

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a castle, and a lion. Above the shield is a crown. The shield is flanked by two pillars topped with crowns. The Latin motto "CETERIS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE  
ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS NATIVAS  
UTILIZADAS COMO CONDIMENTOS ALIMENTICIOS**

**GERÁLDI NATALÍ HERRERA NÁJERA**

**QUÍMICA BIÓLOGA**

**GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2020**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE  
ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS NATIVAS  
UTILIZADAS COMO CONDIMENTOS ALIMENTICIOS**

**INFORME DE TESIS**

**PRESENTADO POR**

**GERÁLDI NATALÍ HERRERA NÁJERA**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**QUÍMICA BIÓLOGA**

**GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 2020**

## **JUNTA DIRECTIVA**

M.A Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino.	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovanni Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merari Caceros Castañeda	Vocal V
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria

## **ACTO QUE DEDICO**

**A DIOS** mi Padre, quien, aunque pasó el tiempo, su promesa siempre cumplió.

**A MIS PADRES**, porque éste logro es de ellos.

**A MIS HERMANOS**, mis aliados de siempre.

**A MI ESPOSO**, mi mejor amigo y compañero.

**A MI HIJO**, la luz de mis ojos.

**A MI ABUELITA**, quien siempre ha creído en mí.

**A MI FAMILIA**, por su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS**, mi Padre, porque no importó cuantas veces creí que no iba a poder seguir, siempre me dio la fuerza y la sabiduría para continuar avanzando. Sin Él mi vida no tendría ningún sentido. Y a la Virgencita, por interceder siempre por mi ante mi Padre.

**A MIS PADRES**, Gerardo y Maritza, porque me han apoyado en cada paso que he dado. De mi papá he aprendido a hacer las cosas siempre con amor y paciencia, y de mi mamá he aprendido el maravilloso don de la responsabilidad. Siempre han estado para mí y son los mejores Padres que nadie puede tener. Gracias por ésta maravillosa herencia que me dan. Tengan por seguro que siempre seguiré el ejemplo tan maravilloso que me han dado.

**A MIS HERMANOS**, Jeanie y Steven, mis amigos, por enseñarme la disciplina y la dedicación con cada acto que realizan en sus vidas.

**A MI ESPOSO**, Luis Adán, el amor de mi vida y el mejor compañero que la vida me pudo dar, a quien precisamente encontré en esta maravillosa facultad y a quien no le importó el desvelo, el cansancio, la espera o la distancia para acompañarme y ayudarme a llegar a este gran logro.

**A MI ABUELITA**, Mamamina, por orar por mis todos los días de su vida y por creer tan fielmente en mí.

**A MI AMIGA**, Silvia María, porque nunca importó la hora, siempre respondió todas mis preguntas cuando la necesité. Gracias por ser una gran amiga.

**A MIS ASESORAS**, la Licenciada Isabel Gaitán y la Licenciada Margarita Paz, por todo el apoyo y asesoría que me dieron en este proceso, por atender todas mis citas y mis múltiples correos a cualquier hora. Gracias por todo el conocimiento que me compartieron, por realizar conmigo esta maravillosa tesis.

## ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	3
III. ANTECEDENTES .....	5
A. GENERALIDADES .....	5
B. CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS .....	5
1. Descripción.....	5
2. Factores de patogenia y virulencia .....	6
3. Ecología y Distribución geográfica.....	7
C. LISTERIOSIS .....	7
1. Descripción de la enfermedad .....	7
2. Etiología .....	8
3. Patogenia y aspectos clínicos .....	8
4. Diagnóstico.....	10
5. Situación epidemiológica .....	11
D. USO DE PRODUCTOS NATURALES EN LA PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS .....	12
E. MONOGRAFÍA DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO.....	13
1. <i>Litsea guatemalensis</i> Mez .....	13
2. <i>Lippia graveolens</i> Kunth.....	14
3. <i>Bixa orellana</i> Linn .....	15
4. <i>Ocimum basilicum</i> L. ....	17
F. PRODUCTOS NATURALES.....	18
1. Aceites esenciales.....	18
2. Extractos vegetales.....	19
G. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES CONTRA <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
IV. JUSTIFICACIÓN.....	23
V. OBJETIVOS .....	24

A. Objetivo General .....	24
B. Objetivos Específicos .....	24
VI. HIPÓTESIS .....	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
A. UNIVERSO .....	26
B. MUESTRA .....	26
C. RECURSOS .....	26
1. Humanos .....	26
2. Institucionales .....	27
3. Físicos .....	27
a. Materiales .....	27
b. Equipo .....	28
c. Biológico .....	28
d. Reactivos .....	29
D. MÉTODOS .....	29
1. Ensayo de aceites esenciales .....	29
2. Ensayo de los extractos vegetales etanólicos al 70% .....	31
3. Evaluación de la Concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos vegetales etanólicos al 70% que presentaron actividad antimicrobiana positiva .....	32
E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35
F. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....	35
VIII. RESULTADOS .....	36
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	39
X. CONCLUSIONES .....	44
XI. RECOMENDACIONES .....	45
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
XIII. ANEXOS .....	52

## I. RESUMEN

*Listeria monocytogenes* es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, intracelular, que puede causar infecciones invasivas muy graves en el hombre y los animales y sobrevivir sin dificultad en medios inanimados, adaptándose rápida y eficazmente a cambios extremos en las condiciones ambientales. En pacientes inmunocompetentes origina infecciones gastrointestinales y uterinas y en pacientes inmunocomprometidos puede producir meningitis, sepsis, endocarditis, artritis, osteomielitis, abscesos, peritonitis, neumonía, entre otros y puede causar abortos espontáneos en mujeres embarazadas (Romero, 2007).

Este microorganismo representa un problema grave para las empresas de alimentos debido a la dificultad que presenta su control en las plantas de procesamiento; debido a esto es un microorganismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) llevados a cabo en las industrias alimentarias, así como en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (López et al., 2006).

Por lo anterior, se ha investigado sobre el uso de productos vegetales que controlen el crecimiento de la bacteria en los alimentos y eviten el riesgo de infección, sin ser dañino al consumidor (Morales, 2015).

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de cuatro especies de plantas nativas de Guatemala utilizadas como condimentos alimenticios, *Bixa Orellana* (achiote), *Lippia graveolens* (orégano), *Litsea guatemalensis* (laurel) y *Ocimum basilicum* (albahaca). El ensayo se realizó por quintuplicado y se encontró que todos los extractos presentaron actividad contra *Listeria monocytogenes*, siendo el extracto de *Litsea guatemalensis* el que presentó la mejor actividad antimicrobiana (0.125 mg/mL), seguido por *Ocimum basilicum* y *Lippia graveolens* (0.25 mg/mL).

Ninguno de los aceites presentó actividad antimicrobiana contra la cepa ATCC 19115 de *Listeria monocytogenes*. Esto no descarta en su totalidad la funcionalidad de los aceites esenciales de las plantas en estudio como una posible fuente alternativa de acción antimicrobiana ante otra cepa de la misma bacteria.

## I. INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es un patógeno poco frecuente en la población general, causante de infecciones graves en personas en edades extremas de la vida, en mujeres embarazadas y en inmunodeprimidos. La listeriosis en pacientes de alto riesgo, se diagnostica cuando la bacteria se aísla en sangre o en el líquido cefalorraquídeo. Las formas clínicas que se desarrollan dependen de la edad y del estado inmunitario del enfermo. En pacientes inmunocompetentes origina infecciones gastrointestinales y uterinas y en pacientes inmunocomprometidos puede producir meningitis, sepsis, endocarditis, artritis, osteomielitis, abscesos, peritonitis, neumonía, entre otros y puede causar abortos espontáneos en mujeres embarazadas (Romero, 2007).

La enfermedad tiene una fase bacterémica en la cual se puede diseminar vía transplacentaria y producir una infección muerte fetal *in utero* o sepsis neonatal precoz. La preocupación por el control de este patógeno ha aumentado debido a las altas tasas de mortalidad y morbilidad en la población materno-infantil (Noriega et al., 2008).

Según la División de Enfermedades Alimentarias Bacterianas y Micóticas (DFBMD) y los Centros para control y prevención de enfermedades (CDC, 2008), en Estados Unidos se reportan 2,500 casos anuales de listeriosis ocasionados por alimentos y muere una de cada cinco personas afectadas. En un estudio realizado por Quemé (como se citó en Gisbert, 2014) en Guatemala en el año 1986, se reportaron en el Hospital General San Juan de Dios 50 mujeres con abortos espontáneos, determinándose en cuatro de ellas la presencia de *Listeria monocytogenes*.

La mayoría de los casos de listeriosis en humanos son atribuidos a ingesta de alimentos contaminados y sólo ocasionalmente es transmitida como una zoonosis. Esta enfermedad es un peligro para el consumidor, si no son aplicadas las medidas correctas de prevención, lo cual es un desafío para las fuentes proveedoras de alimentos, ya sea a baja escala como a nivel industrial. Los alimentos más susceptibles en orden de frecuencia son productos

lácteos, cárnicos, pescado y vegetales, por lo que, para su control, se deben aplicar medidas para minimizar los riesgos y comercializar alimentos libres de *Listeria* (Noriega et al., 2008).

Además de la aplicación de medidas sanitarias y controlar las condiciones de pH y temperatura que eviten el desarrollo de la bacteria, es recomendable la adición de sustancias listericidas, siempre y cuando estos demuestren inocuidad para el consumo. Por tanto, se ha investigado sobre el uso de productos vegetales que controlen el crecimiento de la bacteria en los alimentos y eviten el riesgo de infección, sin ser dañino al consumidor (Morales, 2015).

Tomando en cuenta que en Guatemala no existen estudios en donde se ha evaluado la actividad listericida, aun siendo muchos los estudios en extractos vegetales que podrían ser útiles para este propósito, y que la listeriosis afecta en gran manera a la población guatemalteca, es de gran importancia la investigación de plantas medicinales que posean actividad contra *Listeria monocytogenes* especialmente si se trata de plantas que son usadas comúnmente en la preparación de alimentos, para plantear alternativas de tratamiento.

Por lo anterior, el objetivo de éste estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de cuatro diferentes plantas nativas de Guatemala que son utilizadas como condimentos alimenticios (*Bixa Orellana*, *Lippiagraveolens*, *Litsea guatemalensis* y *Ocimum basilicum*) contra *Listeria monocytogenes*.

## II. ANTECEDENTES

### A. GENERALIDADES

Las enfermedades causadas por microorganismos patógenos representan en la actualidad un problema de salud grave para la sociedad, por lo que el interés por controlar a los mismos con métodos que no causen toxicidad a los humanos se hace cada vez más necesario. Dentro de estos microorganismos se encuentra *Listeria monocytogenes*, el cual es un patógeno causante de infecciones graves en personas inmunocompetentes, en edades extremas de la vida, en mujeres embarazadas y en inmunodeprimidos (López, Suárez, Chico-Calero, Navas y Martínez, 2006).

*Listeria monocytogenes* representa un problema grave para las empresas de alimentos debido a la dificultad que presenta su control en las plantas de procesamiento; debido a esto es un microorganismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) llevados a cabo en las industrias alimentarias, así como en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (López et al., 2006).

### B. CARACTERÍSTICAS BACTERIANAS

#### 1. Descripción

*L. monocytogenes* es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa, intracelular, que puede causar infecciones invasivas muy graves en el hombre y los animales y sobrevivir sin dificultad en medios inanimados, adaptándose rápida y eficazmente a cambios extremos en las condiciones ambientales. La mayoría de las infecciones por esta bacteria se debe a los serotipos 1a, 1b y 4b, siendo este último el aislado en numerosos brotes (Sánchez y Palencia, 2010). Es un microorganismo saprofito y presente en el ambiente, que se encuentra en bajo número en muchos alimentos, incluidos algunos que no necesitan ser cocinados antes de su consumo (López et al., 2006).

## 2. Factores de patogenia y virulencia

*L. monocytogenes* es un parásito intracelular facultativo que ingresa en el hospedador a través del intestino. El ciclo de vida comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la seguida penetración de la bacteria en la célula hospedadora por fagocitosis. El mecanismo que permite la unión covalente de las proteínas de superficie de la pared celular de la bacteria a la célula eucariota requiere proteínas con una secuencia conservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, donde X es cualquier aminoácido) (López et al., 2006).

Entre los factores de virulencia se encuentran las proteínas de superficie internalinas (InA, InB) que favorecen la invasión celular por un mecanismo en el que la bacteria se hunde progresivamente en la superficie celular; la listeriolisina O y fosfolipasas que permiten lisis y escapar de las vacuolas fagocitarias una vez internalizada en la célula; la proteína polimerizadora de actina, ActA necesaria para la motilidad en el citoplasma celular e intercelular; y transportadores de hexosa fosfato que le permiten utilizar azúcares en el citosol celular durante su replicación intracitoplasmática (Sánchez y Palencia, 2010).

Además, la bacteria secreta al medio extracelular dos fosfolipasas C asociadas con la virulencia, las cuales dañan las membranas y causan la lisis de estas. Posteriormente la lecitinasa es activada y atraviesa la pared bacteriana gracias a la Mpl, una metaloproteasa específica codificada por el gen *mpl*. Posteriormente las bacterias alcanzan la periferia de la célula infectada, entrando en contacto con la membrana celular y formando evaginaciones citoplásmicas que contienen en su extremo una bacteria. Estas estructuras son fagocitadas y la misma queda encerrada en un fagosoma de doble membrana (Imagen 1), siendo este paso directo de célula a célula fundamental para la patogénesis de *L. monocytogenes*, ya que permite el paso directo de la misma a los tejidos sin tener contacto con el sistema inmune (López et al., 2006).

Los genes de virulencia de *L. monocytogenes* se organizan dentro de islas de patogenicidad, que son adquiridas por la bacteria por mecanismos de transferencia genética

horizontal. Los genes de los factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular de esta bacteria son *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*, que se encuentran ubicadas en la región del cromosoma conocida como isla 1 de patogenicidad de *Listeria*, LPI-1, o agrupamiento de genes de virulencia (virulence gene cluster) (Imagen 2). Posteriormente PrfA causa la expresión del regulón de virulencia dependiendo la temperatura y condiciones ambientales (López et al., 2006).

### **3. Ecología y Distribución geográfica**

*L. monocytogenes* es un microorganismo que se encuentra distribuido mundialmente y es resistente a temperaturas extremas, cambios de pH y altas concentraciones de cloruro de sodio. Entre los principales reservorios se encuentran el suelo, el forraje, el agua, los silos y el tracto gastrointestinal de diversos animales, incluyendo al hombre (Sánchez y Palencia, 2010).

*L. monocytogenes* es ubicua. Sobrevive aproximadamente 500 días en tierra húmeda. En heces o en aguas residuales a temperatura ambiental resiste más de un año y de 0-4 °C más de 6 años. Se ha encontrado a menudo en mataderos, en las plantas de elaboración y conservación de alimentos, establecimientos de catering, etc. Esta bacteria es capaz de sobrevivir y crecer en la tierra y en el agua. Estas bacterias han sido detectadas en varios medios acuáticos: agua superficial de canales y lagos, de zanjas y terrenos ganados al mar en Holanda, de efluentes de agua dulce que desaguan en una bahía de California, y en aguas residuales (Colburn et al., 1990).

## **C. LISTERIOSIS**

### **1. Descripción de la enfermedad**

La listeriosis es una infección invasora que se presenta cuando *L. monocytogenes* invade la sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) u otro sitio estéril del cuerpo humano (Noriega et al., 2008). Las formas clínicas que se desarrollan dependen de la edad y del estado inmunitario del enfermo. En pacientes inmunocompetentes origina infecciones gastrointestinales y

uterinas y en pacientes inmunocomprometidos puede producir meningitis, sepsis, endocarditis, artritis, osteomielitis, abscesos, peritonitis, neumonía, entre otros (Romero, 2007). Durante el embarazo la enfermedad presenta fiebre, mialgias, lumbalgia, malestar general y en menor proporción diarrea, vómitos y dolor abdominal (Noriega et al., 2008).

Esta enfermedad es un peligro para el consumidor, si no son aplicadas las medidas correctas de prevención, lo cual es un desafío para las fuentes proveedoras de alimentos, ya sea a baja escala como a nivel industrial. Los alimentos más susceptibles en orden de frecuencia son: productos lácteos, cárnicos, pescado y vegetales, por lo que, para su control, se deben aplicar medidas para minimizar los riesgos y comercializar alimentos libres de la bacteria (Noriega et al., 2008).

## **2. Etiología**

La transmisión de la enfermedad puede tener un origen vertical (vía trasplacentaria), Zoonótico (contacto con animales enfermos) y nosocomial, sin embargo en la actualidad se reconoce el 99% de los casos de listeriosis humana son de transmisión alimentaria (Fundación Vasca para la Salud Alimentaria, 2006).

La infección se adquiere mediante la ingesta de alimentos contaminados, relacionando la mayoría de los casos a la ingestión de carne de res, pescado y vegetales crudos y lácteos y sus derivados, y en alimentos que no requieren cocción previa. Los recién nacidos adquieren la infección por vía vertical, a través de la placenta o del canal del parto. Pueden existir brotes nosocomiales o epidemias alimenticias, aunque también hay casos relacionados con el contacto con animales infectados (Sánchez y Palencia, 2010).

## **3. Patogenia y aspectos clínicos**

Existen graves manifestaciones clínicas características de la listeriosis, como lo son la meningitis, encefalitis, abortos espontáneos, infecciones neonatales y septicemias hacen que esta enfermedad presente las tasas más altas de morbilidad de todas las infecciones

alimentarias. La listeriosis humana puede causar epidemias o ser únicamente en forma de casos esporádicos, siendo una infección de carácter oportunista que afecta sobre todo a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunodeprimidos, aumentando su severidad en los picos de la vida (Imagen 3). La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* es de  $10^2$  células viables en el caso de las personas inmunosuprimidas y  $10^4$  en la población sana (López et al., 2006).

La severidad de la enfermedad y su asociación con alimentos procesados hacen que el impacto social y económico de la listeriosis sea de los más elevados de las Enfermedades Transmitidas por alimentos. Esta enfermedad adopta diversas manifestaciones que pueden agruparse en dos categorías: infecciones severas, listeriosis sistémica y gastroenteritis febril o listeriosis no invasiva. La patogenia de la enfermedad se inicia con la llegada de *L. monocytogenes* al tracto gastrointestinal y su paso a través de este, lo que depende del número de microorganismos ingeridos, el estado inmune del hospedador y la virulencia del microorganismo (Fundación Vasca para la Salud Alimentaria, 2006).

El periodo de incubación es de dos a tres semanas y puede durar meses, dependiendo de la susceptibilidad del hospedador. *L. monocytogenes* invade los fagocitos y se moviliza a diversos órganos del cuerpo humano, en especial la sangre, aparato reproductor femenino y sistema nervioso central causando diversas infecciones, las cuales en un 24% llegan a ser meningitis y en 29% septicemias. Las secuelas producidas por esta enfermedad en niños y en afectados por afecciones del sistema nervioso central son severamente dañinas. Puede desarrollarse gastroenteritis en forma de diarrea, fiebre, dolor de cabeza y mialgias tras un periodo corto de incubación. Las consecuencias clínicas ocasionadas por *L. monocytogenes* presentan distintas formas clínicas dependiendo del estado del hospedador, ruta de transmisión, severidad y periodo de incubación (Tabla 5) (Fundación Vasca para la Salud Alimentaria, 2006).

#### 4. Diagnóstico

El diagnóstico se torna complicado ya que hasta el 10% de la población porta el microorganismo de forma asintomática. Existen distintos métodos de identificación de *L.monocytogenes* a partir de distintas muestras. La Tinción de Gram es la pieza principal para la identificación de esta bacetria en el laboratorio. *L. monocytogenes* es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, catalasa positiva, en forma de cocobacilos móviles (Murray et al., 2006).

Estos cocobacilos pueden ser rectos aunque algunos pueden ser curvos, con extremos redondeados. Se presentan aislados o agrupados en forma de V o L, en empalizada (Ver Imagen 4). Presentan movilidad en volteretas en cultivos entre 20 y 28°C, simulando un abeto invertido(Sánchez y Palencia, 2010).

Estudios previos han demostrado que la Tinción de Gram del líquido cefalorraquídeo presenta poca sensibilidad por lo que un resultado negativo no supone un tratamiento en pacientes con factores de riesgo. Pueden existir confusiones con otras bacterias gram positivas como *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Haemophilus* spp(Sánchez y Palencia, 2010).

Para el diagnóstico clínico en el laboratorio se utilizan medios nutritivos como tripticasa soya y agar sangre de carnero, ya que estos permiten el crecimiento de estos microorganismos con facilidad. La temperatura óptima de crecimiento es entre 30 y 37°C (Ver Figura 1), pero su crecimiento es posible en temperaturas entre 1 y 45°. Morfológicamente las colonias son ligeramente convexas, con bordes regulares, traslúcidos y una pequeña zona de  $\beta$  hemólisis que puede ser apreciada en el agar sangre e carnero(Sánchez y Palencia, 2010).

Para realizar el diagnóstico por medio de las heces, deben inocularse las mismas en un medio de enriquecimiento selectivo, en este caso el agar Oxford (Ver Figura 10).

Para realizar el diagnóstico en el líquido cefalorraquídeo (LCR) hay que tener en cuenta que durante esta enfermedad las características son variables. Las proteínas pueden encontrarse elevadas y puede existir hipoglucoorraquia. El diagnóstico definitivo se determina tras el aislamiento de *L. monocytogenes* en la sangre, en el LCR, en el líquido articular, la placenta u otros líquidos estériles. (Figura 3) Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de esta bacteria son medios selectivos como Oxford (Sánchez y Palencia, 2010).

El cultivo de LCR presenta limitaciones cuando se presenta con otros tipos de infecciones a nivel cerebral. Los métodos de diagnóstico molecular presentan un importante interés en estudios taxonómicos y epidemiológicos. La resonancia magnética con contraste es capaz de diagnosticar lesiones cerebrales y dar un diagnóstico diferencial (Sánchez y Palencia, 2010).

Se pueden realizar pruebas adicionales como las pruebas de oxidasa, ureasa e indol que resultan negativas, mientras Voges Proskauer, catalasa y Rojo de metilo son positivos. *Listeria monocytogenes* hidroliza la esculina y produce ácido de D-glucosa (Sánchez y Palencia, 2010).

## **5. Situación epidemiológica**

Según la División de Enfermedades Alimentarias Bacterianas y Micóticas (DFBMD) y los Centros para el control y la prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2008), en Estados Unidos se reportan 2,500 casos anuales de listeriosis ocasionados por alimentos y muere una de cada cinco personas afectadas. En Guatemala, en un estudio realizado en la Universidad de San Carlos de Guatemala en 1986, se reportaron en el Hospital San Juan de Dios 50 mujeres con abortos espontáneos, determinándose en cuatro de ellas la presencia de *L. monocytogenes*, y en el año 1997, otro estudio comprobó la presencia de este microorganismo en 5.49% de una muestra de quesos (Gisbert, 2014).

*L. monocytogenes* tiene una gran trascendencia en las enfermedades transmitidas por alimentos ya que puede generar altas tasas de mortalidad en la población, que trascienden hasta un 30% (Guiza y Rincón, 2007).

#### **D. USO DE PRODUCTOS NATURALES EN LA PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS**

El uso de preservantes en alimentos es una práctica común en la industria, pero por mucho tiempo se han utilizado preservantes químicos que en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, por lo que los consumidores evitan consumir estos alimentos. A raíz de esto ha surgido la necesidad de utilizar agentes antimicrobianos de origen natural, que se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias (Rodríguez, 2011).

La actividad antimicrobiana de estos compuestos naturales se les atribuye principalmente a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales. La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos o fungistáticos, sin ser bactericidas por lo que su efectividad es reducida, por lo cual parece conveniente utilizar una combinación para ampliar el espectro de cobertura en la preservación de alimentos. Se estima que del 1% al 10% de 500,000 especies de plantas existentes tienen uso como alimento. Muchas frutas contienen diferentes ácidos orgánicos, como el ácido benzoico o el ácido cítrico. Los ajos, cebollas y muchas especias contienen potentes agentes antimicrobianos, o precursores que se transforman en ellos al triturarlos (Rodríguez, 2011).

El objetivo principal del procesamiento de alimentos es brindar la confianza de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados que cubran las expectativas del consumidor. Por lo cual se busca presentar al mercado alimentos frescos que presenten el mínimo procesamiento industrial, que conserven sus cualidades naturales y que presente una vida útil prudencial (Alzamora, 1997).

Una gran cantidad de alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana, que pueden funcionar como prolongadores de la vida útil de los alimentos. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica la obtención y adición de los mismos a los alimentos con fines de participar como antimicrobianos, sin alterar sus características organolépticas, manteniendo los costos a nivel industrial. Los sistemas antimicrobianos naturales se van incluyendo cada vez más como aditivos en conservación natural, sobre todo los extractos de varios tipos de plantas y partes de plantas que se usan como agentes saborizantes en algunos alimentos (Rodríguez, 2011).

En países como Nigeria, los extractos de especies con propiedades conservantes naturales son mayormente utilizados que los conservantes químicos. Se utilizan principalmente para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras, y su acción depende en gran medida del pH. Existen varias hierbas y especies que contienen aceites esenciales que presentan acción antimicrobiana (Ver Tabla 6). Cerca de 80 productos de origen vegetal contienen altos niveles de antimicrobianos con uso potencial en alimentos, como lo son el clavo, el ajo, la cebolla, el romero, el perejil, el orégano, entre otros (Rodríguez, 2011).

## **E. MONOGRAFÍA DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO**

### **1. *Litsea guatemalensis* Mez.**

a. Familia

Lauraceae

b. Nombre común

Laurel mexicano

c. Distribución

Nativa de Mesoamérica que crece desde el centro de México y llega hasta Guatemala (Standley y Steyermark, 1952).

d. Descripción botánica

Árbol de follaje perenne de 4-5 m de altura y 35-50 cm de diámetro., con ramas delgadas y tallo leñoso de color pardo oscuro. 35 y 50 cm (Ver Anexo 8). Las hojas son de 9.8 cm de longitud, simples, discoloras, color verde brillante en el haz y verde grisáceas en el envés, lanceoladas, aromáticas, ápice agudo y base cuneiforme, margen entero (Ver Imagen 5), con peciolo de 1 cm de longitud lanceolado. La venación es pinnada reticulada (Standley y Steyermark, 1952).

e. Propiedades

Aromática, antiséptica, astringente, balsámica, carminativa, emenagoga, emoliente, estimulante, espasmolítica, febrífuga y pectoral(Standley y Steyermark, 1952).

f. Usos

Se utiliza en el tratamiento afecciones respiratorias, gastroenteritis, para tratar la carencia de leche materna e inflamación; también en lavados y baños para reducir el cansancio, reducir ataques epilépticos y inflamación y úlceras en las piernas (Cáceres, 2006).

## **2. *Lippiagraveolens* Kunth**

a. Familia

Verbenaceae

b. Nombre común

Orégano, orégano mexicano, orégano de monte, orégano cimarrón y orégano del país.

c. Distribución

Regiones áridas y semiáridas de México y Guatemala (Ocampo, Malda y Suárez, 2009).

d. Descripción

Arbusto aromático con altura que varía de 0.20 a 2 m. Posee tallos leñosos muy ramificados desde la base, con hojas oblongas o elípticas finamente crenadas muy tomentosas y pilosas. Sus flores están dispuestas en espigas subglobosas con corolas blancas zigomorfas y con cuatro estambres (Ver Imagen 6). Sus frutos son dehiscentes (Standley y Steyermark, 1952).

e. Propiedades

Posee propiedades antioxidantes, antisépticas, aromáticas, calmantes, cicatrizantes, desinflamantes, diaforética, diurética, emenagoga, espasmolítica, expectorante y estimulante (Standley y Steyermark, 1952).

f. Usos

Ampliamente utilizada para tratar anemia, afecciones gastrointestinales y respiratorias. Las infusiones se usan para tratar asma y bronquitis. El aceite de las hojas secas se usa para la disentería, el catarro y el resfrío. Tópicamente la decocción se aplica para la cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta. En baños se usa para fortalecer niños debilitados, combatir la gripe y aliviar el prurito y la sarna. En el cataplasma para madurar abscesos, calamar neuralgias, cáncer y tumores. En fricciones se usa como calmante. La planta fresca macerada en aceite se aplica para dolores reumáticos (Morataya, 2006).

### 3. *Bixaorellana* Linn

a. Familia

Bixaceae (Flores y Lindig-Cisneros, 2005)

b. Nombre común

Achiote, Achiotl, Acanguarica, Auaú, Achiotillo, Achote, Pamuca(Standley y Steyermark, 1952).

c. Distribución

Originaria de América tropical, se extiende desde México hasta Brasil y Argentina y en el Caribe (Standley y Steyermark, 1952).

d. Descripción

Arbusto o árbol pequeño de 2 a 5 m (hasta 10 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 20 a 30 cm. Copa redondeada y densa. Hojas simples, alternas, grandes y lustrosas, ovadas, de punta larga en el ápice, en pecíolos delgados y largos, acorazonadas en la base, puntos notables de color marrón en el envés, de 9 a 19 cm de largo por 6 a 11 cm de ancho. Tronco cilíndrico con ramas jóvenes de color café claro, delgadas y las puntas verduzcas. Flores grandes, vistosas, dispuestas en corimbos terminales, llevando los pedúnculos de 2 a 4 flores de color rosado, rojizo o blanco, de 4 a 5.5 cm de diámetro. El fruto es una cápsula ovoide a ovoide globosa, pardo-rojiza, de 3 a 5 cm de largo por 3 a 4.5 cm de diámetro con semillas rojas casi triangulares algo comprimidas y pequeñas con una testa pulposa de color rojo (Ver Imagen 7) y un albumen carnosos(Standley y Steyermark, 1952).

e. Propiedades

Astringente, antiséptico, afrodisiaco, emoliente, antibacterial, antioxidante, expectorante, cicatrizante, antipirético, antiespasmódico, purgante, desinflamatoria, hipoglicemiante y antidisentérico. La hoja posee propiedades diuréticas y antigonorreicas (Standley y Steyermark, 1952).

f. Usos

Se utiliza para tratar los eritemas, erisipela, vómito sanguinolento, hemorroides, dolor de cabeza y garganta. La utilización de la semilla y el fruto se consideran un antídoto eficaz contra envenenamiento por *Jatropha curcas* (que causa dolores abdominales, diarrea, vómito, irritación de garganta, gastroenteritis) y *Manihot esculenta* (manifestaciones disneicas y hasta la muerte del sujeto). La semilla se utiliza para tratar el sarampión, viruela, antiespasmódico, enfermedades del riñón y la disentería. El aceite de las semillas puede usarse con buen éxito contra la lepra. El té hecho con pequeños vástagos y hojas es usado como afrodisiaco y para el tratamiento de la diarrea, y para tratar infecciones de la piel, fiebres y hepatitis (Linnaeus, 2008).

**4. *Ocimumbasilicum*L.**

a. Familia

Lamiaceae

b. Nombre común

Basil, basilik, albahaca

c. Distribución

Amplia distribución geográfica, crece en regiones de clima tropical y subtropical(Standley y Steyermark, 1952).

d. Descripción botánica

Arbusto de color verde intenso, olor aromático y sabor picante, de tallos cuadrangulares y hojas pecioladas, opuestas, de forma aovada, enteras o con mayor frecuencia dentada y algo vellosa en los nervios, ápice agudo y la base redondeada. Las flores en largos ramilletes terminales son de color blanco o rosado (Ver Imagen 8) (Standley y Steyermark, 1952).

e. Propiedades

Se le atribuye propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antiespasmódicas y analgésicas. Se ha comprobado in vitro su actividad antimicótica el extracto acuoso es activo contra *S. aureus* y el aceite esencial es activo contra patógenos humanos como bacterias y hongos fitopatógenos, entre otros (Sánchez, et al., 2000).

f. Usos

Utilizada en medicina tradicional para curar afecciones gastrointestinales (diarreas, parasitismo), respiratorias (bronquitis, tos), dolor de oídos y reumatismo. Tópicamente usada para tratar afecciones de la piel (Hussain, et al., 2008).

## **F. PRODUCTOS NATURALES**

Muchas especias y hierbas presentan actividad antimicrobiana; entre las usadas en alimentos se encuentran el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, etcétera. Las especias son 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. El primer reporte del uso de las especias como conservadores se remonta a unos 1,550 años ac., cuando los antiguos egipcios las empleaban para conservar alimentos y embalsamar a los muertos (Davidson, 2001).

### **1. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son productos obtenidos de plantas, en los que se encuentran concentrados sabores y aromas característicos. Se encuentran constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles. Estos se

encuentran contenidos en vesículas secretoras dentro de los tejidos de las hojas, flores, y semillas de los frutos de muchas especies vegetales (Martínez, et al., 2003).

Las plantas pueden producir aceite esencial para muchos y diversos fines, entre estos se encuentran propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisíacas, entre otras. Desde la antigüedad se han utilizado sustancias naturales extraídas de las plantas, como los aceites esenciales, para combatir enfermedades y preservar alimentos. Hoy en día, estas sustancias han perdido su uso debido a la aparición de sustancias químicas, que si bien son efectivas, causan una alta toxicidad en el cuerpo humano (Martínez, et al., 2003).

Un estudio realizado en la ciudad de San José Costa Rica en donde se evaluó la acción antimicrobiana de los aceites esenciales de la canela, del clavo de olor, el orégano y la pimienta, se determinó que se obtuvo poder inhibitorio por parte de las tres primeras, mientras que por parte de la pimienta no se obtuvieron resultados. De igual manera se determinó que no hubo una diferencia significativa en cuanto a los resultados obtenidos por las tres especies que si presentaron acción inhibitoria, aunque las que presentaron mejores resultados fueron la canela y el clavo de olor, especialmente sobre *E. coli* O157H:7 y mayoritariamente sobre las especies del hongo *Aspergillus*, pudiendo notar que se necesitaron menores concentraciones del clavo de olor que de la canela, lo cual coincide con antiguos estudios realizados que han determinado la capacidad del clavo de olor de inhibir a todos los microorganismos con los que se le ha estudiado (Cubillo, 2007).

De igual manera se ha estudiado la actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina, reportándose que dicho aceite presentó actividad bactericida contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Castaño, et al., 2010).

## **2. Extractos vegetales**

Algunos estudios in vitro han demostrado que los extractos vegetales presentan actividad sobre múltiples microorganismos tanto gram negativos como gram positivos. Por

ejemplo, estudios han demostrado que el extracto de semilla de uva presenta un efecto antibacteriano sobre *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. coagulans* y *P. aeruginosa*, mostrando ser más eficaz sobre bacterias gram positivas que sobre gram negativas (Jayaprakasha et al., 2002).

En 2009 se realizó una investigación en la universidad Pontificia Javeriana de Bogotá, evaluando la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos proteicos disueltos en agua desionizada y en un Buffer Tris HCl a pH de 7, obtenidos a partir de hojas de *Pentacalia ledifolia* y *Pentacalia vaccinioides*, contra dos bacterias gram negativas, las cuales fueron *Salmonella Typhimurium* y *Pseudomonas fluorescens* y una gram positiva: *Listeria monocytogenes*, utilizando el método de difusión en agar, medio Trypticase Soya (Tobo, 2009).

En los cuatro extractos obtenidos a partir de las dos especies de *Pentacalia*, se cuantificó la proteína Total presente en cada proceso de extracción y concentración, por medio de la Técnica de Bradford modificado, y los resultados evidenciaron la presencia de proteína en los extractos y el aumento de la misma después de la precipitación con sulfato de amonio. Los resultados de inhibición reportaron que *L. monocytogenes* fue resistente frente a los extractos, por el contrario, tanto *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella typhimurium*, reportaron sensibilidad frente a los cuatro extractos, siendo los extractos de *Pentacalia vaccinioides* los que presentaron mayor actividad antimicrobiana (Tobo, 2009).

En otro estudio llevado a cabo en la ciudad de Medellín, se evaluó la actividad bactericida y se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre microorganismos de interés alimentario como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum*. Los resultados obtenidos fueron que el extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con CIM de 1024 ppm. La nisina, utilizada como control positivo, ocasionó una inhibición del crecimiento de todas las bacterias evaluadas con CIMs entre 2 y 1024 ppm, mientras

que los conservantes usados comúnmente en la industria de alimentos presentan una actividad antimicrobiana menor que la encontrada con el extracto de *R. officinalis* (Castaño, et al., 2010).

### **G. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES CONTRA *Listeria monocytogenes***

El reciente incremento de los brotes asociados a alimentos que se encuentran contaminados con microorganismos causantes de patologías, entre los cuales *L. monocytogenes* constituye el problema de mayor importancia a resolver, sumado a que las regulaciones alimentarias son cada vez más estrictas ha aumentado el interés por encontrar alternativas a los conservantes químicos. Por lo cual, estudios han demostrado la eficacia de diversas especies en cuanto a capacidad antimicrobiana, como lo son la canela, el clavo de olor, la pimienta, el ajo, entre otras (Martínez, et al., 2003).

Además de la aplicación de medidas sanitarias y controlar las condiciones de pH y temperatura que eviten el desarrollo de *L. monocytogenes*, es recomendable la adición de sustancias listericidas, siempre y cuando estos demuestren inocuidad para el consumo. Por tanto, se ha investigado sobre el uso de productos vegetales que controlan el crecimiento de *Listeria* en los alimentos y eviten el riesgo de infección, sin ser dañino al consumidor. Estudios con extractos de hojas de *Ginkgo biloba* han demostrado su efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes*. Xie, Hettiarachchy, Jane y Johnson (2003) determinaron que los extractos de las hojas de *Ginkgo biloba* inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* y observaron que ésta inhibición se acentuaba en condiciones de bajas temperaturas. Asimismo demostraron que la adición de EDTA aumenta la actividad anti- *Listeria* (p.269).

También se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra *Listeria* (Rodríguez, 2011), y el aceite esencial de tomillo presentó actividad anti- *Listeria* al ser usado en concentraciones no menores de 1.6% (Morales, 2015).

El orégano ha demostrado mejores resultados sobre *Listeria monocytogenes*, ya que estudios han demostrado que los compuestos fenólicos contenidos en estas especies han resultado más efectivos sobre bacterias gram positivas (Arcila, et al., 2004). Los aceites esenciales que contienen compuestos derivados del fenol expresan una actividad antimicrobiana mayor y un espectro de acción más amplio que los aceites que se encuentran formados por grupos alcohólicos, y esto concuerda con los resultados obtenidos por el clavo de olor, la canela y el orégano, que en su composición presentan grupos fenólicos (Cubillo, 2007).

Leonard y colaboradores (2010), realizaron un estudio en donde se probaron los aceites esenciales del clavo de olor, del limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y de la hierbabuena (*Mentha spicata*) contra *L. monocytogenes*, y los resultados obtenidos demostraron que únicamente la mezcla de los mismos posee un efecto inhibitorio sobre la misma, ya que por sí solos producían un efecto estimulante en el crecimiento de la membrana de esta bacteria.

Un estudio realizado por Hammer y colaboradores (1999), determinó que “el extracto etanólico de una línea clonal de orégano inhibió la acción de *Listeria monocytogenes* en productos en caldo y otros productos de carne”.

En Guatemala no se ha estudiado la actividad listericida, pero son muchos los estudios en extractos vegetales que podrían ser útiles para este propósito, especialmente si se trata de plantas que son usadas comúnmente en la preparación de alimentos.

### III. JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes de análisis microbiológicos en distintos alimentos y agua demuestran la presencia de *Listeria monocytogenes* en cantidades tales que afectan al consumidor. Según la División de Enfermedades Alimentarias Bacterianas y Micóticas (DFBMD por sus siglas en inglés) y los Centros para control y prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2008) en Estados Unidos, se reportan 2.500 casos anuales de listeriosis ocasionados por alimentos y muere una de cada cinco personas afectadas. En Guatemala, en un estudio realizado en la Universidad de San Carlos de Guatemala en 1986, se reportaron en el hospital San Juan de Dios 50 mujeres con abortos espontáneos, determinándose en cuatro de ellas la presencia de *Listeria monocytogenes* (Gisbert, 2014).

Esta enfermedad es un peligro para el consumidor, si no son aplicadas las medidas correctas de prevención, lo cual es un desafío para las fuentes proveedoras de alimentos, ya sea a baja escala como a nivel industrial.

Tomando en cuenta que en Guatemala no se ha estudiado la actividad listericida, pero son muchos los estudios en extractos vegetales que podrían ser útiles para este propósito, ya que la listeriosis afecta a la población guatemalteca y que la mayoría de medicamentos en el país son sintéticos, es de gran importancia la investigación de plantas medicinales que posean actividad contra *Listeria monocytogenes* especialmente si se trata de plantas que son usadas comúnmente en la preparación de alimentos, para plantear alternativas de tratamiento.

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes* en aceites esenciales y extractos vegetales de plantas nativas de Guatemala, utilizadas como condimentos alimenticios.

### B. Objetivos Específicos

1. Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Bixa Orellana*, *Lippiagraveolens*, *Litseaguatemalensis* y *Ocimumbasilicum* contra *Listeriamonocytogenes*.
2. Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales de *Bixa Orellana*, *Lippiagraveolens*, *Litseaguatemalensis* y *Ocimumbasilicum* contra *Listeriamonocytogenes*.

## V. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales y extractos vegetales de las especies de plantas nativas de Guatemala *Bixa Orellana*, *Lippiagraveolens*, *Litseaguatemalensis* y *Ocimumbasilicum* utilizadas como condimentos presentan actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. UNIVERSO

Especies de plantas nativas de Guatemala utilizadas como condimentos alimenticios.

### B. MUESTRA

- Semillas de *Bixa Orellana* (achiote)
- Hojas de *Lippiagraveolens* (orégano de monte)
- Hojas de *Litsea guatemalensis* (laurel)
- Hojas de *Ocimum basilicum* (albahaca)

### C. RECURSOS

#### 1. Humanos

- Tesista: Br. Gerál di Natalí Herrera Nájera
- Asesora: MA. Isabel Cristina Gaitán Fernández
- Asesora: MA. Ana Margarita Paz Morales de Ramírez

## **2. Institucionales**

- Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM)
- Laboratorio clínico Popular (LABOCLIP)

## **3. Físicos**

### **a. Materiales**

- Bolsas de plástico blancas
- Bolsas de plástico rojas
- Descarte para punzocortantes
- Cajas de Petri simples
- Cajas de Petri cuadriplate
- Guantes de látex
- Jeringas estériles de 5 mL
- Hisopos de 10 cm
- Regla de 30 cm

- Asa de nicromo en argolla
- Gradillas para tubos
- Mechero
- Discos para sensibilidad antibiótica en blanco
- Pinzas de metal
- Pipeta automática de 10-100  $\mu\text{L}$
- Plantilla para siembra
- Puntas amarillas de 200  $\mu\text{L}$
- Puntas azules de 1000  $\mu\text{L}$
- Tubos de ensayo contapón de rosca con capacidad de 11 mL.

**b. Equipo**

- Autoclave
- Campana bacteriológica con flujo laminar
- Refrigeradora
- Incubadora a 37°C

**c. Biológico**

- Cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC19115

- Extractos vegetales etanólicos al 70% y aceites esenciales de *Bixa Orellana* (achiote), *Lippiagraveolens* (orégano de monte), *Litsea guatemalensis* (laurel) y *Ocimum basilicum* (albahaca).

**d. Reactivos**

- Agar Mueller-Hinton
- Agar Nutritivo
- Agar Tripticasa Soya
- Caldo Tripticasa Soya
- Etanol al 50%
- Etanol al 70%
- Estándar de Mc Farland 0.5
- Solución salina al 0.85%

**D. MÉTODOS**

**1. Ensayo de aceites esenciales**

**a. Impregnación de los discos estériles con los aceites**

- Se impregnaron los discos para sensibilidad antibiótica en blanco con 50  $\mu\text{L}$  de cada aceite esencial por triplicado, impregnando 10  $\mu\text{L}$  cada día durante 5 días.

**b. Reconstitución de la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115**

- Con un asa en argolla previamente esterilizada, se reancló la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en Agar Nutritivo en tubo.
- Se incubó a 35 °C por 24 horas.
- Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 mL de caldo Trypticase soya.
- Se incubó a 36°C durante 24 h.
- Se diluyeron 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).
- Se comparó el inóculo con el estándar de McFarland 0.5.

**c. Demostración de la actividad antimicrobiana**

- Se humedeció un hisopo estéril en inóculo y exprimíó.
- Se realizó el inóculo de la solución de *Listeria monocytogenes* sobre el agar MuellerHinton estriando la caja en tres direcciones.
- Se colocaron los discos sobre el Agar Mueller Hinton previamente estriado.
- Se incubó a 35 ° C en condiciones aeróbicas por 24 horas.
- Se leyeron los halos de inhibición con una regla y se anotaron los resultados.

## **2. Ensayo de los extractos vegetales etanólicos al 70%**

### **a. Disolución del extracto**

- En la balanza analítica se pesaron 30 mg de cada extracto a ensayar y se disolvieron en 3 mL de etanol al 70%.
- Se agitó en un vortex hasta que estuvo bien disuelto.

### **b. Preparación del Agar Planta**

- Se prepararon tubos con 9mL de agar MuellerHinton (dos tubos por cada extracto etanólico al 70%).
- Se esterilizaron a 121°C durante 15 min.
- Se dejaron enfriar a 50°C.
- En una caja de petri simple se agregó 1mL de la solución del extracto etanólico al 70% filtrado (10 mg/mL) y los 9 mL de agar MuellerHinton.
- Se tapó la caja y se homogenizó con movimientos circulares. La concentración final que se obtuvo fue de 1 mg/mL.
- Se dejó solidificar e incubar a 36°C por 24 h, para comprobar esterilidad.
- Se guardó en refrigeración hasta el momento en que se utilizó.

### **c. Reconstitución de la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115**

- Con un asa en argolla previamente esterilizada, se reisoló la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en Agar Nutritivo en tubo.
- Se incubó a 35 °C por 24 horas.
- Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 mL de caldo Trypticase soya.

- Se incubó a 36°C durante 24 h.
- Se diluyeron 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).
- Se comparó el inóculo con el estándar de McFarland 0.5.

#### **d. Demostración de la actividad antimicrobiana**

- Se inoculó una asada de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en las cajas con agar-Planta, siguiendo el patrón de la plantilla.
- Se hicieron cinco repeticiones del inóculo.
- Se dejó reposar durante 5-10 min y se incubó a 36°C durante 24 h.
- Se utilizó como control negativo 9 mL de agar MullerHinton mezclándole 1 mL de etanol al 70%.

#### **e. Interpretación de resultados**

- Actividad negativa: Crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Actividad positiva: No hubo crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.
- Contaminación: Presencia de otros microorganismos fuera de la inoculación.

### **3. Evaluación de la Concentración mínimainhibitoria (CIM) de los extractos vegetalesetanólicos al 70% que presentaron actividad antimicrobiana positiva**

#### **a. Preparación de Agar-Planta**

- Se prepararon tubos con 3.6,3.8, 3.9, 4 ml de agar Mueller-Hinton.
- Se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos y se dejaron enfriar a 50°C.

- Se agregó la solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadrilátera de la siguiente manera:

3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto etanólico al 70% = 1.0 mg/mL

3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto etanólico al 70% = 0.5 mg/mL

3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto etanólico al 70% = 0.25 mg/mL

Un cuadrante con 4.0 mL de agar como control negativo.

- Se dejó solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Se guardó en refrigeración hasta el momento en que se utilizó.

#### **b. Reconstitución de la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115**

- Con un asa en argolla previamente esterilizada, se reisoló la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 en Agar Nutritivo en tubo (Ver Imagen 9).
- Se incubó a 35 °C por 24 horas.
- Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5 mL de caldo Tripticasa soya.
- Se incubó a 36°C durante 24 h.
- Se diluyeron 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril (dilución 1:100).
- Se comparó el inóculo con el estándar de McFarland 0.5.

#### **c. Demostración de la Concentración Mínima Inhibitoria**

- Se inocularon tres estrías en cada uno de los cuadrantes de la caja cuadrilátera.
- Se dejaron reposar durante 5-10 minutos.

- Se incubaron a 36°C durante 24 horas.

#### **d. Interpretación de resultados**

- La concentración mínima inhibitoria fue la última concentración del extracto en la que existió crecimiento en los inóculos de *Listeria monocytogenes*.
- Contaminación: presencia de otros microorganismos fuera de la inoculación.

## E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Para cada una de las pruebas inhibitorias, realizadas a los cuatro extractos etanólicos al 70% y aceites esenciales de *Litsea guatemalensis*, *Bixa Orellana*, *Lippia graveolens* y *Ocimum basilicum*, se realizaron cinco repeticiones, luego se llevó a cabo un análisis binomial según la siguiente tabla:

- Tabla de probabilidades asociadas con valores tan pequeños (o menores que) los valores observados de k en la prueba binomial

N	K										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	062	312	688	938	1.0						
5	031	188	500	812	969	1.0					
6	016	109	344	656	891	984	1.0				
7	008	062	227	500	773	938	992	1.0			
8	004	035	145	363	637	855	965	996	1.0		
9	002	020	090	254	500	746	910	980	998	1.0	
10	001	011	055	172	377	623	828	945	989	999	1.0

Nota: puntos decimales y valores menores a 0.0005 están omitidos.

Estableciendo así los niveles de confianza en cada extracto etanólico al 70% y aceite.

## F. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio experimental

## VII. RESULTADOS

Se analizaron los extractos vegetales etanólicos al 70% y aceites esenciales de cinco especies de plantas nativas de Guatemala, *Litsea guatemalensis* Mez.(Laurel), *Lippia graveolens* Kunth. (Orégano), *Ocimum basilicum* L.(Albahaca) y *Bixa Orellana* Linn.(Achiote), con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*.

Para éste último fin se utilizaron las hojas de la planta de albahaca, laurel y orégano, mientras que del achiote se utilizaron las semillas.

**Tabla 1.** Descripción de las plantas evaluadas en el estudio

Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada
<i>Bixaorellana</i> Linn	Achiote	Semilla
<i>Ocimumbasilicum</i> L	Albahaca	Hoja
<i>Litseaguatemalensis</i> Mez	Laurel	Hoja
<i>Lippiagraveolens</i> Kunth	Orégano	Hoja

Fuente: Datos experimentales

En el ensayo de aceites esenciales, no se obtuvo actividad antimicrobiana en ninguno de los aceites evaluados (Tabla 2) por el método de difusión en disco.

**Tabla 2.** Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales evaluados sobre *Listeria monocytogenes*

<b>Aceite vegetal</b>	<b>Actividad antimicrobiana</b>
<i>Bixaorellana</i> Linn	Negativa
<i>Ocimumbasilicum</i> L	Negativa
<i>Litsea guatemalensis</i> Mez	Negativa
<i>Lippiagraveolens</i> Kunth	Negativa

Fuente: Datos experimentales

En el ensayo de difusión en agar, que evaluó la actividad inhibitoria de los extractos vegetales etanólicos al 70% de las cuatro plantas del estudio, se encontró actividad a una concentración de 1mg/mL (Tabla 3).

**Tabla 3.** Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales etanólicos al 70% evaluados sobre *Listeria monocytogenes* a una concentración de 1 mg/mL

<b>Extracto vegetal etanólico al 70%</b>	<b>Resultado</b>
<i>Bixaorellana</i> Linn	+
<i>Ocimumbasilicum</i> L	+
<i>Litsea guatemalensis</i> Mez	+
<i>Lippiagraveolens</i> Kunth	+

Fuente: Datos experimentales

(+): positivo

A los extractos vegetales etanólicos al 70% se les determinó la concentración inhibitoria mínima, siendo esta de 1 mg/mL en *Bixa Orellana*, 0.25 mg/mL en *Lippia graveolens* y *Ocimum basilicum* y de 0.125 mg/mL en *Litsea guatemalensis*.

**Tabla 3.** Concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida para los extractos vegetales etanólicos al 70% evaluados sobre *Listeria monocytogenes*

<b>Extracto vegetal etanólicos al 70%</b>	<b>CIM (mg/mL)</b>
<i>Bixa orellana</i> Linn	1
<i>Ocimum basilicum</i> L	0.25
<i>Litsea guatemalensis</i> Mez	0.125
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	0.25

CIM=Concentración Mínima Inhibitoria.

Mg =miligramo, mL= mililitro.

Fuente: Datos experimentales

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

*Listeria monocytogenes* es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa, intracelular, causante de infecciones graves en personas en edades extremas de la vida, en mujeres embarazadas y en inmunodeprimidos, la cual es capaz de sobrevivir sin dificultad en medios inanimados, adaptándose rápida y eficazmente a cambios extremos en las condiciones ambientales (López et al., 2006).

Este microorganismo representa un problema grave para las empresas de alimentos debido a la dificultad que presenta su control en las plantas de procesamiento. Debido a esto, es un microorganismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) llevados a cabo en las industrias alimentarias, así como en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (López et al., 2006). Por lo anterior, se ha investigado sobre el uso de productos vegetales que controlen el crecimiento de la bacteria en los alimentos y eviten el riesgo de infección, sin ser dañino al consumidor (Morales, 2015).

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de cuatro diferentes plantas nativas de Guatemala que son utilizadas como condimentos alimenticios (*Bixa Orellana* –achiote-, *Lippia graveolens* –orégano-, *Litsea guatemalensis* –laurel- y *Ocimum basilicum* –albahaca-) contra *Listeria monocytogenes*, con la finalidad de encontrar alternativas naturales para el control de este microorganismo en los alimentos.

El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica la obtención y adición de los mismos a los alimentos con fines de participar como antimicrobianos, sin alterar sus características organolépticas, manteniendo los costos a nivel industrial (Alzamora, 1997).

En este estudio los aceites esenciales evaluados no presentaron actividad alguna sobre la cepa ATCC 19115 de *L. monocytogenes*. La resistencia dada por esta bacteria puede estar atribuida a sus características de la membrana celular, la cual es hidrofílica, y se ha

demostrado que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales se atribuye a su capacidad de penetrar las membranas bacterianas e interferir en el metabolismo de la bacteria (Guiza y Rincón, 2007).

Ya que los aceites esenciales constituyen la fracción volátil de las plantas medicinales, y se componen de terpenos y derivados del benceno, compuestos que según estudios poseen mayor rendimiento en la época húmeda debido a que en la época seca las altas temperaturas volatilizan estos componentes (Tucux et. al., 2012), se puede explicar la ausencia de actividad antibacteriana por parte de los aceites esenciales en estos ensayos, ya que este estudio se llevó a cabo en una época que se caracterizó por la falta de lluvias en el país.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales sobre los microorganismos también está regida por otros múltiples factores, entre los que se encuentra la composición del aceite esencial y las características de la bacteria en sí. La variabilidad en la composición química de los aceites esenciales puede variar según las condiciones ambientales, la planta elegida para el estudio, el estado de la planta en el momento del análisis, el método de extracción del aceite, entre otras variantes más (Guiza y Rincón, 2007).

Estudios realizados anteriormente frente a una cepa de *S. aureus*, presentaron porcentajes de inhibición de 60 % para el caso del aceite de romero y 70 % en los aceites de tomillo y cúrcuma, respectivamente, y se notó estos dos últimos aceites se caracterizan por poseer un alto contenido de monoterpenos no oxigenados, con respecto al aceite de romero (Coy y Acosta, 2013). Esto puede ser otra variable justificante para la ausencia de actividad antimicrobiana por parte de los aceites en estudio, ya que dentro de la composición de los cuatro aceites evaluados no existe predominancia de los monoterpenos no oxigenados, aunque si hay presencia de los mismos.

Otro factor que pudo afectar en la ausencia de actividad antimicrobiana por parte de los aceites esenciales de estas cuatro plantas pudo ser que la concentración aplicada a los discos estériles no fue suficiente para su funcionalidad, ya que en el caso de muchos aceites esenciales es necesaria una alta concentración para obtener un efecto antimicrobiano.

Además, los constituyentes activos de estos aceites son normalmente compuestos volátiles, hidrofóbicos y muy lábiles, por lo que las condiciones de almacenamiento representan un papel fundamental en la funcionalidad de los mismos (Rodríguez, 2011).

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de los extractos vegetales etanólicos al 70%, se pudo evidenciar que todos los extractos evaluados presentaron actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* (Tabla 2). Esto se atribuye a los componentes presentes en las hojas de las plantas en estudio, los cuales son capaces de penetrar la membrana celular de la bacteria, actuando así como un potencial inhibidor de la replicación bacteriana (Guiza y Rincón, 2007).

De los cuatro extractos evaluados, el extracto etanólico al 70% de *Litsea guatemalensis* fue el que presentó mayor capacidad de actividad antibacteriana, ya que obtuvo la menor CIM contra *Listeria monocytogenes*, siendo de 0.125 mg/mL (Tabla 3). Esto puede deberse a que los componentes de *Litsea guatemalensis* que se encuentran en gran mayoría son tetrahidro-citroneleno, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, la carvona, butanoato de linalilo y el p-metoxi-cinamaldehído (Tucux, Mata y Leiva, 2012), los cuales poseen una gran actividad antibacteriana y en sinergia exacerban esta acción. El extracto de *Litsea guatemalensis* ha resultado efectivo sobre *S. aureus* y *Bacillus cereus*, obteniendo un porcentaje de inhibición de hasta el 99.9% (Guiza y Rincón, 2007).

Utilizando la técnica de espectrometría de masas, se ha identificado al 1,8- cineol (también llamado eucaliptol) como un componente esencial de esta planta, el cual ha demostrado poseer acción antibacteriana y es ampliamente utilizado como componente esencial de enjuagues bucales y como mucolítico y expectorante en infecciones respiratorias (Guiza y Rincón, 2007).

El contenido de flavonas en estos extractos también representó un papel importante en la actividad antibacteriana de estos extractos vegetales. La actividad antibacteriana de las mismas frente a *L. monocytogenes* pudo deberse a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana (Lizcano y Vergara, 2008).

De igual manera, la sensibilidad de *L. monocytogenes* a los extractos vegetales puede relacionarse a que al ser un microorganismo gram positivo, su pared celular es menos compleja, ya que no posee lipopolisacáridos y proteínas en su estructura, a diferencia de las bacterias gram negativas (Lizcano y Vergara, 2008).

En el caso de *Lippia graveolens*, los extractos diclorometánicos han presentado actividad inhibitoria significativa contra *Campylobacter jejuni*, ya que el diclorometano permite obtener compuestos pertenecientes al grupo de terpenoides, resinas y aceites, los cuales presentan actividad bactericida atacando la membrana celular a través de la bicapa lipídica, desencadenando una serie de acciones que causan la destrucción bacteriana (Samol y Santizo, 2011).

Se han realizado estudios donde se ha evaluado la acción antimicrobiana del extracto de orégano y se determinó que se obtuvo poder inhibitorio por parte del mismo sobre *E. coli* O157H:7 y sobre las especies del hongo *Aspergillus*. El orégano ha obtenido mejores resultados sobre *Listeria monocytogenes*, ya que estudios han demostrado que los compuestos fenólicos contenidos en estas especies han resultado más efectivos sobre bacterias gram positivas (Cubillo, 2007).

Las semillas de *Bixa orellana*, son ricas en carotenoides, de los cuales se encuentran reportes del efecto antimalárico de los mismos (Fernández et al., 2011). Varios estudios han demostrado que *Bixa Orellana* posee eectos inhibidores sobre las bacterias *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 0,08, 0,31, y 0,16 % (v/v) respectivamente, y que a concentraciones de un 0,63 % (v/v) inhibe el crecimiento del *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* y *Paenibacillus polymyxa*. Las concentraciones para la inhibición de *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus durans* han sido de 1,25 y 2,5 % (v/v), respectivamente. También se detectó actividad ante la *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomona vaginalis*, *T. faecalis*, *Leishmania* y múltiples hongos patógenos, siendo superior la actividad inhibitoria contra bacterias gram positivas que gram negativas, y se ha considerado que la

9'-cis-norbixina y todo-trans-norbixina son las responsables de sus propiedades antimicrobianas (Lourido y Martínez, 2010).

Un estudio realizado en Venezuela determinó que entre los compuestos volátiles presentes en el extracto de *Occimum basilicum*, el eucaliptol y el linalol, representan entre el 4,09 y 2,71%, respectivamente, y se ha reportado que estos compuestos se caracterizan por presentar actividad antimicótica, antiséptica y antimicrobiana, especialmente a nivel de las bacterias, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Otros estudios también han demostrado actividad del extracto de *O. basilicum* sobre otras bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritidis* (Rivas et al., 2015). La albahaca ha resultado también efectiva contra los géneros de bacterias gram positivas como *Corynebacterium* y *Clostridium* (Morataya, 2006).

## IX. CONCLUSIONES

1. Los aceites esenciales de las hojas de *Lippia graveolens*, *Ocimum basilicum*, *Litsea guatemalensis* y de las semillas de *Bixa Orellana*, no presentan actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*.
2. Los extractos vegetales etanólicos al 70% de las hojas de *Lippia graveolens*, *Ocimum basilicum*, *Litsea guatemalensis* y de las semillas de *Bixa Orellana*, presentan actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes* a una concentración de 1 mg/mL.
3. De las cuatro plantas en estudio, el extracto vegetal etanólico al 70% de las hojas de *Litsea guatemalensis* tiene la mejor Concentración Inhibitoria mínima (0.125 mg/mL) contra *Listeria monocytogenes*.

## X. RECOMENDACIONES

1. Investigar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos vegetales de otras especies vegetales de los géneros *Occimum*, *Litsea*, *Bixa* y *Lippia* contra *Listeria monocytogenes*.
2. Evaluar la estabilidad de los aceites esenciales de *Lippia graveolens*, *Bixa Orellana*, *Ocimum basilicum* y *Litsea guatemalensis* en diferentes condiciones ambientales.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzamora, S. (1997). Preservación: Alimentos conservados por factores combinados. *Temas en tecnologías de Alimentos*, 1(1), 45- 48.
- Arcila, C., Loarca, G., Lecona, S., y González, E. (2004). *El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes* (Tesis de postgrado). Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Cáceres, A. (2006). *Vademécum nacional de plantas medicinales*. Editorial Universitaria, Guatemala.
- Castaño, H., Ciro G., Zapata, J. y Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica ISSN*, 17(2), 149-154.
- Coy, C. y 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.
- Cubillo, M. (2007). *Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especies naturales sobre microorganismos asociados a alimentos* (Tesis de pregrado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Colburn, K., Kaser, C., Abeyta, C. Jr., & Weksil, M. (1990). *Listeria* species in a California estuarine environment. *Applied Environmental Microbiology*, 56(1), 2007-2011.

Davidson, P.M. (2001). *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds: Food Microbiology: and Fundamentals and frontiers* (2nd. Ed.). Washington, USA: ASM Press.

Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases (DFBMD) y Centers for Disease Control and Prevention Atlanta (CDC). (2009). Listeriosis. Recuperado de [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/listeriosis\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html)

Fernández, A., Mendiola, J. Acuña, D., Scull, R. y Gutiérrez, Y. (2011). Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa Orellana* L. *Revista cubana de medicina tropical*, 63(2), 181-184.

Flores, M.A., y Lindig-Cisneros, R. (2005). La lista de nombres vulgares y botánicos de árboles y arbustos propicios para repoblar los bosques de la República de Fernando Altamirano y José Ramírez a más de 110 años de su publicación. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 76(1), 11- 35.

Fundación Vasca para la Salud Alimentaria. (2006). *Listeria monocytogenes*. Recuperado de: <http://www.elika.net/>

Gisbert, N. (2014). *Determinación de la presencia de Listeria monocytogenes por cultivo, en carne molida de bovino expandida en supermercados de la ciudad capital de Guatemala* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Guiza, D. y Rincón, L. (2007). *Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus** (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Hammer, K., Carson, C. & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
- Hussain, A., Anwar, F., Hussain, S., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Elsevier*, 108(3), 986 – 995. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.010
- Jayaprakasha, G., Selvi, T., & Sakariah, K. (2002). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36(3), 117–122.
- Leonard, C., Virijevic, S., Regnier, T., & Combrinck, S. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South African Journal of Botany*, 76(1), 676-680.
- Linnaeus, C. (2008). *Species plantarum* (Vol.1). Bélgica: Impensis G.C. Nauk.
- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.

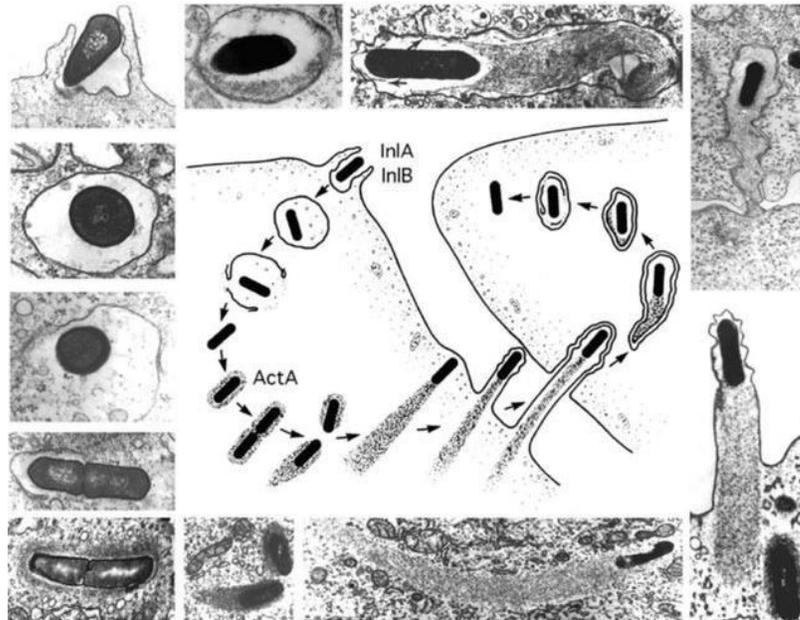
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., y Martínez, V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 224-234.
- Lourido, H. y Martínez, G. (2010). La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(2), 231-244.
- Martínez, J., Sulbarán.,B., Ojeda, G., Ferrer, A., y Nava,R. (2003).Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina.*Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 112-128.
- Morales, A. (2015). *Efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo (Thymus vulgaris) sobre la contaminación de Listeria monocytogenes en queso ricotta* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Morataya, M. (2006). *Caracterización farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala: albahaca de monte(Ocimum micranthum), orégano (Lippia graveolens), salvia sija (Lippia alba) y salviyá (Lippia chiapasensis)* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Murray, P.,Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2006). *Microbiología Médica* (5ta. Ed.). Madrid, España: Elsevier.

- Noriega, L., Ibáñez, M., González, S., Yamamoto, P., Astudillo, M., González, J. et al. (2008). *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Revista chilena de infectología*, 25(5), 342-349.
- Ocampo, V.R., Malda, G., y Suárez, R. (2009). Biología reproductiva del orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) en tres condiciones de aprovechamiento. *Agrociencia*, 43(5), 475-482.
- Rivas, K., Rivas, C. y Gamboa, L. (2015). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) *Multiciencias*, 15(3), 281-289.
- Rodríguez., E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología humana*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Samol, V. y Santizo, C. (2011). Actividad inhibitoria de extractos y aceites esenciales de especies condimentarias alimenticias y medicinales contra *Campylobacter jejuni*. *Revista científica*, 28(2), 34-43.
- Sánchez, B., y Palencia, E. (2010). Infecciones por *Listeria*. *Medicine*, 10(50), 3368-3372.

- Sánchez, E. Leal, I., Fuentes, L., y C., Rodríguez. (2000). Estudio farmacognóstico de *Ocimum Basilicum* (Albahaca Blanca). *Revista cubana farmacológica*, 34(3), 187-195.
- Sauders, B., Pettit, D., Currie, B., Suits, P., Evans, A., Stellrecht, K. et al. (2005). Low Prevalence of *Listeria monocytogenes* in human stool. *Journal of Food Protection*, 68(1), 178-181.
- Standley, P. & Steyermark, J. (1952). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(3), 228-506.
- Tobo, L.J. (2009). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de Pentacalia ledifolia y Pentacalia vaccinioides (Fam. Asteraceae) sobre cepas de Listeria monocytogenes, Pseudomonas fluorescens y Salmonella Typhimurium* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Distrito Central, Bogotá.
- Tucux, V., Mata, M., y Leiva, B. (2012). *Evaluación comparativa del contenido fitoquímico y actividad biológica in vitro de Litseaguatemalensis colectada en dos regiones y épocas diferentes en Guatemala* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Xie, L., Hettiarachchy, N., Jane M., & Johnson, M. (2003). Antimicrobial activity of Ginkgo biloba leaf extract on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, 68(1), 268-270.

## XII. ANEXOS

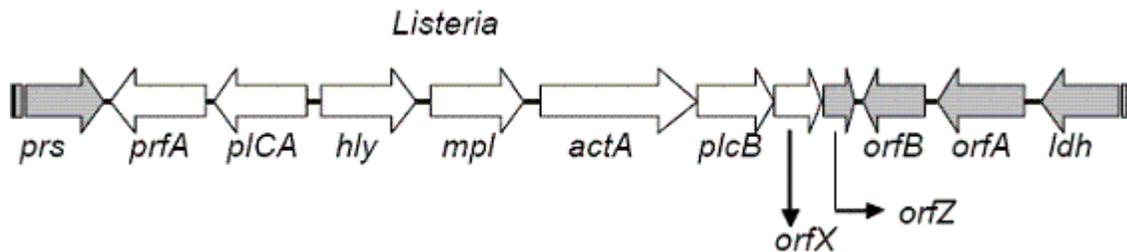
**Imagen 1.** Ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*



Fuente: López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J. y Martínez, V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 224-234.

*Listeria monocytogenes* alcanza la periferia de la célula infectada, entrando en contacto con la membrana celular y formando evaginaciones citoplásmicas que contienen en su extremo una bacteria. Estas estructuras son fagocitadas y la misma queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, lo cual permite el paso directo de la misma a los tejidos sin tener contacto con el sistema inmune.

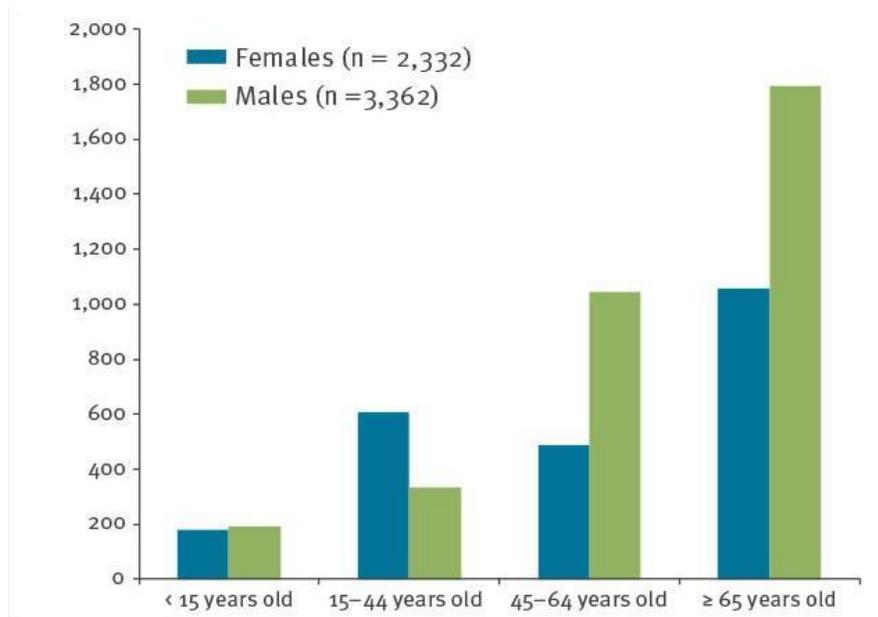
**Imagen 2.** Esquema de la organización genética del locus central de virulencia de *Listeria monocytogenes* y de la regulación que ejerce PrfA



Fuente: López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J. y Martínez, V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 224-234.

Los genes de los factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular de *Listeria monocytogenes* son *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*, que se encuentran ubicadas en la región del cromosoma conocida como isla 1 de patogenicidad de *Listeria*, LPI-1, o agrupamiento de genes de virulencia (virulence gene cluster).

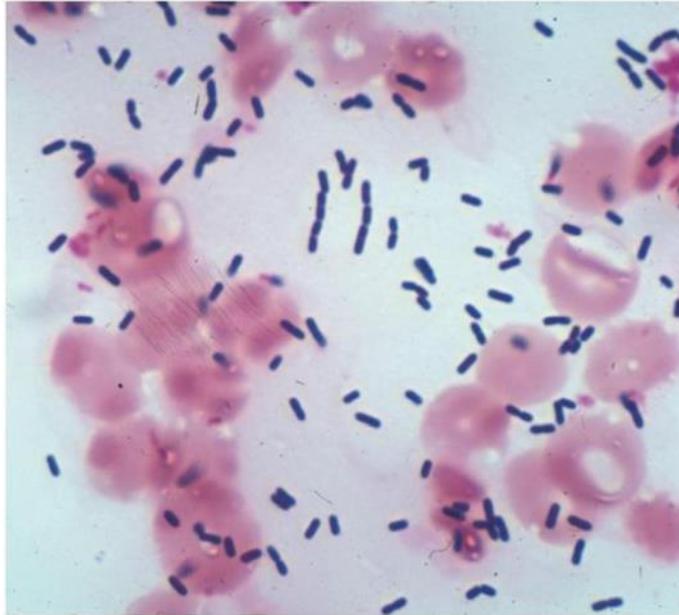
**Imagen 3.** Edad e incidencia de Listeriosis



Fuente: López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J. y Martínez, V. (2019). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 224-234.

La listeriosis humana afecta en su mayoría a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunodeprimidos, aumentando su severidad en los picos de la vida.

**Imagen 4.** Tinción de Gram de *Listeria monocytogenes*



**Fuente:** [Fotografía de Zuñiga, Miranda, Oñate y Bolívar]. (Australia.2011). Archivos fotográficos de USGS. Weeds of Australia, Biosecurity Queensland Edition.

Bacilos de *Listeria monocytogenes* que tiñen gram positivo y están dispuestos en empalizada, o en forma de V y L. Su estructura es ligeramente curva en los bordes.

**Imagen 5.** *Litsea guatemalensis*



**Fuente:** [Fotografía de James Shelley]. (Papua Nueva Guinea. 2013). Archivos fotográficos de la Provincia Central. Papua New Guinea, Central Province, Maru Ruama.

Hojas y el tallo de *Litsea guatemalensis*.

**Imagen 6.** *Lippia graveolens*



**Fuente:** [Fotografía de Lex García]. (Tamaulipas. 2015). Archivos fotográficos de Naturalista.México, Tula, Tamaulipas.

Hojas y flores de *Lippia graveolens* (óregano de monte).

**Imagen 7.** *Bixa orellana*



**Fuente:** [Fotografía de Mokie]. (China.2014). Archivos fotográficos de wikimedia commons. Archivos fotográficos de wikimedia commons. Archivo de Annatto (*Bixa orellana*) 6 wikimedia commons.

Morfología del fruto de *Bixa Orellana*, cuyas semillas son utilizadas como condimento alimenticio.

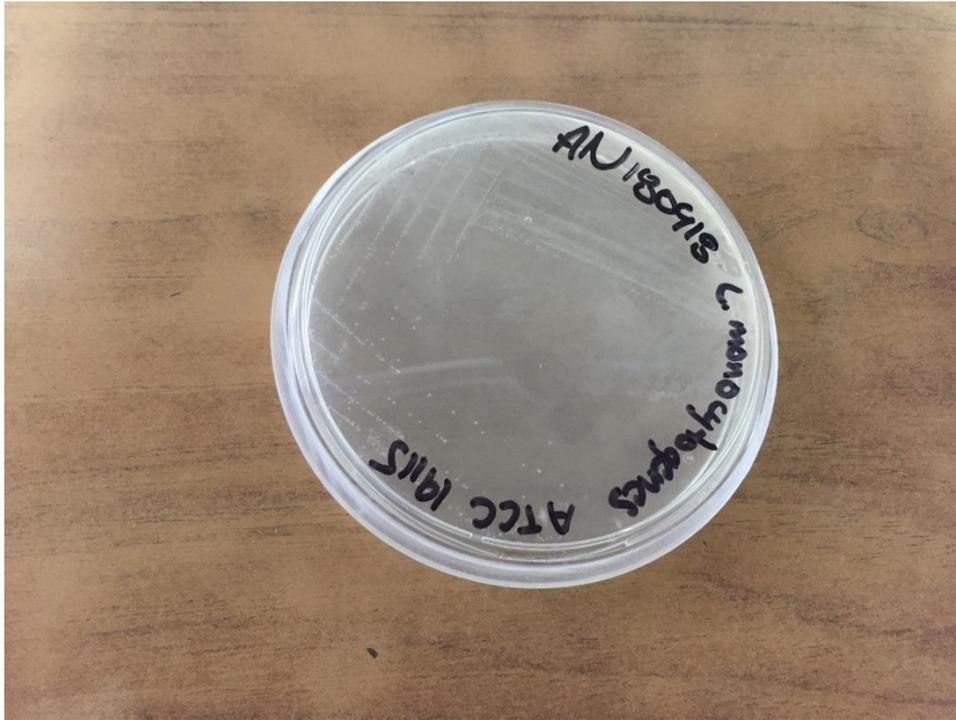
**Imagen 8.** *Ocimum basilicum*



**Fuente:** [Fotografía de Forest y Kim Starr]. (Australia.2016). Archivos fotográficos de USGS. Weeds of Australia, Biosecurity Queensland Edition.

Arbusto de *Ocimum basilicum* donde se puede apreciar la morfología de las hojas y las flores de la misma.

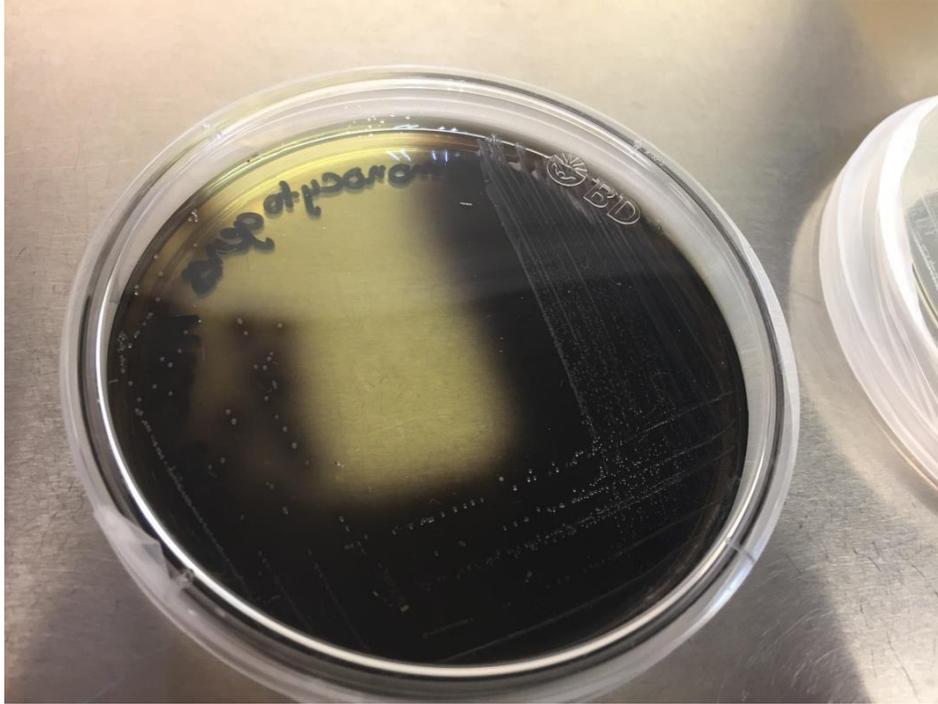
**Imagen 9.** Cepa de *Listeria monocytogenes* 19115 en agar Nutritivo



**Fuente:**[Fotografía de Geráldi Herrera]. (Guatemala.2018). Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Cito histología, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Colonias de *Listeria monocytogenes* en Agar Nutritivo, de apariencia suave, pequeñas, ligeramente convexas, con bordes regulares, blanquecinos y translúcidos.

**Imagen 10.** Cepa de *Listeria monocytogenes* 19115 en agar Oxford



**Fuente:**[Fotografía de Geráldi Herrera]. (Guatemala.2018). Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Colonias de *Listeria monocytogenes* en Agar Oxford, grisáceas o negras, de tamaño pequeño que presentan un halo negro fuertemente marcado.

**Tabla 5.** Enfermedades ocasionadas por *Listeria monocytogenes*

<b>Tipo de Listeriosis</b>	<b>Modo de Transmisión</b>	<b>Severidad</b>	<b>Tiempo de incubación</b>
<b>Infección local</b>	Contacto directo con animales	Se puede resolver en un tiempo prudencial	1 a 2 días
<b>Infección Neonatal</b>	En el parto o de niño a niño	Puede ser extremadamente severa, hasta causar meningitis o muerte	De 1 a 2 días hasta 5 a 12 días si se transmite de niño a niño
<b>Infección prenatal</b>	Alimentos contaminados	En la madre puede ser asintomático, y en feto puede causar muerte fetal, abortos meningitis	
<b>Adultos</b>	Alimentos contaminados	Asintomática o puede causar meningitis	De 20 a 30 días
<b>Gastroenteritis febril</b>	Consumo de alimentos con cantidades superiores a $10^7$ microorganismos	Diarrea, vómitos severos	<24 horas

Fuente: Fundación Vasca para la Salud Alimentaria. (2006). *Listeria monocytogenes*. Recuperado de:

<http://www.elika.net/>

La listeriosis puede desarrollarse como gastroenteritis en forma de diarrea, fiebre, dolor de cabeza y mialgias tras un periodo corto de incubación. Las consecuencias clínicas ocasionadas por *L. monocytogenes* presentan distintas formas clínicas dependiendo del estado del hospedador, ruta de transmisión, severidad y periodo de incubación.

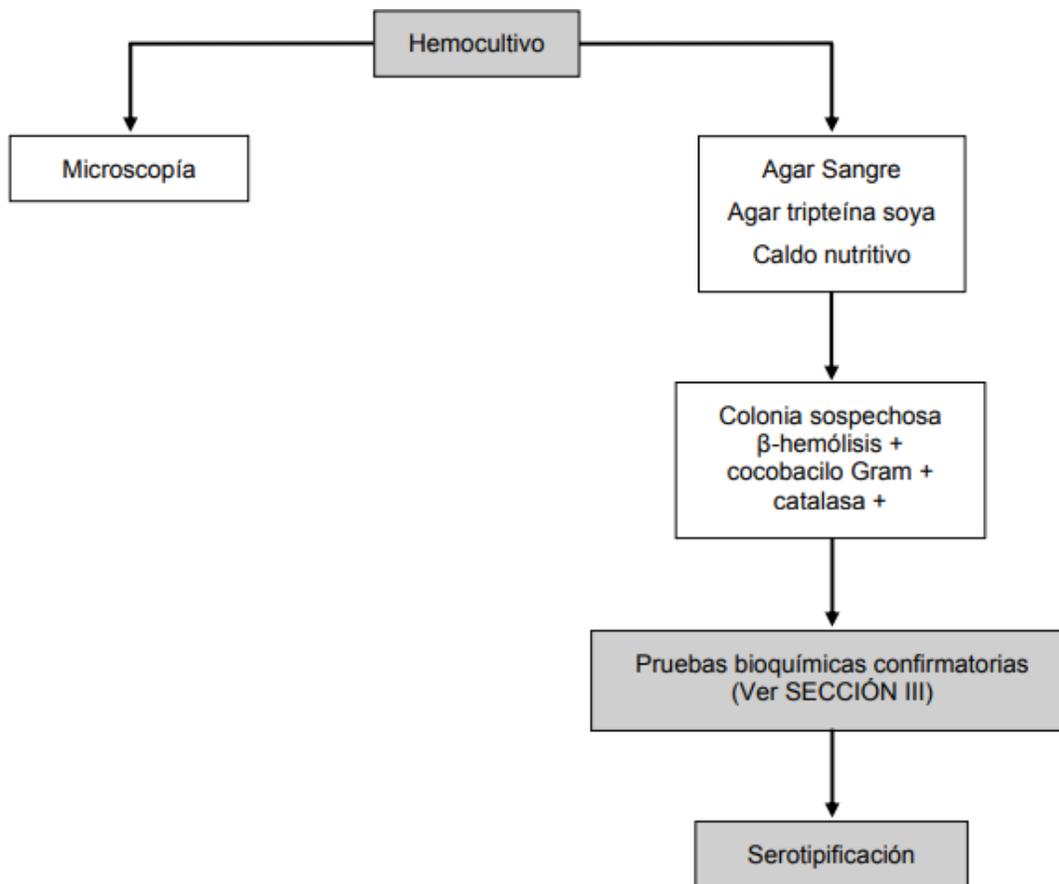
**Tabla 6.** Plantas utilizadas como preservantes en alimentos

Ajedrea	Cebollines	Jengibre	Pimienta de cayenne
Ajo	Cilantro	Laurel	Pimienta de Jamaica
Albahaca	Clavo	Mejorana	Pimentón
Alcaravea	Comino	Menta	Romero
Anís	Cúrcuma	Mostaza	Salvia
Azafrán	Eneldo	Nuez moscada	Té limón
Canela	Estragón	Perejil	Tomillo
Cardamomo	Hinojo	Pimienta	Vainilla

Fuente: Rodríguez., E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.

Existen varias hierbas y especies que contienen aceites esenciales que presentan acción antimicrobiana. En la Tabla 6 se pueden apreciar las plantas que son mayormente utilizadas como preservantes en la industria de alimentos.

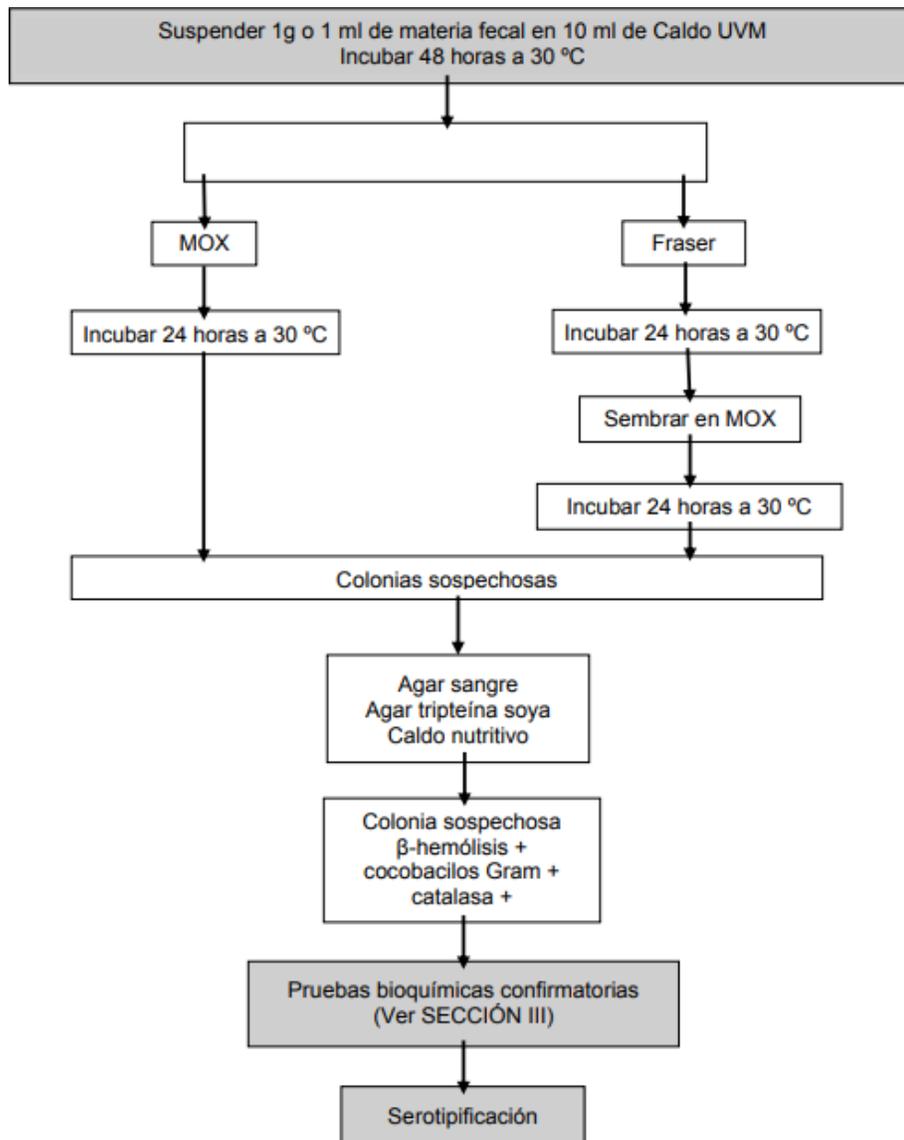
**Figura 1.** Marcha para la identificación de *Listeria monocytogenes* en hemocultivos



Fuente:Saunders, B., Pettit, D., Currie, B., Suits, P., Evans, A., Stellrecht, K.,... Wiedmann, M. (2005). Low Prevalence of *Listeria monocytogenes* in human stool. *Journal of Food Protection*, 68(1), 178-181.

Para la identificación de *Listeria monocytogenes* en un hemocultivo debe hacerse una Tinción de Gram para detectar bacilos gram positivos, cortos. Posteriormente debe sembrarse en un medio nutritivo y determinar la presencia de beta hemólisis, catalasa positivo. De igual manera pueden realizarse las pruebas bioquímicas confirmatorias y la serotipificación de la misma.

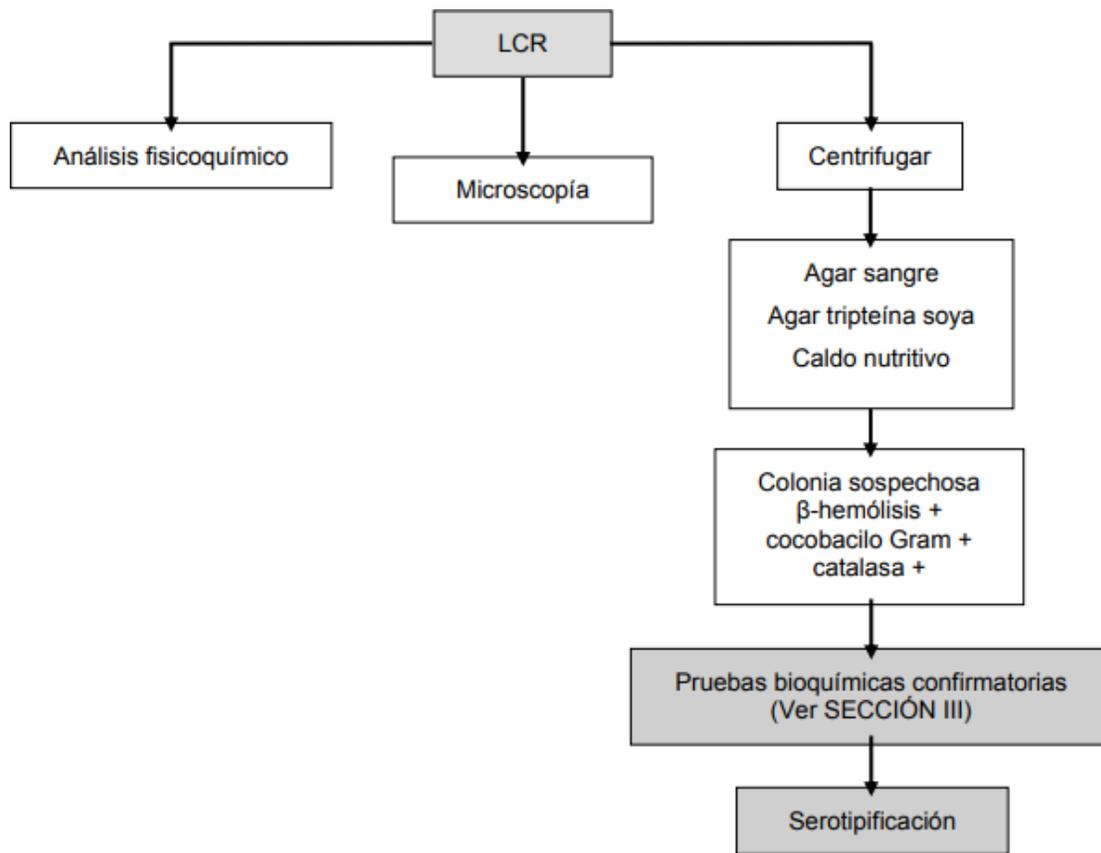
**Figura 2.** Marcha para la identificación de *Listeria monocytogenes* en heces



Fuente: Sauders, B., Pettit, D., Currie, B., Suits, P., Evans, A., Stellrecht, K.,... Wiedmann, M. (2005). Low Prevalence of *Listeria monocytogenes* in human stool. *Journal of Food Protection*, 68(1), 178-181.

Para la identificación de *Listeria monocytogenes* en heces debe utilizarse un medio de enriquecimiento especial y sembrar en dos medios selectivos para identificación los cuales son MOX y Fraser. Posteriormente se continúa con los medios de enriquecimiento conocidos y las pruebas bioquímicas confirmatorias, hasta llegar a la serotipificación.

**Figura 3.** Marcha para la identificación de *Listeria monocytogenes* en LCR



Fuente : Sauders, B., Pettit, D., Currie, B., Suits, P., Evans, A., Stellrecht, K.,...Wiedmann, M. (2005). Low Prevalence of *Listeria monocytogenes* in human stool. *Journal of Food Protection*, 68(1), 178-181.

Para la identificación de *Listeria monocytogenes* en LCR debe comenzarse con el análisis fisicoquímico, la microscopía y la siembra en medios de enriquecimiento para poder llegar a un diagnóstico primario. El diagnóstico definitivo lo determinan las pruebas bioquímicas y la serotipificación.



Geráldi Natalí Herrera Nájera

**Estudiante**



M.A. Ana Margarita Paz de Ramírez

**Asesora**



M.A. Isabel Cristina Gaitán Fernández

**Asesora**



Licda. Claudia Lucía Mata Asifuina

**Revisora**



M.Sc. Osberth Isaac Morales Esquivel

**Director**

**Escuela Química Biológica**



M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

**Decano**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**