación de la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aislada a partir de muestras de espinaca *Spinacea oleracea* utilizando germicidas para la desinfección de alimentos. Universidad de El Salvador.
- Restrepo, I. (2011). Trabajo de grado. Plan de empresa. Hierbas del campo. Sabaneta.Antioquia. Colombia. 2011.
- Ríos, J. L., Y Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 80–84.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170.

Schobitz, R., Ciampi, L., Y Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37(1), 1–8.

Sistema nacional de Salud y Ministerio de proteccion social. (2011). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en colombia. *Ministerio de Salud Y Protección Social Unidad de Evaluación de Riesgos Para La Inocuidad de Los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud INS 2011 Bogotá D.C., 2011.*

Vásquez, N., Duran, L., Sánchez, C., Y Acevedo, I. (2012). Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso blanco a nivel de distribuidores, estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 30(3), 217–223.

## 2 Capítulo. Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial (AE) del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre *Listeria monocytogenes*

Andrés F. MORALES C. Zootecnista\*.<sup>1</sup>, José V. HIGUERA M. M.Sc.<sup>2</sup>, Edith M. CADENA CH. Ph.D.<sup>3</sup>

### 2.1. RESUMEN

**Antecedentes:** Los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias aromáticas que son biosintetizadas en diferentes partes de las plantas, se componen principalmente de fenoles, ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos; compuestos muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Son ampliamente conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias; efecto atribuido por colapsar la membrana celular y permitir la pérdida de componentes vitales. **Objetivo:** Determinar el efecto del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) como antimicrobiano natural, contra la actividad de *Listeria*

---

<sup>1</sup> Estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59A No 63– 20, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Profesor Asociado. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59A No 63–20, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Profesora Asociada. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín Calle 59A No 63–20, Medellín, Colombia.

\*Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: afmoralesc@unal.edu.co

*monocytogenes*; brindando una alternativa para ser usado como aditivo alimentario.

**Métodos:** La extracción del aceite esencial del tomillo con tres edades de corte 12, 14 y 16 semanas, se realizó a través de la destilación por arrastre con vapor, previamente el material vegetal fue secado a 60°C por 48 horas. La caracterización del quimiotipo se realizó utilizando la técnica de CG-EM. El efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* se evaluó utilizando la combinación de las técnicas *In Vitro* de difusión en agar con discos de papel y macrodiluciones, con el propósito de determinar la menor concentración inhibitoria. El aceite esencial utilizado fue el extraído del tomillo con 14 semanas de edad al corte; se probaron concentraciones desde 0.005% hasta 2.4%. **Resultados:** En la extracción del aceite esencial se obtuvo el máximo rendimiento en las plantas a 14 semanas de edad a corte, con valores de 0.603%±0.003%. En la caracterización del quimiotipo se encontró que el componente activo mayoritario es el Timol con un 30.97% de abundancia relativa en la composición. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo se determinó con una concentración no menor a 1.6%, donde se observó halo de inhibición. **Conclusiones:** El punto de corte del tomillo para la obtención de un aceite esencial con el mayor porcentaje de rendimiento corresponde a 14 semanas de edad, además de mayor abundancia relativa en los componentes biológicamente activos. El efecto antimicrobiano sobre *L. monocytogenes* demuestra que el AE de tomillo en concentraciones de 1.6% tiene efecto biocida y podría ser utilizado en la industria de alimentos por su efectividad.

**Palabras claves:** Aceite esencial, Arrastre por vapor, *Listeria monocytogenes*, Quimiotipo, Timol.

## 2.1 SUMMARY

**Background:** Essential oils are complex mixtures of aromatic substances that are biosynthesized in different parts of plants, and are mainly composed of phenols, esters, aldehydes, ketones and terpenes; highly soluble in alcohol and slightly soluble in water. They are widely known for their antimicrobial activity against a wide range of bacteria, which is attributed to the collapse of the cell membrane and subsequent loss of vital components. **Objective:** To determine the effect of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) as a natural antimicrobial against activity of *Listeria monocytogenes*, providing an alternative to be use as a food additive.

**Methods:** The extraction of essential oil of thyme of three cutting ages 12, 14 and 16 weeks was carried out through steam stripping, the plant material was dried at 60° C for 48 hours beforehand. Quimiotipose characterization was performed using the GC-MS technique. The antimicrobial effect against *L. monocytogenes* is assessed using a combination of techniques *In Vitro* Agar diffusion with paper discs and macrodilutions, in order to determine the lowest inhibitory concentration. The essential oil used was extracted Thyme 14 weeks old at the cut; concentrations were tested from 0.005% to 2.4%. **Results:** In the extraction of essential oil the maximum result was obtained after 14 weeks after being cut, with yields of 0.603% ± 0.003%. In chemotype characterization, it was found that the major active component is Thymol with a 30.97% of relative abundance in the composition. The antimicrobial activity of essential oil of thyme is determined not less than 1.6% concentration, where halo of inhibition was observed. **Conclusions:** The thyme cutoff for obtaining essential oil with a higher performance percentage corresponds to 14 weeks, in addition to a greater relative abundance in biologically active components. The antimicrobial effect on *L. monocytogenes* shows that the thyme EO can be introduced in the food industry or pharmaceutical applications for its antimicrobial effectiveness.

**Keywords:** Essential oil, steam stripping, *Listeria monocytogenes*, Chemotype thymol.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

Los Aceites Esenciales (AEs) son sustancias líquidas volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas, generalmente extraíbles a través de la técnica de arrastre con vapor, aunque se debe resaltar que existe variedad de métodos para realizar dicho proceso. Los AEs se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas, como las flores, los frutos, el tallo y las hojas, esto depende de la especie vegetal que se utilice para la extracción (Vanegas y Rueda, 2013). Son producidos especialmente por plantas aromáticas; aunque la mayor parte de las plantas los contienen, son éstas las que concentran una mayor cantidad. Son estos aceites los responsables del aroma, debido a que son una mezcla compleja de hasta más de cien compuestos químicos entre los cuales se resaltan alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y gran variedad de compuestos terpenicos (Martinez, *et al.*, 2003). Esta composición química los han convertido en una materia de interés para ser utilizados en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica. Respecto a la composición química de los AEs, puede variar de acuerdo a diferentes factores, dentro de los cuales se resaltan la época de la recolección, las condiciones geográficas, la especie, prácticas agronómicas, la edad de la planta al corte y el método de extracción utilizado. Estos factores afectan principalmente la presencia de los derivados terpenicos, compuestos de gran importancia en la conformación química de los AEs; son formados por la vía del acetato-ácido mevalónico (Cam y Trujillo, 2011). Sin duda alguna los terpenos son los componentes fundamentales; con el nombre de terpenos se caracteriza un importante grupo de componentes vegetales que tienen origen biosintético común, todos aunque con estructuras químicas muy distintas, proceden de la condensación, en número variable, de unidades isoprenicas, entre sus distintas formas se pueden clasificar como monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos (Alzamora *et al.*, 2014). Estos fitocomplejos, son entidades bioquímicas elaboradas en la estructura interna de los vegetales y que representan los llamados principios activos. Aunque se considera que dicha bioactividad es debida al sinergismo de su diversidad bioquímica, en la compleja

mezcla de los AEs se resaltan algunos componentes mayoritarios que representan más del 50% del total del aceite; un claro ejemplo es el timol, un monoterpeno derivado natural de fenol de Cimeno, isómero con el Carvacrol, que se encuentra presente en cantidades significativas en el aceite del tomillo (Luján *et al.*, 2010). Estos componentes cubren un amplio espectro de actividades denominadas en la industria alimentaria como nutraceuticas, pero han tomado importancia por su gran capacidad biocida contra una amplia gama de microorganismos; lo cual ha llevado a utilizar los AEs como conservantes naturales. Se resalta que presentan mejor biodegradabilidad comparados con antibióticos y conservantes químicos disponibles en el mercado (García *et al.*, 2010). La aplicación de los AEs no es un hecho de estos tiempos, por lo contrario desde épocas antiguas era el único remedio que poseía el hombre; se le utilizó con fines terapéuticos y también religiosos. Los Griegos, Egipcios y Romanos eran excelentes conocedores de sus principios y han quedado muchos testimonios de su utilización (Fuentes, 2005). De hecho, en el siglo XIX y primera mitad del XX, cuando todavía no se conocían los antibióticos, el tomillo era considerado como un eficaz desinfectante. Tiene actividad antibacteriana frente a gran variedad de bacterias gram positivas y gram negativas. Por su actividad antiséptica, el tomillo también tiene interés como antiséptico de la cavidad bucofaríngea, así como para el lavado de heridas (Bach, Lagos, y Rosa, 2003). El efecto de los AEs, consiste en incrementar la fluidez de la membrana celular de los microorganismos, lo cual genera la salida de iones de potasio conduciendo a una disminución en el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, además de la inhibición en la síntesis de ATP, lo que finalmente conlleva a la muerte celular (Solís, 2012). Sin embargo, el mecanismo concreto todavía no ha sido completamente dilucidado. En la actualidad, la industria de alimentos ha enfocado su interés en el desarrollo de tecnologías que garanticen seguridad a los consumidores, debido a que la presión por parte de estos ha ido en aumento (Colivet *et al.*, 2006). En tal sentido la contaminación de alimentos, con microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, se convierte en tema fundamental a trabajar en la industria. Este microorganismo es reconocido como un importante problema en la salud pública, donde la mayoría de los casos de

Listeriosis humana, son infecciones causadas por el consumo de alimentos contaminados. Además se suma el rechazo a productos formulados con conservantes sintéticos, por lo que existe la tendencia y la gran oportunidad hacia el uso de sustancias naturales que puedan actuar como agentes antimicrobianos sustituyendo los conservantes de mayor uso (Viuda Martos, 2012). Entre estos antimicrobianos naturales se encuentran las especias y sus derivados, como los AEs. Estos se utilizan en muchos productos alimenticios, como los extractos de sabores, jugos de fruta, derivados cárnicos, productos horneados, dulces, condimentos y jarabes, por lo cual han sido registrados por la Comisión Europea como saborizantes para alimentos, debido a que no presentan riesgos en la salud del consumidor, además la FDA (Food and Drug Administration) los han considerado como sustancias GRAS (Generally Regarded as Safe) aprobándolos como aditivos alimentarios (Sauceda, 2011). El objetivo de este trabajo está enfocado en determinar la actividad antimicrobiana del AE de tomillo sobre *L. monocytogenes*, además de evaluar tres diferentes edades a corte de la planta con el fin de determinar la semana ideal en la cual se obtiene el mayor rendimiento de extracción y las mejores características en el quimiotipo que otorgan los beneficio tecnológicos en su aplicación.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.1. Lugar de estudio

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Frutas y Hortalizas, apoyado por el grupo de Investigación de Ingeniería Agrícola, pertenecientes a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

### 2.1.2. Material vegetal

El tomillo (*Thymus vulgaris*) fue suministrado por la empresa **Aromassence**; ubicada en la vereda Santa Bárbara del municipio de Rionegro departamento de Antioquia (Colombia). El material vegetal en estado fresco fue recolectado a 12, 14 y 16 semanas de edad. Antes del proceso de extracción del aceite, el material

vegetal fue lavado, troceado, pesado y sometido a proceso de secado a 60°C por 48 horas.

### **2.1.3. Proceso de Extracción**

La extracción del AE se realizó mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor, método catalogado como el de mayor empleo, menor costo y mejores rendimientos de extracción (Ben Arfa *et al.*, 2006). El arrastre se llevó a cabo en un equipo a escala de laboratorio, con capacidad de procesar un kilogramo del material vegetal, donde se alcanzaron temperaturas de 92°C para generar el vapor necesario de arrastre. El tiempo del proceso de destilación se estandarizó a dos horas, tiempo suficiente para alcanzar el total de la extracción del AE (Quezada, 2008). La separación y recolección del AE se realizó en un separador de fases. El material se pesó para determinar el rendimiento, siguiendo la formula descrita por Roldan (2010) y Castaño (2013), donde el porcentaje de concentración de aceite es igual a la cantidad de aceite recuperado en gramos sobre la cantidad de material en gramos sometido al proceso de extracción. Las muestras fueron envasadas en frascos ámbar y almacenadas a una temperatura de 4°C±0.2°C hasta el momento de caracterización y posterior uso.

### **2.1.4. Caracterización del AE de Tomillo**

El análisis para determinar la concentración de los diferentes componentes del AE del tomillo se realizó a través de la técnica de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Modelo Agilent 19091J-413. Temperatura inicial 70°C, temperatura máxima 325°C. Tiempo inicial 15 minutos, tiempo de equilibrado 0.50 minutos, tiempo de ejecución 45 minutos). El perfil fue realizado por triplicado para el aceite obtenido de las plantas a las tres diferentes edades de corte.

### **2.1.5. Preparación del inóculo**

Usando medio selectivo PALCAM (OXOID®), se sembró *L. monocytogenes* (ATCC 7644) a 37°C durante 24 horas. Luego se realizó la siembra del microorganismo en el medio de cultivo PLATE COUNT (PCA) (OXOID®) a 35°C por 24 horas. Pasado

este tiempo se tomaron del PCA colonias de *L. monocytogenes* y se ajustaron según la escala de 0.5 McFarland en solución salina (5mL), verificando con el paquete de BBL Mcfarland Turbidity Standard N°0.5 (correspondiente a  $1.5 \times 10^8$  UFC /mL) (Cano *et al.*, 2008).

### **2.1.6. Preparación del AE de Tomillo**

Se realizaron diluciones seriadas en Dimetilsulfóxido (DMSO) del aceite esencial de tomillo, en un rango de concentraciones de 0.005% hasta 2.4%. Discos de papel filtro estériles de 6mm de diámetro, fueron impregnados con 50µL de AE a las diferentes concentraciones de interés para la prueba.

### **2.1.7. Determinación de la menor concentración con efecto inhibitorio del AE de Tomillo**

El efecto del AE del tomillo sobre *L. monocytogenes*, se determinó aplicando la combinación de la técnica de difusión en agar con diluciones. La metodología fue basada en el método de Kirby-Bauer a través del uso de discos de papel impregnados (Zapata *et al.*, 2009). Se tomaron 200µL de la suspensión de *L. monocytogenes* a una concentración de 0.5 del patrón de Macfarland, la cual se sembró masivamente en el medio de cultivo Müeller-Hinton (OXOID®). Los discos de papel filtro fueron impregnados con 50µL del AE a las diferentes concentraciones de prueba; estos discos fueron depositados en la superficie del agar (Müeller-Hinton). Para dar validez se realizaron las pruebas con tres replicas por tres repeticiones. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C; la actividad antimicrobiana se expresó como la diferencia, en milímetros, entre el radio del halo de inhibición y el radio del disco de papel filtro (Olivera *et al.*, 2004). El efecto del AE se comparó con una muestra testigo, empleándose Benzoato de Sodio y Sorbato de Potasio (BEL-CHEM® 98%) en concentraciones establecidas por la Resolución 4125 de 1991 (Ministerio de Salud, 1991).

### **2.1.8. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron analizados a partir de ANOVA de efectos fijos con medidas repetidas; se utilizó la prueba de Tukey como método de comparaciones múltiples, con un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ). Los datos se corrieron en el paquete estadístico R versión 2.12.2

## **2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.1.9. Proceso de extracción del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

El sistema de arrastre de vapor es el proceso más común para obtener el AE de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica en cierto tiempo establecido. Los vapores saturados de los líquidos inmiscibles se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión como si estuviera solo y la suma de las presiones de cada uno, es igual a la presión total del sistema. Esta técnica es usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles de otras no volátiles (Bandoni *et al.*, 2009).

En la extracción del AE se estableció que noventa minutos es el tiempo suficiente para obtener el mayor volumen de aceite esencial, a un tiempo mayor a dos horas no se evidencia extracción; por ende se estandarizó el método a un tiempo de  $1.9 \pm 0.14$  horas; lo cual concuerda con lo estipulado por Durling y colaboradores (2007), quienes sugieren que el tiempo de extracción no sea mayor a tres horas. Se realizó el secado del material vegetal, basados en los reportes de la literatura que demuestran la mayor obtención en porcentajes de rendimiento en AEs para las plantas sometidas a procesos de secado, debido a la concentración y disponibilidad de biomasa; Moreno y colaboradores (2010) reportaron que la relación del rendimiento en la extracción es influenciada por el porcentaje de humedad presente en las especies vegetales, llegando a la conclusión que al aumentar la humedad el rendimiento en AE se ve disminuido.

Los AEs están almacenados en glándulas, conductos, sacos o reservorios de las plantas; la presencia y cantidad de estos depende de su estado fisiológico y de algunas condiciones agroecológicas. Es conocido que la cantidad de AE depende de varios aspectos pero se resalta de prioridad la edad del cultivo, por ende se realizó la extracción del material vegetal a tres diferentes edades a corte (12 semanas, 14 semanas y 16 semanas); siendo estos tiempos los adecuados para realizar la cosecha del tomillo.

La comparación entre las edades de corte, en relación al porcentaje de rendimiento de extracción se registra en la Tabla 2-1, donde los resultados obtenidos demostraron evidente diferencia estadística entre los grupos evaluados. Además es concluyente que el tomillo con 14 semanas de edad al corte presentó los mayores rendimientos en la obtención de AE.

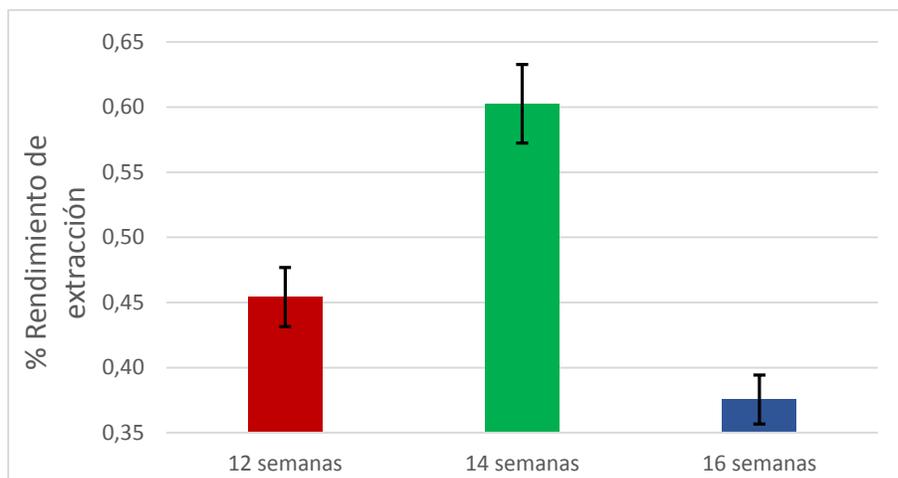
**Tabla 2-1.** Análisis de varianza para determinar diferencia en el rendimiento de extracción del AE esencial a diferentes edades de corte.

<i>Grupos (Semanas)</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>Desviación.Est.</i>
12	5	2,27	0,454	0,0001757	0,013
14	5	3,01	0,603	0,0000076	0,003
16	5	1,88	0,376	0,0000828	0,009

<i>Origen de las Variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,132684844	2	0,06	748,06	2,54E-13	3,88
Dentro de los Grupos	0,001064222	12	8,86E-05			
Total	0,133749067	14				

Para evidenciar los resultados obtenidos en los análisis estadísticos, la Figura 2-1 muestra el comportamiento que presentaron las diferentes corridas en el porcentaje del rendimiento de extracción del tomillo evaluado a las 12, 14 y 16 semanas de edad a la cosecha. Se evidencia lo reportado por Durán, (2005), quien demuestra que en las etapas jóvenes de los cultivos se presentan altos rendimientos de extracción en AE; además concluye que los rendimientos disminuyen a medida que las plantas alcanzan madurez, debido al aumento gradual de los tejidos no

asimilatorios, caso que justifica los valores bajos de extracción del AE en el tomillo con 16 semanas de edad al corte. Se pudo determinar que la semana ideal para realizar el corte del cultivo de tomillo es a las 14 semanas de edad donde se presentan los mayores porcentajes de extracción en AEs, alcanzando en promedio valores de 0.603%.



**Figura 2-1.** Rendimientos de extracción del aceite esencial del tomillo

Es claro que existe gran variedad de factores que afectan la producción de biomasa y la acumulación de aceites volátiles en las especies aromática, como lo son; el genotipo, las condiciones agronómicas, las condiciones ambientales, la variación geográfica, así como la época de cosecha, la edad de la planta y la densidad del cultivo (Figueiredo *et al.*, 2008), pero sin duda alguna el método de extracción afecta en gran medida el los rendimientos obtenidos para los AEs.

Los resultados encontrados en el porcentaje de rendimiento de extracción para el AE de tomillo, fueron inferiores a los reportados por Mohamad y colaboradores (2012), quienes registraron que AEs provenientes de las plantas del genero *Thymus* y extraídos a través de la metodología del arrastre con vapor presentan rendimientos que oscilan entre el 0.91% al 1.43%. Es oportuno mencionar que en dicho trabajo las especies aromáticas se encontraban en época de floración, en la cual se alcanza la mayor producción de aceite, pero debido a nuestras condiciones geográficas, el *Thymus vulgaris* solo florece bajo estados de estrés.

Los rendimientos obtenidos de extracción estuvieron en el rango reportado en la literatura por Sefidkon y colaboradores (2006), quienes expresan rendimientos entre el 0.5 al 2% para AEs. En estudios con Romero (*Rosmarinus officinalis*), se indica que en la extracción usando solventes se obtienen rendimientos promedio de 15.5% y con destilación por arrastre de vapor son de 1.3%. (Martinello y Pramparo, 2005). Asimismo se menciona que mediante la hidrodestilación se obtienen rendimientos de  $1.35\% \pm 0.104\%$  (Cerpa *et al.*, 2007).

Se puede concluir que los rendimientos son variables de acuerdo a las condiciones de trabajo y las especies vegetales usadas, pero se evidencia claramente que a través de la metodología del arrastre con vapor los porcentajes en rendimientos de extracción son menores al 2%, exceptuando algunos casos particulares como el clavo y la canela que reportan altos valores en aceite esencial (Ribeiro *et al.*, 2001).

#### **2.1.10. Caracterización del AE de Tomillo**

Para utilizar un AE en alguna matriz alimenticia, además del estudio de factibilidad de producción, es absolutamente necesario conocer su composición detallada; condición imprescindible para establecer la calidad y la funcionalidad que este tiene. Los AEs son mezclas muy complejas, por lo que la identificación de sus componentes es un trabajo complejo y de gran variabilidad, actualmente los métodos de análisis son mucho más avanzados. Se realizó la caracterización química a través de CG-EM, en la Tabla 2-2, se registran los resultados obtenidos resaltando seis componentes mayoritarios que representan más del 60% de la composición química del AE.

De acuerdo a lo que establece Flores, (2010), se denomina “quimiotipo” a un grupo de individuos de una especie que se distingue en forma significativa del resto por su composición química, a partir de este hecho se distinguen de modo significativo los AEs de una especie vegetal de acuerdo a los demás miembros de su especie ya sea por la presencia o la concentración de uno o varios compuestos. Para el tomillo (*Thymus vulgaris*) se han establecido alrededor de ocho quimiotipos diferentes de acuerdo a los componentes químicos que presentan mayor porcentaje de participación.

Cabe resaltar que el quimiotipo es importante para identificar y definir el potencial funcional de cada AE; siendo rigurosas las precauciones de uso en lo que atañe a la dosis, el modo de empleo y la matriz a la que se va aplicar. Según la Tabla 2-2, el quimiotipo del AE, concuerda con reportes de Acevedo y colaboradores (2007), donde el timol presenta una abundancia de 35.8%, el p-cimeno 19.5% y  $\gamma$ -terpineno con alrededor de 9.7%.

En estudios semejantes realizados por Gavahian y colaboradores (2012), quienes comparando diferentes métodos de extracción de aceites esenciales, encontraron que la composición del AE de tomillo, obedecía al quimiotipo Timol (34.98% $\pm$ 0.02%). No obstante, se ha de tener en cuenta que la composición del AE es variable según la época, la edad de la planta, el lugar de la cosecha y el método de extracción.

En la Figura 2-2, se ilustra la diferencia en porcentaje de los componentes mayoritarios del AE de tomillo según las diferentes semanas de edad al corte. Para lograr determinar si la abundancia relativa de los componentes mayoritarios en el AE cambia con respecto a la edad fisiológica de la planta, se tomaron los tres componentes mayoritarios encontrados (timol, p-cymene y  $\gamma$ -terpineno), para los cuales se realizó el análisis de varianza de un factor con nivel de significancia del 95%.

Se puede concluir que el AE del tomillo con 12, 14 y 16 semanas de edad no muestra diferencia significativa en el porcentaje de sus componentes activos primordiales caso puntual para el timol; sin embargo existe diferencia en la abundancia del componente como el  $\gamma$ -terpineno que se muestra en mayor porcentaje para el AE con 14 semanas de edad al momento de la cosecha.

En el análisis estadístico se observó que los porcentajes encontrados de abundancia relativa del timol para cada semana de prueba no presentaban diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 2-2.** Composición química del AE de *Thymus vulgaris* a diferentes edades a cosecha

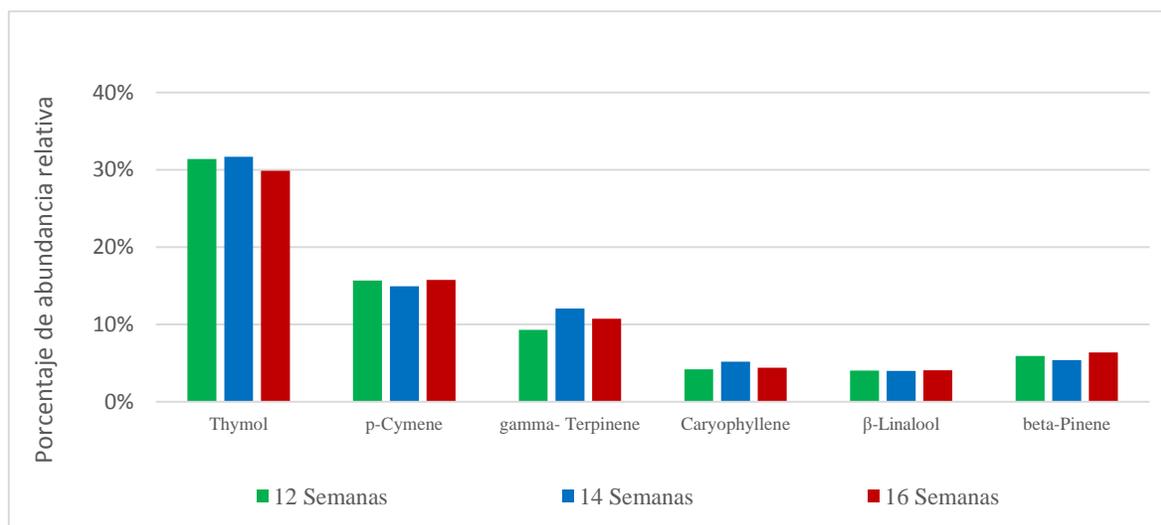
<b>Aceite Esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)</b>			
<b>Edad del material vegetal</b>	<b>Componentes mayoritarios</b>	<b>TR* (min)</b>	<b>AR* (%)</b>
<b>12 semanas</b>	<i>Thymol</i>	25,12	31,40%
	<i>p-Cymene</i>	11,17	15,68%
	<i>gamma-Terpinene</i>	12,87	9,29%
	<i>beta-Pinene</i>	8,82	5,94%
	<i>β-Linalool</i>	14,53	4,03%
	<i>Caryophyllene</i>	30,72	4,20%
<b>14 semanas</b>	<i>Thymol</i>	25,16	31,67%
	<i>p-Cymene</i>	11,16	14,93%
	<i>gamma-Terpinene</i>	12,89	12,07%
	<i>beta-Pinene</i>	9,56	5,41%
	<i>β-Linalool</i>	14,50	4,00%
	<i>Caryophyllene</i>	30,71	5,17%
<b>16 semanas</b>	<i>Thymol</i>	25,14	29,86%
	<i>p-Cymene</i>	11,17	15,77%
	<i>gamma-Terpinene</i>	12,91	10,74%
	<i>beta-Pinene</i>	9,57	6,38%
	<i>β-Linalool</i>	14,52	4,09%
	<i>Caryophyllene</i>	30,69	4,42%

Promedio de n=3; TR (Tiempo de retención); AR (Abundancia Relativa).

Estos resultados otorgan ventajas al AE con 14 semanas de edad al corte por presentar las mejores características en porcentaje de extracción y abundancia en los componentes mayoritarios; además los diferentes perfiles cromatográficos se evidencia que los metabolitos secundarios obtenidos clasifican el AE extraído del tomillo en el quimiotipo timol, por ser el componente mayoritario eluído de la cromatografía de gases.

Resultados que van en contradicción con los reportes de Juárez R, (2010), quien demostró que a mayor edad el tomillo presentaba valores de timol mayores del 40%; cabe resaltar que dicho trabajo se realizó bajo diferentes condiciones de fertilización

y en condiciones geográficas donde el *Thymus vulgaris* alcanza la floración, estado que no se manifiesta en las condiciones del Oriente de Antioquia (Colombia). Dentro de los componentes activos que otorgan potencial funcional al tomillo se resalta que más del 65% es atribuido a componentes fenólicos.



**Figura 2-2.** Porcentaje de los componentes mayoritarios del AE de Tomillo a 12, 14 y 16 semanas de edad al corte.

Los tres componentes mayoritarios caracterizados en el AE del presente estudio, se encuentran en el grupo de los terpenoides clasificados como monoterpenos. Es de resaltar que el timol, se clasifica como una molécula funcionalizada, debido a ser un componente químico perteneciente al grupo de los fenoles (Rababah *et al.*, 2010). La presencia de compuestos fenólicos, sugieren actividad bactericida para los extractos obtenidos de plantas aromáticas como el tomillo (*Thymus vulgaris*), lo cual se ve favorecido por la naturaleza ácida de su grupo hidroxilo, el cual forma un puente de hidrógeno con un sitio activo enzimático (Kalemba y Kunicka, 2003). Para el estudio se realizó la caracterización del AE de tomillo con 14 semanas de edad en base a sus condiciones organolépticas y composición general. Los resultados obtenidos sobre la caracterización organoléptica (olor, color, sabor y aspecto general) y algunos parámetros generales del AE se registran en la Tabla 2-3. Los

valores obtenidos concuerdan con los resultados reportados por López (2006), respecto a la caracterización del AE obtenidos de diferente especies de tomillo.

Cabe mencionar que los parámetros de calidad que deben cumplir los AEs no son claros y además no está debidamente regulados, ya que al ser catalogadas como sustancias GRAS, su uso se limita a buenas prácticas de manufactura; lo cual nos indica que faltan estudios que realmente demuestren los impactos que pueden generar el uso de estos compuestos naturales como conservantes en diferentes alimentos.

**Tabla 2-3.** Composición general del AE de tomillo de 14 semanas al corte.

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>AE DE TOMILLO</b>
<b>Densidad relativa (g/mL)</b>	0.91
<b>pH</b>	5.45
<b>Olor</b>	Característico, aromático e Irritante.
<b>Color</b>	Amarillo levemente oscuro.
<b>Sabor</b>	Picante, penetrante y levemente irritante.
<b>Aspecto general</b>	Líquido fluido, levemente turbio.

### **2.1.11. Determinación de la menor concentración con efecto inhibitorio del AE de Tomillo**

El AE exhibió acción antimicrobiana contra *L. monocytogenes*; en la Tabla 2-4 se puede apreciar los resultados obtenidos en la evaluación de la menor concentración necesaria para inhibir el crecimiento de la *Listeria* expresado en el diámetro del halo de inhibición. En esta evaluación se probaron concentraciones desde 0.005% hasta 2.4% donde el AE fue diluido en DMSO. Como se observa en los resultados, el AE

de tomillo solo mostró actividad biocida contra *Listeria monocytogenes* a una concentración no menor de 1.6%.

Con respecto a los controles utilizados, como lo fueron el benzoato de sodio y el sorbato de potasio no mostraron efecto antimicrobiano contra *Listeria* a las concentraciones recomendadas para ser usadas en la formulación de alimentos, resultados similares a los reportados en el trabajo de Castaño y colaboradores (2010), donde estos conservantes no presentaron inhibición contra cepas patógenas presentes en matrices alimentarias, se explica el hecho de que los conservantes aprobados para alimentos no presenten inhibición a las concentraciones evaluadas, se debe a las condiciones de cultivo *In Vitro* son ideales para el crecimiento microbiano.

Fundamentalmente estos conservantes actúan como inhibidores (bacteriostático) del crecimiento microbiano y usualmente las cantidades permitidas o las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación.

**Tabla 2-4.** Efecto inhibitorio del AE de tomillo sobre *L. monocytogenes*.

<b>Tamaño halos de inhibición (mm)</b>				
<b>Microorganismo</b>	<b>AE Tomillo</b>	<b>Repetición 1</b>	<b>Repetición 2</b>	<b>Repetición 3</b>
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	AE PURO	70.00	75.00	80.00
	AE (0.005-0.5%)	**	**	**
	AE (0.5%-1%)	**	**	**
	AE (1.6%)	11.33	12.00	11.70
	AE (1.8%)	12.33	12.33	13.00
	AE (2.0%)	13.33	12.67	14.00
	AE (2.2%)	17.67	17.67	16.67
	AE (2.4%)	21.67	19.33	19.33
	Control (-) DMSO	**	**	**
	Control (-) Disco de papel	**	**	**
	Control (+) BS+SP (0.12%)	**	**	**

\*\*No hubo inhibición del crecimiento de la bacteria. Sorbato de Potasio (SP), Benzoato de Sodio (BS), Dimetilsulfoxido (DMSO).

*Listeria* es capaz de multiplicarse hasta alcanzar recuentos microbianos elevados por ser resistente a los conservantes o condiciones de conservación habituales en alimentos tales como el vacío, la atmósfera modificada y el uso de sales (Gonzalez, *et al.*, 2011), además se debe resaltar que las condiciones de inoculación favorecen el crecimiento del patógeno al encontrarse en un medio ideal para multiplicarse. Para determinar si existe diferencia significativa entre las concentraciones a las cuales el AE presentó efecto antimicrobiano se realizó un análisis de varianza (Tabla 2-5), donde se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones evaluadas. La prueba de Tukey se realizó como parámetro de comparación múltiple, tomando como variable el halo de inhibición, los resultados obtenidos se registran en las Tablas 2-6.

**Tabla 2-5.** Análisis de varianza del halo de inhibición de las concentraciones del AE de tomillo.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
<b>Concentración</b>	4	154.376	38.594	59.595	6,134E-07
<b>Residuals</b>	10	6.476	0.648		
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Los resultados estadísticos demostraron que no existe diferencia significativa en el efecto biocida, basado en los milímetros del halo de inhibición, para el rango de concentraciones de 1.6% hasta 2.0%. Concentraciones superiores a este rango presentaron halos de inhibición mayores. Es claro que el objetivo del trabajo fue determinar la menor concentración con efecto inhibitorio, donde el AE de tomillo presentara actividad antimicrobiano contra *L. monocytogenes*, por ende el efecto biocida se alcanzó a una concentración no menor a 1.6%.

**Tabla 2-6.** Prueba de Tukey con nivel de significancia del 95%.

Tamaño halos de inhibición (mm)				
Microorganismo	AE Tomillo	Repetición1	Repetición2	Repetición 3
<i>L. monocytogenes</i>	AE (1.6%)	11.33 <sup>a</sup>	12,00 <sup>a</sup>	11,70 <sup>a</sup>
	AE (1.8%)	12.33 <sup>a</sup>	12,33 <sup>a</sup>	13,00 <sup>a</sup>
	AE (2.0%)	13.33 <sup>a</sup>	12,67 <sup>a</sup>	14,00 <sup>a</sup>
	AE (2.2%)	17.67 <sup>b</sup>	17,67 <sup>b</sup>	16,67 <sup>b</sup>
	AE (2.4%)	21.67 <sup>c</sup>	19,33 <sup>c</sup>	19,33 <sup>c</sup>

(a-c) Diferentes letras como superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) dentro de la misma columna para cada una de las concentraciones empleadas.

Los resultados obtenidos son valores que superan los reportados en la literatura; Castaño y colaboradores (2010), quienes evaluaron el efecto del AE de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) contra bacterias gram-positivas, encontraron que fue activo sobre *L. monocytogenes* con una concentración de 0.1024%. Por otro lado en estudios donde se probaron diferentes AEs se encontró que la actividad biocida contra bacterias gram-positivas se alcanzaba a concentraciones de 0.5% para *L. monocytogenes* (Celiktas *et al.*, 2007). Algunas investigaciones han demostrado actividad en concentraciones de 0.02% frente a *L. monocytogenes*, asociando esta concentración a la presencia de timol. Además se ha determinado que el efecto del AE del *T. vulgaris*, no presenta actividad en bajas concentraciones frente algunas cepas bacteriana, por ejemplo contra la presencia de *Clostridium perfringens* (Ardila, *et al.*, 2009). Viuda Martos (2012), reporta que el tomillo presenta potente efecto biocida, en significativos halos de inhibición, dicho efecto es asociado a la acción principal que ejercen sus componentes mayoritarios en altas concentraciones; en dichos trabajos se probó el AE del tomillo contra seis especies bacterianas, donde se determinó efecto inhibitorio. Mazzarrino y colaboradores (2014), utilizando el aceite esencial de *Thymus vulgaris* contra diversas cepas patógenas, observaron que presentaba gran espectro de acción sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas, sin embargo la actividad bactericida sobre *L. monocytogenes* se catalogó

como intermedia. Por otro lado en la investigación realizada por Abdollahzadeh y colaboradores (2013), utilizando AE de tomillo con el propósito de conservar carne, lograron determinar que tratamientos con adiciones de 0.4% exhibía bajo efecto biocida contra *L. monocytogenes*, pero al agregar concentraciones comprendidas entre el 0.8% y el 1.2% lograban alcanzar los mayores efectos de conservación, valores que se asemejan a los encontrados en el presente trabajo. Se ha demostrado actividad antibacterial de AE de tomillo en la formulación de quesos tipo feta contra *L. monocytogenes*, al ser adicionado en una concentración de 0.1%, alcanzando una letalidad del 81.5%; teniendo en cuenta que los altos niveles de timol y carvacrol sugieren dicha efectividad (Govaris *et al.*, 2010).

Castaño, (2013) realizó ensayos para demostrar el efecto del AE de clavo y canela utilizado en la formulación de leches saborizadas, con el propósito de inhibir el crecimiento de *Rhodotorula mucilaginosa*; demostró que los mejores resultados fueron obtenidos bajo la dosis de 2.0%, porcentaje de inclusión que supera los reportes de la literatura y los porcentajes encontrados en el presente trabajo, aunque las condiciones del microorganismos son distintas al utilizado en este trabajo se puede observar que en las dos investigaciones se sugieren altas dosis para encontrar efecto biocida. Por otro parte Paparella (2008), en su investigación demostró que el AE de tomillo presenta gran actividad antibacterial; es así que utilizando una concentración de 0.10% se observó significativa disminución en la viabilidad celular, de un medio que se inoculo con 4LogCFU/ml de *L. monocytogenes*. A medida que se aumentaba la concentración la reducción progresiva de viabilidad celular era evidente. La menor concentración inhibitoria, encontrada en esta investigación, es superior a los diferentes reportes que existen sobre el efecto biocida otorgado para el AE de tomillo, incluso comparado con diferentes concentraciones utilizadas, para demostrar la efectividad antimicrobiana de AEs extraídos de diferentes especies aromáticas; pero se relaciona con la resistencia que presenta *Listeria monocytogenes* contra el efecto de algunos AEs que son usados a bajas concentraciones. Por ende es necesario dejar claro que el efecto biocida de los AEs está estrechamente ligado al tipo de microorganismo y a la especie aromática probada, además de las condiciones de experimentación, lo

cual nos ha otorgado diversidad en los resultados encontrados y variedad en las conclusiones determinadas por los diferentes autores. Por dicha razón, estos resultados no se han logrado extrapolar con éxito a diferentes matrices alimentarias. Es posible que el efecto a una concentración tan alta, encontrada en el presente estudio, sea debido a la composición química del AE del tomillo, donde el timol siendo el componente mayoritario no se reporta en concentraciones mayores del 35%, es probable que lo anterior se haya dado por las condiciones de crecimiento de la planta, la geografía y el clima; condiciones que pueden afectar las propiedades antimicrobianas. La actividad biológica del AE del tomillo está relacionada con sus principales componentes, denominados timol y carvacrol. El timol tiene efectos antibacterianos, antifúngicos y antihelmínticos, efectos demostrados en diversos estudios (Pérez y Prieto, 2007). Su mecanismo de acción no está determinado en gran detalle, se considera que la participación de los diferentes grupos químicos que lo componen toman diferentes mecanismos de acción sobre la célula (Hammer *et al.*, 2004). Pero no todos los mecanismos son independientes, algunos son afectados como consecuencia de la acción de otro (Burt, 2004). Sin duda alguna la característica biocida más importante es atribuida a que los aceites y sus componentes poseen carácter hidrofóbico, lo cual les permite permear la membrana celular de los microorganismos alterando su estructura principalmente, dándose la salida de macromoléculas vitales. Además se puede incluir la interacción de los compuestos fenólicos con las proteínas presentes en membrana afectando su funcionalidad (Barrera y Acosta, 2013).

Por otra parte, se puede justificar que los resultados están influenciado por la efectividad del método utilizado para la prueba de inhibición; donde se utilizó el método de difusión en discos, los cuales fueron impregnados con AE de tomillo en diferentes concentraciones. El fundamento principal se basó en que el AE depositado en la placa recién inoculada, producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo de interés, analizado en un punto de gradiente y como resultado un área concéntrica al disco. Dicha área al ser proporcional a la concentración inhibitoria permitirá la distinción sobre la susceptibilidad y determinar la menor concentración con efecto inhibitorio, debido a que la interpretación del halo está

basada en la correlación entre el diámetro y la concentración mínima inhibitoria, como es descrito por el Instituto de Estándares del laboratorio Clínico de los Estados Unidos (CLSI). Por lo anterior, se puede clasificar la técnica utilizada como una adaptación de los métodos de gradientes, similar al E-Test. Los resultados obtenidos sobre efecto del aceite esencial de tomillo expresado en el diámetros del halo de inhibición, no fueron reportados dentro de la categoría de susceptible, intermedia o resistente para el microorganismo, debido a que no se conocían puntos de corte (PC) para su clasificación, por ende el solo hecho de presentar halo de inhibición indicaba actividad biocida contra *L. monocytogenes*. Dichos PC son estándares para lograr determinar la efectividad del antimicrobiano, al ser comparado estos valores con los resultados de las metodologías tanto de difusión como de dilución y lograr atribuir una característica de resistencia o susceptibilidad. Aunque el método utilizado se puede determinar como presuntivo, se considera como alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana, del que cabe destacar su sencillez. No obstante se sugiere profundizar en los análisis de correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CMI. Estos métodos de difusión en agar apoyados por datos de laboratorios, presentan ventaja debido a que los resultados son altamente reproducibles. Sin embargo, el fundamento es determinar en forma cuantitativa, el efecto del aceite sobre el microorganismo de interés (Ramirez y Castaño, 2009).

Se han descrito en trabajos de investigación varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro, el cual se compone de celulosa que al presentar muchos grupos hidroxilos libres, hacen que la superficie del disco sea hidrofílica (Burgess, *et al.*, 1999, Ramirez y Castaño, 2009), actuando sobre algunos compuesto de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión, por otro lado los compuestos apolares no son influenciados. Otra de las desventajas radica en que la lectura de los resultados solo representa la actividad *In vitro* de la sustancia. Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por factores, como el medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de

generación del microorganismo y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba.

## 2.5 CONCLUSIONES

El tomillo de la empresa Aromassence cosechado con 14 semanas de edad al corte presentó los mayores porcentajes en el rendimiento de extracción de AE. Es claro que existe gran variedad de factores que afectan la producción de biomasa y la acumulación de compuestos volátiles en las especies vegetales; para el presente trabajo se evidenció que a medida que aumenta la edad de cosecha, disminuye la cantidad de aceite, comportamiento atribuido a la pérdida de tejidos asimilatorios. Con respecto al análisis del quimiotipo se determinó que la composición del AE no presenta diferencia significativa en las edades evaluadas, con respecto a la abundancia relativa de sus componentes activos primordiales. Estos resultados otorgaron ventajas al AE del tomillo con 14 semanas de edad al corte, por presentar las mejores características en porcentaje de extracción y abundancia de componentes mayoritarios. El efecto antimicrobiano del AE de tomillo sobre *L. monocytogenes* se determinó a concentraciones no menores de 1.6%, estos resultados son atribuidos a tres posibles características, la primera a la composición química, donde el timol siendo el componente mayoritario no se reporta en concentraciones mayores del 32%, lo anterior es probable por las condiciones de crecimiento de la planta, la geografía y el clima; condiciones que pueden afectar las propiedades antimicrobianas. El segundo aspecto es atribuido a la resistencia que presenta la *L. monocytogenes* ante el efecto de algunos conservantes que no muestran actividad al ser utilizados a bajas concentraciones. Por último se resalta que las técnicas utilizadas para probar antimicrobianos, deben estar enfocadas de acuerdo a la naturaleza del extracto, por ende extractos no polares o sustancias que no difundan bien en el agar es más recomendable el uso de las técnicas de dilución más que las de difusión. En general, los resultados sugieren la realización de mayores estudios *In Vitro*, considerando exponer mayor variedad de microorganismos patógenos contra el efecto biocida del AE de tomillo, para lograr

determinar las correlaciones entre halos de inhibición y concentraciones inhibitorias; además se hace necesario estandarizar las metodologías propias que demuestre valores acertados con márgenes de error bajos; todo esto en busca de lograr una aplicación científica que justifique el uso de los AEs extraídos de plantas aromáticas, teniendo en cuenta la composición química y las propiedades que nos permitirían mayor confiabilidad en sus usos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la empresa Aromassence por su constante participación en el proyecto con la transferencia de conocimiento y su aporte con el material vegetal en todo el proceso; a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por la financiación a través del programa de fortalecimiento de proyectos de investigación de posgrados; a COLCIENCIAS por la beca del programa de jóvenes investigadores; al grupo de investigación de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo y especialmente al laboratorio de Frutas y Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por su disponibilidad en la investigación.

## Bibliografía

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2013). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177–183.
- Acevedo, A. M., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Reyes, J. A., Kouznetsov, V., & Stashenko, E. E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol. *Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Centro de Investigación en Biomoléculas – CIBIMOL y Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander* (pp. 125–128).
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2014). Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 62, pp. 156–161).
- Ardila, M., Vargas, A., Pérez, J., & Mejía, L. (2009). Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 8(1), 37–46.
- Bach, E., Lagos, R., & Rosa, L. (2003). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis, (Mic).
- Bandoni, A. L., Retta, D., Lira, P. M. D. L. E. O., & van Baren, C. M. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 8(5), 317–322.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). y hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149–154.
- Burgess, J. G., Jordan, E. M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., & Boyd, K. G. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*, 70(1), 27–32.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.

- Cam, J. A., & Trujillo, M. A. (2011). Contribución a la química de los aceites esenciales provenientes del oregano. *Facultad de Ciencias Naturales Y Exactas; Departamento de Química Y Ciencias. Universidad de Playa Ancha; (UPLA); Valparaíso-Chile*, (1), 1–5.
- Cano, C., Bonilla, P., & Roque, M. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica*, 25(3), 298–301.
- Castaño, H. I., Ciro, G., Zapata, J. E., & Jiménez, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae (Medellín)*, 17(2), 149–154.
- Castaño, M. V. (2013). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*syzygium aromaticum*) y canela (*cinnamomum verum*), sobre la levadura (*rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. E., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553–559.
- Cerpa, M. G., Mato, R. B., & Cocero, M. J. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales. Modelado y caracterización. *AIChE Journal*, 54(4), 909–917.
- Colivet, J., Belloso, G., & Hurtado, E. (2006). Comparación del efecto inhibitor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus* sp. Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Escuela de Zootecnia, Departamento de Biología y Sanidad Animal, Programa de Tecnología de los Alimentos, Venezuela.
- Coy Barrera, C. A., & Eunice Acosta, G. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 237–246.
- Durán, C. (2005). Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. *Bucaramanga: Tesis de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander*.
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., & Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried

- sage (*Salvia officinalis*) using ethanol water mixtures. *Food Chemistry*, 101(4), 1417–1424.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213–226.
- Flores, M. C. (2010). *Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso: análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo*. Universidad de Chile.
- Fuentes, A. (2005). Evaluación del rendimiento y calidad de Aceite Esencial crudo de Tomillo (*thymus vulgaris* L.); cultivado en Chaquijyá, sololá extraído a nivel laboratorio y planta piloto. *Trabajo de Grado. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala*.
- García, C., Martínez, A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.
- Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., & Majzoobi, M. (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 85–91.
- Gonzalez, C. A., Sánchez, E. P., Padalino, M., & Frontela, M. del C. (2011). Efecto de distintos antimicrobianos sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.
- Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., & Chatzopoulou, P. S. (2010). Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1240–1244.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 1081–1085.
- Juárez R, C. R. (2010). Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo.
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829.

- López Luengo, M. T. (2006). Investigación de los aceites esenciales, sus características y finalidad de uso: análisis del estado de su regulación en Chile y el mundo. *Offarm: Farmacia Y Sociedad*, 25(1), 74–77.
- Luján, C. C. G., Martínez, A., Ortega, J., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.
- Martinello, M. A., & Pramparo, M. (2005). Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. *Información Tecnológica*, 16(5), 17–20.
- Martinez, A., Ospina, F., Valencia, G., & Jimenez, N. (2003). Manual de Practicas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica 2003. *Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Medellín. Colombia.*
- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Serio, A. (2014). Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794–803.
- Ministerio de Salud. (1991). Colombia. Abril 5: Por el cual se reglamenta el Título V Alimentos de la Ley 09 de 1979 en lo Resolución 4125 de 1991 concerniente a los Conservantes utilizados en Alimentos. Santa Fe de Bogotá:
- Mohamad, P. S. Z., Reza, H., Jalil, K., & Reza, E. (2012). Determination and comparing of the essential oil components in wild and cultivated populations of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. *African Journal of Plant Science*, 6(2), 89–95.
- Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria*, 1(2), 147–154.
- Olivera, F., Caron, G. R., & Brandelli, A. (2004). Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 21(1), 53–58.
- Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Chaves-López, C., Serio, A., Marsilio, F., & Suzzi, G. (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19(12), 1174–1182.

- Pérez, D. D. L. P. G., & Prieto, L. M. R. (2007). Estudio del efecto antimicrobiano del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*, combinado con inactivación térmica, sobre la cepa de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Quezada, A. (2008). Evaluación del Rendimiento de Extracción del aceite esencial crudo de Orégano (*Lippia Graveolens*) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto. Universidad De San Carlos De Guatemala. Tesis. 60p.
- Rababah, T. M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K., & Yang, W. (2010). Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. *Journal of Food Science*, 75(7), C626–C632.
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 2(42).
- Ribeiro, O. V., Alva, A., & Valles, J. M. (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Alimentaria*, 1(1), 38–42.
- Roldan. (2010). Roldan F., L. 2010. Evaluacion del uso de los aceites esenciales como alternativa al uso de los antibioticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. Tesis de maestria. Universidad Nacional de colombia. Fac. Medicina Vetreinaria y zootecnia. Bogota.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170.
- Sefidkon, F., Abbasi, K., & Khaniki, G. B. (2006). *Influence of drying and extraction methods on jengibre (Zingiber officinale)*. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, Universidad Nacional Amazónica del Perú.
- Solís, P. N. (2012). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de Orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como Potenciales Bioconservadores en Carne de Pollo..
- Vanegas, V., & Rueda, Y. (2013). Estudio comparativo de la composición química del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae) proveniente de cinco regiones de Norte de Santander. Colombia. *Bistua revista de la facultad de ciencias basicas*, 9(1).

Viuda Martos, M. (2012). Caracterización y aplicación de aceites esenciales de especias y aguas de lavado obtenidas como coproducto del proceso de obtención de fibra de cítricos como inhibidores naturales en productos cárnicos. *Universidad Miguel Hernández Escuela Politécnica Superior de Orihuela*.

Zapata, S., Muñoz, J., Orlando, S., Montoya, O. I., & Gutiérrez, P. A. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1), 75–82.

## 3 Capítulo. Actividad biocida del Aceite Esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta

Andrés F. MORALES C. Zootecnista.\*<sup>4</sup>, José V. HIGUERA M. M.Sc.<sup>5</sup>, Edith M. CADENA C. Ph.D.<sup>6</sup>

### 3.1. RESUMEN

**Antecedentes:** Debido a su composición fisicoquímica, los quesos frescos son catalogados como un alimento de alto riesgo, debido a que se han asociado como los causantes de abortos y meningitis infantil; en este sentido, los análisis microbiológicos han reportado prevalencias de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, por lo cual se necesita desarrollar alternativas para la conservación de los alimentos, garantizando seguridad a los consumidores; una de estas alternativas ha sido el uso de aditivos naturales como lo son los aceites esenciales (AEs). **Objetivo:** Determinar el efecto biocida del AE de tomillo (*Thymus vulgaris*), contra la actividad de *Listeria monocytogenes*, adicionado en la elaboración del queso Ricotta. **Métodos:** Se elaboró el queso Ricotta a partir de leche descremada, la cual fue acidificada con ácido cítrico hasta alcanzar 0.3% de acidez, el AE de tomillo fue adicionado en concentración de 1.6% del peso de la

---

<sup>4</sup> Estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59A No63-20, Medellín, Colombia

<sup>5</sup> Profesor Asociado. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59A No63-20, Medellín, Colombia.

<sup>6</sup> Profesora Asociada. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín Calle 59A No63-20, Medellín, Colombia.

\*Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: afmoralesc@unal.edu.co

cuajada. Se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica del queso, de acuerdo a lo establecido en la normatividad colombiana. Se realizó un perfil sensorial por aproximación multidimensional del queso Ricotta con AE de tomillo, donde se determinó la mayor información sobre los atributos organolépticos. Para la prueba de inhibición del AE de tomillo, se realizó la adaptación de las pruebas de recuentos microbiológicos para patógenos, sobre el queso Ricotta inoculado con *L. monocytogenes*, la duración de la prueba fue de 28 días. **Resultados:** El queso Ricotta formulado con aceite de tomillo se clasificó según sus características fisicoquímicas como un queso firme/semiduro descremado. Se observó que el queso con AE, evaluado microbiológicamente a 48 horas de elaboración, cumple con los requerimientos exigidos por la normatividad colombiana. El perfil sensorial determinó que el queso con AE presentó calidad alta en aspectos como textura y apariencia general. El recuento de *L. monocytogenes* en el queso con AE, disminuyó de 7.18 Log UFC/g (equivalente a 15000000 UFC/g) a valores de 3.70 Log UFC/g (equivalente a 5100 UFC/g) durante 14 días de la prueba, mostrando actividad biocida, representando una disminución del 48.46% con respecto a las UFC/g iniciales. **Conclusiones:** El AE de tomillo adicionado al queso Ricotta influye en la percepción sensorial, al cambiar algunos matices lácteos, por otro lado se evidencia gran oportunidad para los aceites esenciales como aditivos conservantes, por su efecto biocida contra un amplio rango de microorganismos patógenos, sin embargo hay mucho por investigar para lograr obtener productos más sanos, nutritivos y con mejor características sensoriales.

**Palabras claves:** Aceite esencial, Análisis sensorial, Tomillo, *Listeria monocytogenes*, Queso Ricotta.

### 3.1 SUMMARY

**Background:** Due to their physicochemical composition, cheeses are recognized as a high-risk food, and they have been associated as the cause of childhood meningitis and abortions. Similarly, microbiological analyses have reported prevalence of pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes*. Therefore, alternatives for the preservation of food need to be developed to ensure safety for consumers. One such alternative has been the use of natural additives such as essential oils (EOs). **Objective:** Determine the biocidal effect of thyme EO (*Thymus vulgaris*) against *Listeria monocytogenes* activity by using the EO for cheese production. **Methods:** Ricotta cheese was made from skim milk and was acidified with citric acid to reach 0.3% of acidity; thyme EO was added at a concentration of 1.6% by weight of the curd. The physicochemical and microbiological characterization of cheese were made according to the provisions of Colombian law. A sensory profile was performed by a multidimensional approach of Ricotta cheese with thyme EO, where the most information about organoleptic attributes was determined. For the inhibition test of thyme EO, adapting tests for pathogenic microbiological counts of Ricotta cheese inoculated with *L. monocytogenes* were held for 28 days. **Results:** Ricotta cheese made with thyme oil was classified according to its physicochemical characteristics as a firm/semihard skimmed cheese. It was observed that the cheese with EO, microbiologically evaluated at 48 hours of preparation, satisfied the requirements established by Colombian law. The sensory profile determined that the cheese with EO presented high quality in aspects like texture and overall appearance. The count of *L. monocytogenes* in cheese with EO decreased from 7.18 log CFU/g (equivalent to  $1.5 \times 10^6$  CFU/g) values to 4.95 log CFU/g (equivalent to 5100 CFU/g) after 2 days of assessment, behavior that continued for 14 more days of testing. Biocidal activity up to 3.70 Log CFU/g was observed, representing a decrease of 48.46% with respect to the initial CFU/g. **Conclusions:** EO added to thyme Ricotta cheese influences sensory perception, changing some dairy shades, while on the other

hand, a great opportunity for essential oils as preservatives additives was discovered for its biocidal effect against a broad range of pathogens. However, much research is needed to produce healthier and more nutritious products with better sensory characteristics.

**Keywords:** Essential oil, Sensory Analysis, thyme, *Listeria monocytogenes*, Ricotta.

### 3.2. INTRODUCCIÓN

*L. monocytogenes* es un microorganismo patógeno que se ha logrado aislar de gran variedad de productos alimenticios, por lo cual ha sido reconocido como un importante problema, debido a que la mayoría de los casos de Listeriosis son causados por la ingesta de alimentos contaminados (Paparella *et al.*, 2008). Se cree que el 99% de los casos de Listeriosis son de origen alimentario, el resto obedece a la infección en recién nacidos transmitida través de la madre (González *et al.*, 2009). El género *Listeria* está formado por seis especies diferentes donde solo dos de ellas se consideran de gran patogenicidad (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*); por lo cual toma gran interés prevenir la presencia de *L. monocytogenes*, la cual produce una enfermedad de forma invasiva, que afecta el Sistema Nervioso Central (SNC) y una forma no invasiva, que ocasiona síndrome gastrointestinal. Esta bacteria gram-positiva, se caracteriza por ser aerobia o anaerobia facultativa, móvil a 25°C, con capacidad de sobrevivir a temperaturas extremas en un óptimo a 37°C para su crecimiento, considerada como patógeno psicrótrofo por lograr desarrollarse a temperaturas de refrigeración, tolera rangos de pH entre 4.4 a 9.4 y tiene la capacidad de crecer en presencia de 10-20% de NaCl. Estas características le otorgan las condiciones idóneas para ser considerada como uno de los patógenos de mayor preocupación en la industria de alimentos (Mercado y Llenque, 2012). Los quesos frescos debido a su composición físico-química, están catalogados como un alimento de alto riesgo en salud pública y su consumo se ha asociado con algunos casos de abortos y meningitis infantil; en este sentido, estudios realizados sobre la calidad microbiológica de quesos producidos y

comercializados en Colombia reportaron presencia de microorganismos patógenos, resaltando el aislamiento de *L.monocytogenes* en quesos frescos comercializados, representando un gran problema al asociarse con altos índices de mortalidad y en la mayor tasa de hospitalización causada por enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) (Gallegos *et al.*, 2007). De acuerdo al Simposio Internacional sobre Problemas de Listeriosis (ISOPOL XVIII), se concluyó que el consumo de productos lácteos fabricados sin tratamientos de pasteurización ha aumentado significativamente y con esto los casos de Listeriosis, que han provocado cerca del 20% de las muertes por el consumo de quesos contaminados. Sin lugar a dudas los quesos son un alimento de gran consumo desde épocas ancestrales y en países como Colombia aunque el consumo per cápita tan solo es de 1.1 Kg es un alimento que hace parte de la canasta familiar, y sin duda alguna ha sido considerado como uno de los productos en el cual su vida de anaquel puede ser acortada fácilmente, debido a contaminación durante la elaboración o por situaciones durante periodos extensos de almacenamiento (Kristensen *et al.*, 2001), afectando la calidad que inevitablemente cambia durante su vida útil por reacciones fisicoquímicas y por exposición a la acción de diferentes agentes microbiológicos. Para el caso específico, los quesos frescos por sus condiciones fisicoquímicas son altamente susceptibles a la contaminación microbiológica lo cual ha conllevado a la industria de alimentos a desarrollar diferentes estrategias en el control de patógenos, que van desde tratamientos térmicos hasta el uso de sustancias naturales que otorguen estabilidad microbiológica, por ende el uso de los Aceites Esenciales (AEs) se ha convertido en una eficiente alternativa (Asensio *et al.*, 2012). Los AEs interactúan con varios componentes celulares, afectando procesos metabólicos y fisiológicos en los microorganismos, además de modificar la permeabilidad de la membrana y afectar la producción de ATP (Lambert *et al.*, 2001). La actividad biocida de diferentes AEs contra *L. monocytogenes* ha sido estudiada; pero la gran mayoría de dichos estudios son realizados de manera *In Vitro*, muy pocos se han enfocado al comportamiento que presentan al ser adicionado en diferentes alimentos; para el caso particular de los derivados lácteos los reportes son más escasos. Por ende el objetivo del presente trabajo se basó en

investigar la efectividad antimicrobiana del AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *L. monocytogenes* inoculada en queso Ricotta debido a sus características de fisicoquímicas, además se determinó los efectos colaterales en sus propiedades organolépticas.

### **3.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1. Lugar de estudio**

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Frutas y Hortalizas, apoyado por el grupo de Investigación de Ingeniería Agrícola y el laboratorio de Microbiología, pertenecientes a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

#### **3.3.2. Elaboración de queso Ricotta con adición de AE de tomillo**

Se elaboró el queso Ricotta a partir de leche bovina pasteurizada y descremada, la cual se acidificó utilizando ácido cítrico hasta alcanzar una acidez de 0.3% (Monsalve y González, 2005). Se calentó la leche en permanente agitación hasta alcanzar 80°C, momento en el cual se detuvo la agitación para permitir que los flóculos de cuajada asciendan a la superficie, el calentamiento continuó hasta 95°C con el objetivo de lograr la precipitación total de las proteínas presentes en la leche. Pasados 10 minutos luego de alcanzar la temperatura máxima, se procedió a realizar el desuerado para obtener la cuajada, a la cual se le adicionó 1.6% de AE de tomillo, concentración determinada en trabajos previamente realizados sobre el efecto antimicrobiano In Vitro del AE de tomillo sobre *L. monocytogenes*. Se utilizó como emulsificante Lecitina de Soya (relación 1: 0.5) con el objetivo de garantizar la dispersión. Como muestra control se elaboró en las mismas condiciones un queso Ricotta al cual se le adicionó benzoato como conservante de acuerdo a lo establecido en la normatividad (1200ppm). Finalmente se prensaron los quesos y fueron almacenados a 4°C.

### **3.3.3. Caracterización físico química del queso Ricotta con AE de tomillo**

Se determinó el porcentaje de Humedad utilizando una balanza humidimétrica (HA 300), en la cual se colocaron 2 gramos de queso en la tara de aluminio; el valor de humedad en base húmeda fue leído en forma digital después de media hora. El porcentaje de grasa se determinó con base en el método Gerber (AOAC 2000.18), fundamentado en el principio de mezclar ácido sulfúrico y alcohol isoamilico con el queso, para hidrolizar la proteína y descomponerla en sustancias más simples, las cuales no son capaces de mantener los glóbulos de grasa en estado de emulsión y permite que estos suban libremente a la superficie (Pinto *et al.*, 2000). El pH del queso se realizó usando un potenciómetro para sólidos (testo 206-pH2); además se calcularon los valores de Humedad Sin Materia Grasa (HSMG) y Materia Grasa en Extracto Seco (GES). Esta caracterización se realizó según metodología del IDF (Federación Internacional de Estandarización de productos lácteos), con el objetivo de clasificar el queso de acuerdo a lo contemplado en la Resolución 02310 de 1986 normatividad que regula los derivados lácteos en Colombia y la NTC 750.

### **3.3.4. Evaluación microbiológica del queso adicionado con Aceite Esencial**

La calidad microbiológica se determinó a través del recuento de Coliformes totales y fecales (AOAC 988.18), Mohos y Levaduras (AOAC 17.2.02), *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (AOAC 975.55), *Salmonella* spp (AOAC 967.27) y *L. monocytogenes* (AOAC 993.12), para el queso Ricotta adicionado con AE de tomillo; como control se realizaron las mismas pruebas a un queso sin la adición de AE. Los recuentos se expresaron en unidades formadoras de colonia por gramos (UFC/g), todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos de la caracterización microbiológica del queso se confrontaron con los requisitos establecidos en la NTC 750 y la Resolución 02310 de 1986.

### 3.3.5. Evaluación sensorial del Queso Ricotta con AE

Se realizó un perfil sensorial por aproximación multidimensional del queso con AE, contrastado respecto a un queso sin adición de AE como control, donde se identificaron y seleccionaron un conjunto de descriptores relevantes para dar la máxima información sobre los atributos sensoriales (olor, sabor y textura) del producto objeto de estudio. Se valoraron las intensidades con el panel de jueces entrenados del Laboratorio de análisis sensorial de la Universidad de Antioquia (Colombia), tomando una escala de calificación de 0 a 5 para todos los descriptores, excepto para la calidad general donde se utilizó una escala de 1 a 3 donde 3 es alto y 1 bajo. Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a las NTC 3501, 3930, 3932 y Guía Técnica Colombiana (GTC) 165.

### 3.3.6. Recuento *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta con AE

Para determinar el efecto Inhibitorio del AE de tomillo, se tomaron colonias de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) sembrada en medio selectivo PALCAM, con las cuales se realizó una suspensión en solución salina ajustada a una concentración de 0.5 en la escala de MacFarland. Con esta suspensión se inoculó el queso Ricotta elaborado con AE, además de la muestra control. La inoculación se realizó en una concentración del 1% sobre el peso total de cada muestra de queso, con el propósito de garantizar la relación de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL de suspensión. Se inocularon 18 muestras de 500 gramos de queso con AE y 18 muestras de 500 gramos de queso sin la adición de AE.

Para el análisis microbiano, cada día de prueba se tomaron asépticamente 25g del queso, los cuales se adicionaron en 225mL de caldo Fraser (con adición del suplemento de medio) y de este se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ . Las diferentes muestras se homogenizaban en el caldo durante 2 minutos, a continuación 0.1 mL de las diluciones seriadas, se sembraron en superficie en cajas de petri con Agar Cromogénico *Listeria*, las cuales fueron incubadas a 35°C durante

24 horas, pasado este tiempo se realizó el recuento en placa, el número de *Listeria* por gramo de queso fue reportado como Log UFC/g (Hegde *et al.*, 2007; Abdollahzadeh *et al.*, 2013). Cada muestra se realizó por triplicado para dar validez estadística.

### **3.3.7. Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos fueron analizados a partir de un análisis de varianza de un factor de efectos fijos con medidas repetidas en el tiempo, con un nivel de confianza del 95 % ( $\alpha = 0.05$ ) usando del paquete estadístico R versión 2.12.2.

## **3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.4.1. Caracterización del queso Ricotta con AE de tomillo**

El queso Ricotta elaborado con la adición de AE de tomillo presentó un porcentaje de rendimiento del 15%, resultados que se encuentran dentro de los valores encontrados por Monsalve y González (2005), quienes caracterizaron el queso Ricotta elaborado con diferentes mezclas de leche y lactosuero, reportando el mayor porcentaje de rendimiento al aumentar la cantidad de leche entera por su aporte de sólidos; se debe resaltar que el queso con AE, se elaboró a partir de leche descremada lo cual representa un óptimo valor en el rendimiento.

Con respecto a la caracterización fisicoquímica (Tabla 3-1), se observó que no existe diferencia entre los datos encontrados para Humedad, pH y HSMG entre el queso adicionado con AE y el control, sin embargo se resalta que los porcentajes de Materia Grasa (MG) y GES, varían de forma significativa; esto debido a la presencia del AE de tomillo.

De acuerdo a los parámetros establecidos en la NTC 750 se clasifica al queso Ricotta formulado con AE de tomillo, como un queso firme/semiduro descremado, caracterización que no corresponde a la clasificación realizada por Prudêncio y

colaboradores (2014), los cuales en sus trabajos con queso Ricotta, lo catalogan como un queso blando graso.

**Tabla 3-1.** Efecto de la inclusión del AE de tomillo sobre las propiedades fisicoquímicas del queso Ricotta.

<b>Análisis</b>	<b>Queso Ricotta con AE</b>	<b>Queso Ricotta sin AE</b>
Humedad (%p/v)*	61.15±0.40	60.52±0.30
pH*	5.60±0.10	5.50±0.10
MG (%)*	1.64±0.05	0.40±0.05
HSMG (%)*	62.70±2.10	60.76±2.00
GES (%)*	4.22±0.60	1.01±0.10

\*Valores promedios de 3 repeticiones. Humedad Sin Materia Grasa (HSMG), Materia Grasa en Extracto Seco (GES), Materia Grasa (MG).

Esta diferencia en la clasificación del queso, es debida a que se elaboró a partir de leche descremada, tomando como referencia lo registrado por Hernández (2011), en su trabajo con AE de clavo, canela, laurel y tomillo probados frente a *L. monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* en queso, encontrando que las especies formadoras de colonias se inhibieron más fácilmente en quesos bajos en grasa, que en el mismo queso con su porcentaje de grasa normal, parece ser que el nivel de grasa protege las células bacterianas en diferente medida, enmascarando el efecto inhibitorio de los AEs.

El queso Ricotta con AE, fue analizado a las 48 horas después de ser elaborado, con el objetivo de establecer la calidad microbiológica de partida. Los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica inicial se reportan en la Tabla 3-2, los cuales fueron comparados con los requisitos establecidos por la normatividad colombiana (Tabla 3-3).

**Tabla 3-2.** Análisis microbiológico del queso Ricotta formulado con AE de tomillo.

RECUENTO	RESULTADOS	
	Queso Ricotta con AE	Queso Ricotta sin AE
Coliformes Totales	Menor de 10 UFC/g	60 UFC/g
Coliformes Fecales	Menor de 10 UFC/g	Menor de 10 UFC/g
<i>L. monocytogenes</i>	Ausente/25g	Ausente/25g
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente/25g	Ausente/25g
<i>Staphylococcus coagulasa positiva</i>	Menor de 100 UFC/g	Menor de 100 UFC/g
Levaduras	Ausente	80 UFC/g
Mohos	Ausente	60UFC/g

Se observó que el queso con AE, a las 48 horas cumple con los requerimientos exigidos por la normatividad, además en la comparación contra el control se observa que el queso sin adición de AE de tomillo, presentó contaminación con Mohos y Levaduras las cuales no fueron identificadas, incluso la presencia de Coliformes Totales era menor para que el queso Ricotta con AE, otorgándole ventaja a las 48 horas de evaluación en estabilidad microbiológica.

**Tabla 3-3.** Requisitos microbiológicos para queso fresco.

Requisitos	n	m	M	c
Exámenes de rutina:				
Coliformes, UFC/g (30°C)	3	1 000	5 000	1
Coliformes, UFC/g (45 °C)	3	50	100	1
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	3	500	5 000	1
Exámenes especiales:				
Recuento de <i>Estafilococos coagulasa positiva</i> , UFC/g	3	100	1 000	1
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	3	0	-	1
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	3	0	-	1

Fuente: Norma Técnica Colombiana 750

Estos resultados van en concordancia con diversos estudios realizados por Martos (2012), quien al estudiar las propiedades antimicrobianas de gran variedad de AEs contra diferentes microorganismos patógenos, concluye que los extractos obtenidos a partir de plantas aromáticas como orégano, tomillo y romero poseen

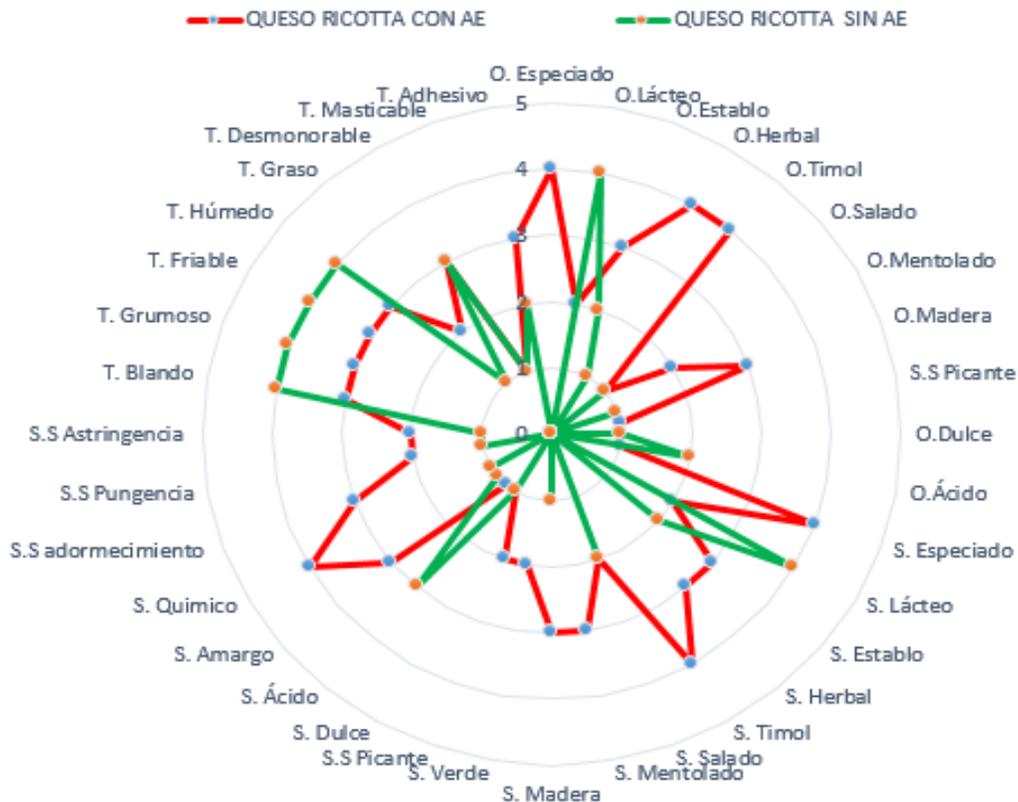
gran efectividad en la inhibición del crecimiento para diversas especies de hongos y bacterias.

### **3.4.2. Evaluación sensorial del queso Ricotta con AE**

Los resultados obtenidos del perfil sensorial por aproximación multidimensional, en aspectos como la textura y apariencia para el queso con AE, se encuentran entre los rangos establecidos para un queso Ricotta, en cuanto al olor y sabor se describieron sensaciones somato sensoriales de adormecimiento, picante y pungente, características que no son propias de un queso, además se resalta la pérdida de los matices lácteos que caracterizan este producto, sobresaliendo atributos sensoriales como herbal, especiado y químico, los resultados se registran en la Figura 3-1, en cuanto al color se observó un tono levemente verdoso. Se puede determinar que la concentración adicionada de AE de tomillo (1.6%), en la elaboración del queso Ricotta, afecta de manera significativa los aspectos sensoriales del queso, obedeciendo a las características de muchos extractos vegetales usados en alimentos, que brindan grandes desventajas, debido a que es necesaria una alta concentración para obtener un efecto de preservación, presentando serias alteraciones en el sabor y olor, limitando su uso solamente en la formulación de alimentos en los cuales dichos cambios sean considerados deseados (Sauceda, 2011).

En trabajos realizados por Govaris y colaboradores (2010), quienes analizaron el efecto de los AEs en las características del queso feta, concluyeron que las propiedades organolépticas del queso tratado con AE de tomillo y orégano en niveles de 0.2% son aceptados sensorialmente, resultado que demuestra que el porcentaje de inclusión en el presente trabajo conllevó a que el panel sensorial rechazara las muestras por sus características en cuanto a su sabor y olor.

Por otro lado los resultados se asemejan a los encontrados por Abdollahzadeh y colaboradores (2013), quienes encontraron que al incluir el AE de tomillo en niveles de 0.8 y 1.2%, para la conservación de carne de pescado, se afecta de manera significativa su sabor, siendo inaceptable por los consumidores durante su periodo de evaluación.



**Figura 3-1.** Perfil sensorial por aproximación multidimensional

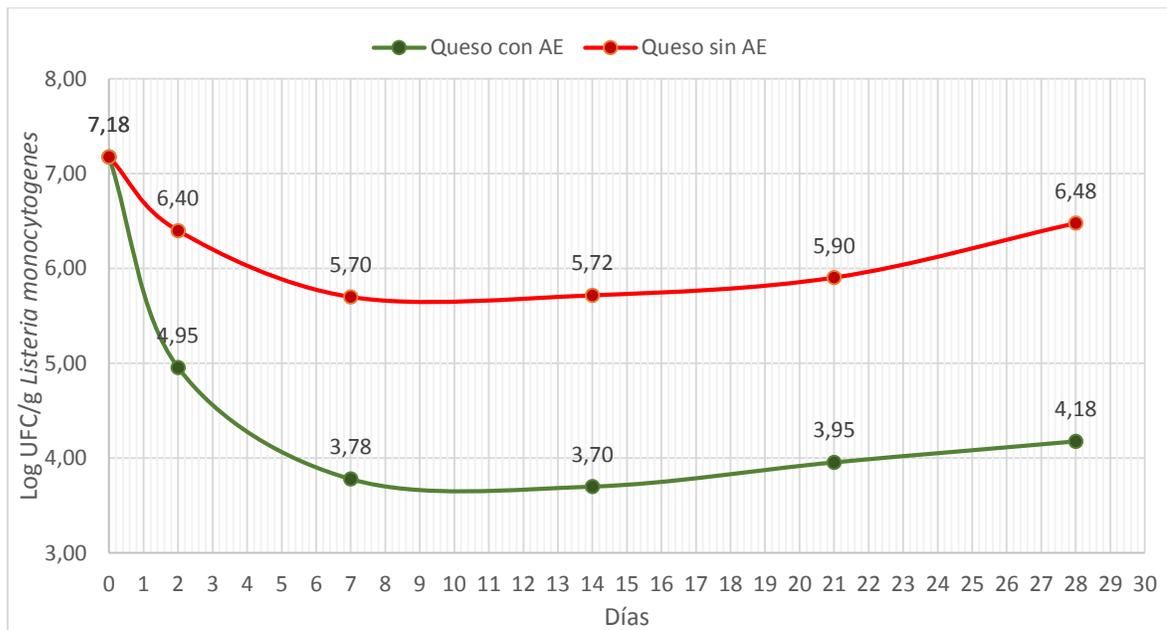
En pruebas realizadas por Asensio (2013), en el cual adicionó AE de orégano en la elaboración de queso Ricotta, encontró altos valores de intensidad en sabor a orégano, brillo y amargo, además de bajos valores para los atributos de caseína y matices lácteos, comparado con la muestra control que se comportó de manera opuesta, se concluyó que el queso con AE de orégano, estuvo altamente relacionado con variables negativas sensoriales y no tuvo un comportamiento favorable en la estabilidad del producto en tiempos prolongados de almacenamiento.

En las investigaciones llevadas a cabo por Araujo (2012), quien elaboró películas comestibles adicionadas con AEs para la conservación de quesillo, concluyó que el sabor se ve influenciado drásticamente al perder matices lácteos, no siendo igual con el aroma y el color, que presentaron buena calificación durante 4 semanas de almacenamiento, por otro lado en el trabajo realizado por Castaño (2013), con leches saborizadas adicionadas con AE de clavo y canela, se reporta que los

productos con mayores adiciones de AEs (1,5% a 2%), presentaron los mayores puntajes de rechazo entre el panel de consumidores, debido a que las concentraciones de inclusión mostraron astringencia y retrogusto; por esto es claro que la aplicación de extractos vegetales implican un gran impacto organoléptico, causado principalmente por la alteración del sabor natural de los alimentos que puede sobrepasar los umbrales de sabor aceptable (Goñi *et al.*, 2009).

### **3.4.3. Efecto Inhibitorio del AE de tomillo sobre el Recuento de *L.monocytogenes* en queso Ricotta**

Los resultados de la prueba de estabilidad microbiológica en el tiempo (28 días), del queso Ricotta adicionado con AE de tomillo inoculado con *L. monocytogenes* (7.18 Log UFC/gramo equivalente a  $1.5 \times 10^6$  UFC/gramo), expresados en el recuento microbiológico se registran en la Figura 3-2. Se puede observar que el queso Ricotta con AE presenta inhibición en el recuento de *Listeria*, pasando de 7.18 Log UFC/gramo a 4.95 Log UFC/gramo en 48 horas de evaluación, comportamiento que continuó durante 14 días de prueba, mostrando actividad biocida hasta alcanzar valores 3.70 Log UFC/gramo representando una disminución del 48.46%. Pasados 14 días de evaluación se presentó nuevamente crecimiento del microorganismo patógeno alcanzando valores de 4.18 Log UFC/gramo a los 28 días de la prueba de estabilidad microbiológica. En la muestra control a la cual se adicionó conservantes tradicionales (benzoato de sodio), se presentó inhibición a las 48 horas, presentando recuentos de 6.40 Log UFC/gramo comportamiento que continuó durante los primeros 7 días de evaluación donde se reportó un recuento de 5.70 Log UFC/gramo representando inhibición del 20.61%, sin embargo este comportamiento biocida no fue evidenciado en la lectura realizada en el día 14 donde se aumentó la presencia del microorganismo, el cual para el día 28 de la prueba alcanzó valores de 6.48 Log UFC/gramo.



**Figura 3-2.** Efecto antimicrobiano del AE de tomillo adicionado en queso Ricotta.

Es evidente que la adición de AE de tomillo, en la elaboración de un queso Ricotta, presentó actividad antimicrobiana frente a un número representativo de UFC/g, durante el tiempo de evaluación, reduciendo en 3.48 Log UFC/g durante 14 días de vida útil del queso. De acuerdo al análisis estadístico, ANOVA demostró que existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los recuentos microbiológicos evaluados en las diferentes mediciones en el tiempo, del queso con AE y el queso Ricotta sin la adición del AE de tomillo.

Se conoce que los quesos, gracias a sus componentes nutricionales, se convierten en un perfecto medio de cultivo para el crecimiento de *Listeria*, aun estando en condiciones de refrigeración. Reportes han demostrado que la presencia de *Listeria spp.*, se encuentran en valores cercanos al 16.7% de quesos analizados, además hallazgos de diferentes microorganismos como levaduras y otras bacterias en el 100% de muestras (Baquero *et al.*, 2006).

Los AEs usados como antimicrobianos son compuestos que pueden retardar el crecimiento microbiano o inactivarlo dependiendo de su concentración de adición, condición que ha marcado la gran diferencia en la alteración de matices sensoriales en los diferentes alimentos (Gonzalez *et al.*, 2011). Los resultados se comparan con el trabajo realizado por Abdollahzadeh y colaboradores, (2013), sobre el efecto del AE de tomillo en la conservación de carne de pescado, la cual fue inoculada con 4.6 Log UFC/gramo de *L. monocytogenes*, se demostró que existe actividad biocida del AE al ser adicionado en concentraciones de 0.8 y 1.2%, donde se redujo en 2.6 Log UFC/gramo durante los 12 días del ensayo llegando a recuentos finales de 2 Log UFC/gramo, resultado que le otorga ventajas comparado con los tratamientos realizados con nicina, donde a los primeros 4 días del ensayo se redujo tan solo en 0.6 Log UFC/gramo, pero se vio aumentado el recuento de *Listeria* durante los siguientes días del trabajo, donde solo se vio una reducción de 0.39 Log UFC/gramo con este aditivo. Paparella y colaboradores (2008), en su trabajo demostraron el efecto del AE de tomillo en la viabilidad de las células de *Listeria*, encontrando gran efectividad al ser utilizado a una concentración de 0,10%, logrando una disminución de 5 Log UFC/mL en 48 horas de evaluación. Por otro lado Govaris y colaboradores (2010), inocularon *L.monocytogenes* en queso tipo feta, el cual fue adicionado con AE de tomillo, además de empacado en atmosfera modificada y almacenado a 4°C, se encontró que en dosis de 0.2mL del AE por cada 100g del queso, se lograba a los 14 días de almacenamiento inhibición significativa del microorganismo, pasando de 4 Log UFC/gramo a recuentos menores de 1 Log UFC/gramo, dicho efecto fue asociado a la presencia predominante de componentes como el carvacrol, timol, p-cimeno y terpineno, componentes que representaban el 81.5% de los constituyentes del AE de tomillo. Se resalta que Sandasi y colaboradores (2008), probaron 5 diferentes componentes del AE de tomillo con supuesta actividad biocida sobre biofilm de *Listeria*, encontraron en sus ensayos que ninguno de los componentes seleccionados presentaba actividad contra el microorganismo, por el contrario y sorprendentemente, todos los componentes mejoraban el crecimiento del biofilm, por lo tanto esta incapacidad para inhibir el crecimiento de biofilm por parte de los

componentes del AE confirma dos teorías, una de ellas referida a que los biofilm son más resistentes a agentes antimicrobianos que las bacterias planctónicas y por otra parte la falta de inhibición puede ser atribuida al hecho de que los componentes del AE fueron utilizados individualmente, para lo que se ha demostrado que el efecto antimicrobiano de aceites esenciales se debe a la interacción entre todos los componentes y no debido a un componente individual (Mazzarrino *et al.*, 2014). Se resalta que muchos investigadores concuerdan en que la actividad antimicrobiana de los AEs, se debe a que atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteína y el sistema génico, todos ellos son esenciales para el desarrollo celular, por lo que si uno es atacado o inactivado la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada (Ultee y Smid, 2001).

### **3.5. CONCLUSIONES**

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma y apariencia, por ende se puede determinar que el AE de tomillo adicionado al queso Ricotta afecta de manera significativa una de las principales características de aceptación de un producto, al cambiar algunos matices sensoriales del queso, no siendo igual para la composición físico química. Por otro lado se evidencia en los resultados del presente trabajo y apoyado en diferentes referencias bibliográficas, una gran oportunidad para el uso de los AEs como aditivos conservantes, al otorgar efecto biocida contra microorganismos patógenos. Además se abre un gran camino al atender el actual inconformismo con el uso de agentes antimicrobianos sintéticos, que se han asociados a problemas de salud, lo que ha generado la necesidad de alternativas de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y sean compatibles con el alimento; sin embargo hay mucho por investigar, para así poder obtener productos más sanos, nutritivos y con mejor características sensoriales al adicionar sustancias naturales como lo son los aceites esenciales.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la empresa Aromassence por su constante participación en el proyecto con la transferencia de conocimiento y su aporte con el material vegetal en todo el proceso; a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por la financiación a través del programa de fortalecimiento de proyectos de investigación de posgrados; a COLCIENCIAS por la beca del programa de jóvenes investigadores; al grupo de investigación de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo y especialmente al laboratorio de Frutas y Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por su disponibilidad en la investigación.

## Bibliografía

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2013). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177–183.
- AOAC. 993.12 Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (OMA). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. 18th Edit. 1995
- AOAC. 2000.18 Official Methods of AOAC INTERNATIONAL. Fat Content of Raw and Pasteurized Whole Milk. Gerber Method by Weight (Method). 1. Edit. 2000.
- Asensio, C. M. (2013). *Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Asensio, C. M., Nepote, V., & Grosso, N. R. (2012). Sensory attribute preservation in extra virgin olive oil with addition of oregano essential oil as natural antioxidant. *Journal of Food Science*, 77(9), S294–S301.
- Baquero Acuña, D. M., González Bernal, M. A., & Campuzano, S. (2006). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de C á queza , Cundinamarca, 4(6), 80–83.
- Castaño, M. V. (2013). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*syzygium aromaticum*) y canela (*cinnamomum verum*), sobre la levadura (*rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Colombia, Ministerio de Salud. Resolución 02310 de 1986, 24 de Febrero, por el cual se reglamenta el Título V Alimentos de la Ley 09 de 1979 en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos (1986).
- Enriquez Araujo, A. C. (2012). *Estudio de la actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial y Extractos Vegetales evaluados en Quesillo*. Instituto Politecnico Nacional.
- Gallegos, J., Trespacios, A., & Carrascal, A. (2007). Frecuencia de *Listeria spp.*, en Quesos Colombianos costeros, 12(2), 996–1012.

- Gonzalez, C. A., Sánchez, E. P., Padalino, M., & Frontela, M. del C. (2011). Efecto de distintos antimicrobianos sobre el crecimiento de listeria monocytogenes.
- González, E. R., Salas, L. C., & Phillips, G. C. (2009). Listeria monocytogenes en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. *Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad Del Zulia. Maracaibo, Venezuela.*, 71–79.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982–989.
- Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., & Chatzopoulou, P. S. (2010). Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1240–1244.
- Hernández Sánchez, M. del P. (2011). *Encapsulación de Aceites Esenciales de Clavo para su Aplicación en la Industria Alimentaria*. Universidad Católica San Antonio.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. (1996). Norma NTC 3932. Análisis sensorial. Identificación y Selección de Descriptores para establecer un Perfil Sensorial por una Aproximación Multidimensional. Santa Fe de Bogotá. Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. (2004). Norma NTC 3501. Análisis Sensorial. Vocabulario. Santa Fe de Bogotá. Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. (2007). Guía Técnica Colombiana (GTC) 165. Análisis Sensorial. Metodología. Guía general. Santa Fe de Bogotá. Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas ICONTEC. (2009). Norma NTC 3930. análisis sensorial. metodología. ordenamiento de acuerdo a un criterio específico. Santa Fe de Bogotá. Colombia.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (Colombia), Establece los requisitos y los métodos de ensayo que deben los quesos. NTC 750, Tercera Actualización, Bogotá, Colombia (2000).
- International Symposium on Problems of Listeriosis. (ISOPOL XVIII). Trabajos. Goa, India. Septiembre 19-22, 2013.

INVIMA, Instituto de Vigilancia y Control de Alimentos y Medicamentos, Colombia. Manual de análisis microbiológicos, trazable a las normas de la AOAC Official Methods: 988.18, 966.24, 967.27, 17.2.02 Ed. 17; 972.45 y 975.55 Ed. 45. 1998.

Kely Martino Zagovalov, T., Leyva Castillo, V., Pérez Chang, A., de los Reyes, M., Suárez Herrera, F., & Lara Ortiz, C. (2005). Determinación de *Listeria* spp: en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Revista Cubana de Salud Pública*, 31(3), 0-0.

Kristensen, D., Hansen, E., Arndal, A., Trinderup, R. A., & Skibsted, L. H. (2001). Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *International Dairy Journal*, 11(10), 837–843.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.

Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Serio, A. (2014). Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794–803.

Mercado, P., & Llenque, L. (2012). Efecto del cloruro de sodio, sales biliares y pH en la actividad antibacteriana de Bifidobacterium animalis sobre *Listeria monocytogenes*. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 8(22), 23–33.

International Dairy Federation. Milk and Products. Preparation of simple and dilutions for microbiological examination. IDF Standard. 112. Brussels, Belgium. 1992.

Monsalve, J., & González, D. (2005). Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. *Revista Científica*, 15(6), 543–550.

Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Chaves-López, C., Serio, A., Marsilio, F., & Suzzi, G. (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19(12), 1174–1182.

Pinto, M., Carrasco, E., & Fraser, B. (2000). Validación del método butirométrico de gerber por comparación con el método de referencia de röse gottlieb para la determinación de materia grasa en leche. *Agro Sur*, 28(1), 123–131.

Prudêncio, E. S., Müller, C. M. O., Fritzen-Freire, C. B., Amboni, R. D. M. C., & Petrus, J. C. C. (2014). Effect of whey nanofiltration process combined with diafiltration on the rheological and physicochemical properties of ricotta cheese. *Food Research International*, 56, 92–99.

- Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms, *19*, 1070–1075.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, *7*(1), 153–170.
- Ultee, A., & Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, *64*(3), 373–378.
- Viuda Martos, M. (2012). *Caracterización y aplicación de aceites esenciales de especias y aguas de lavado obtenidas como coproducto del proceso de obtención de fibra de cítricos como inhibidores naturales en productos cárnicos*. Universidad Miguel Hernández Escuela Politécnica Superior de Orihuela.

## RECOMENDACIONES GENERALES

- Se deben realizar las comparaciones en el efecto que causan los diferentes métodos de extracción de aceites esenciales en su composición química. Aunque es conocido que el arrastre con vapor es una de las tecnologías más sencillas y económicas también se resaltan sus posibles efectos adversos causados por las altas temperaturas empleadas.
- Se resalta que las técnicas utilizadas para probar sustancias con efectos antimicrobianos, deben estar enfocadas de acuerdo a su naturaleza, por ende extractos no polares o sustancias que no difundan bien en el agar es recomendable el uso de las técnicas de dilución más que las de difusión.
- Los resultados sugieren la realización de mayores estudios *In Vitro*, considerando exponer mayor variedad de microorganismos patógenos contra el efecto biocida del AE de tomillo, así poder determinar las correlaciones entre halos de inhibición y concentraciones inhibitorias.
- Se hace necesario estandarizar metodologías propicias que demuestren valores acertados con márgenes de error bajos, tanto para las pruebas de efectos antimicrobianos *In vitro*, como las pruebas realizadas directamente en los alimentos con viabilidad científica.