

(S2-O126)

EFFECTO INHIBIDOR DE EXTRACTOS DE ORÉGANO, LAUREL Y ROMERO, OBTENIDOS MEDIANTE EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCÁRITICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Listeria monocytogenes* EN UN SISTEMA MODELO VEGETAL

MARINA MUÑOZ⁽¹⁾, LEYMAYA GUEVARA⁽¹⁾, ALFREDO PALOP⁽¹⁾, JAVIER TABERA⁽²⁾ y PABLO SALVADOR FERNÁNDEZ⁽¹⁾

⁽¹⁾Dpto. Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48 30203 Cartagena. Murcia, España, marina.munoz@upct.es, Tlf.968 325659, Fax. 968 325433

⁽²⁾Dpto. Química Física Aplicada. Universidad Autónoma de Madrid. Ciudad Universitaria de Cantoblanco. 28049 Madrid, España.

Palabras clave: EFS - antimicrobianos naturales – brócoli

RESUMEN

Existe un limitado número de estudios sobre la actividad antilisteriana de hierbas y especias en medio de cultivo y aún menos en alimentos. Las propiedades antimicrobianas de extractos de orégano, romero y laurel, obtenidos mediante Extracción por Fluidos Supercríticos (EFS), han sido estudiadas frente a *Listeria monocytogenes* CECT 4032 en un sistema modelo alimentario preparado a partir de jugo de brócoli, a 30 y 8 °C. En general, los extractos obtenidos en el segundo separador (fracción 2) mostraron mayor actividad que los obtenidos en el primer separador (fracción 1). La fracción 2 de los extractos de laurel y orégano produjo reducciones de aproximadamente 3 unidades logarítmicas en la población del patógeno. En la presente investigación, las dos fracciones de romero provocaron un efecto bactericida tanto a 30 como a 8 °C tras 20 horas y 25 días de incubación, respectivamente.

Los datos aquí presentados sugieren que alguno de los extractos obtenidos por EFS podría ser potencialmente útil en el control de la calidad microbiológica de vegetales frescos.

INHIBITORY EFFECT OF OREGANO, LAUREL AND ROSEMARY EXTRACTS OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION ON GROWTH OF *Listeria monocytogenes* IN A VEGETAL MODEL SYSTEM

Keywords: SFE - Natural antimicrobial - Broccoli

ABSTRACT

There are limited reports on antilisterial effect of spices and herbs in culture media and fewer still in foods. Antimicrobial properties of oregano, rosemary and laurel extracts obtained by Supercritical Fluid Extraction (SFE) are studied against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 in broccoli juice, chosen to represent a model food system, at 30 and 8°C. In general, the extracts collected in the second separator (fraction 2) showed a higher activity than those obtained in the first separator (fraction 1). The fraction 2 of laurel and oregano shown reductions of approximately 3 logarithmic units. In the present

investigation, both rosemary fractions have shown bactericidal effect against the target microorganism, at 30 and 8°C after 20 h and 25 days of incubation, respectively.

The data presented here suggest that the some of the extracts obtained by SFE could be potentially useful in the effective control of microbiological quality of fresh vegetables.

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas de alimentos por deterioro ocasionado por el desarrollo de microorganismos constituyen un grave problema, que no está totalmente resuelto a pesar de los métodos de conservación disponibles (congelación, escaldado, pasteurización, etc), caracterizándose muchos de estos métodos tradicionales por causar cambios bruscos en la naturaleza del producto fresco. Por otro lado, las demandas actuales del consumidor se decantan de forma creciente hacia el consumo de alimentos naturales, de apariencia y valor nutricional semejante a los productos frescos, sin aditivos químicos, microbiológicamente seguros, y que además sean más cómodos de consumir o elaborar culinariamente.

Listeria monocytogenes ha sido aislada de gran cantidad de vegetales crudos (Berrang y col., 1989; Beuchat y Brackett, 1991; Carlin y Nguyen-the, 1994; Carlin y col., 1995; Aureli y col., 2000). Además, *Listeria monocytogenes* es un patógeno que tiene la particularidad de crecer a temperaturas de refrigeración, habiéndose demostrado que es capaz de hacerlo incluso a $-0,4^{\circ}$ C (Francis y col., 1999). Debido a que la presencia de *Listeria* spp. en los productos vegetales refrigerados puede ser un hecho y a que las condiciones de almacenamiento de estos productos permiten el crecimiento y supervivencia de estas especies bacterianas, es necesario el estudio de nuevos métodos de conservación.

Los efectos antimicrobianos y antioxidantes de muchas hierbas y especias y su utilización como conservantes de alimentos son conocidos desde la antigüedad. Estas propiedades son atribuidas a la fracción del aceite esencial, la cual está principalmente compuesta de diferentes tipos de terpenos y fenoles. Los aceites esenciales presentan un amplio espectro de actividad, detectando inhibición frente a bacterias, hongos y levaduras. En la mayoría de los casos, los extractos de material vegetal se obtienen mediante disolventes orgánicos. A este respecto es importante tener en cuenta que la legislación internacional es cada vez más restrictiva con la utilización de disolventes en procesos alimentarios y, como consecuencia de ello, se buscan otros métodos de extracción alternativos. La extracción con fluidos supercríticos (EFS) es una tecnología que reúne todas las ventajas para sustituir a los procesos tradicionales de obtención de antimicrobianos naturales ya que opera a baja temperatura, en ausencia de oxígeno, existe una mayor difusividad del soluto en el disolvente y el agente extractante es CO₂, no un disolvente orgánico

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

El microorganismo utilizado en todos los experimentos fue *Listeria monocytogenes* CECT 4032. *L. monocytogenes* se hizo crecer en caldo de Triptona y Soja (TSB; Scharlau, Barcelona, España) suplementado con 0,6% de extracto de levadura (TSBYE). Los cultivos fueron incubados a 30°C durante 24 h.

Preparación del sistema modelo vegetal

Para la elaboración del sistema modelo vegetal utilizamos un kilo de brócoli que hervimos durante 10 minutos. La mezcla del brócoli con el agua de cocción fue triturada y el puré resultante se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 8°C. El sobrenadante obtenido se filtró, separando así la fase líquida y sólida. A continuación

preparamos tubos con 10 mL de la solución líquida de brócoli y éstos se llevaron a ebullición durante 10 minutos, inactivando de esta manera la microflora endógena del vegetal. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su uso.

Extractos naturales

Extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*, L.), oregano (*Origanum vulgare*, L.) y laurel (*Laurus nobilis*) fueron obtenidos desde un extractor por fluidos supercríticos en la planta piloto del departamento de Química Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, utilizando CO₂ como fluido supercrítico. Las diferentes condiciones de trabajo para la extracción y fraccionamiento de cada uno de los extractos se encuentran recogidos en la Tabla 1.

Soluciones stock de las diferentes fracciones de cada extracto fueron preparadas en etanol (95%). A partir de estas soluciones stock, las diluciones se prepararon utilizando caldo TSBYE

Efecto inhibidor de los extractos supercríticos

Cada una de las dos fracciones obtenidas de los extractos supercríticos de orégano, romero y laurel fue añadida por duplicado a diferentes tubos con jugo de brócoli en concentración de 1000 ppm. Esta concentración fue ensayada por ser la máxima empleada en la industria como aditivo. Posteriormente, los tubos fueron inoculados con *L. monocytogenes* e incubados a 30 y 8°C durante 24 h y 27 días, respectivamente, tomándose muestras a intervalos regulares de tiempo. Los recuentos de *L. monocytogenes* se realizaron en agar TSAYE. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 horas.

Análisis de datos experimentales

Los datos obtenidos fueron representados como el logaritmo de los supervivientes frente al tiempo de incubación, obteniendo así las curvas de crecimiento. Las curvas de crecimiento se ajustaron usando la función de Baranyi y col. (1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 para multiplicarse y aumentar su población en un sistema modelo vegetal formado a partir de brócoli tanto a una temperatura óptima como a 8° C se muestra en las Figuras 1-5. Esta bacteria, cuando se inoculó en ausencia de extracto supercrítico, se multiplicó de manera significativa alcanzando niveles de 9,13 y 9,69 log UFC /mL a 30 y 8°C y después de 24 h y 27 días, respectivamente. Numerosos autores han manifestado la capacidad de esta bacteria para crecer a bajas temperaturas, aun cuando el vegetal había sido higienizado previamente con cloro o envasado en atmósfera modificada (Beuchat y Brackett, 1990; Carlin y Nguyen-The, 1994).

Las figuras 1 y 2 muestran las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en un jugo de brócoli, adicionado con dos fracciones supercríticas de laurel a concentración de 1000 ppm e incubados a 30°C y 8°C, respectivamente. En la figura 1 se puede observar que la fracción 2 provocó una disminución del crecimiento, alcanzando valores máximos de aproximadamente 6,7 unidades logarítmicas tras 20 horas de incubación. Esto supone una reducción de 2,4 unidades logarítmicas con respecto al control.

Resultados semejantes fueron observados a 8°C (figura 2). La fracción 1 de laurel no tuvo efecto importante sobre el crecimiento de la bacteria en brócoli, mientras que los recuentos del cultivo de *L. monocytogenes* combinada con la fracción 2 del extracto fueron significativamente inferiores a los del cultivo puro (sin adición de extracto) durante todo el

experimento. La fracción 2 redujo *L. monocytogenes* en 3 unidades logarítmicas transcurridos 25 días desde el inicio del experimento.

En ambos casos, la fracción 2 de los extractos manifestó mayor capacidad inhibidora hacia *L. monocytogenes*. Autores como Nguyen y col. (1994) describen que tras unas condiciones concretas de extracción, se puede llegar a obtener dos fracciones, la primera de ellas presenta mayor capacidad antioxidante y la segunda, de marcado carácter antimicrobiano, corresponde al aceite esencial

En las figuras 3 y 4 se muestran las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* en brócoli con o sin adición de las dos fracciones obtenidas del extracto de romero a 30°C y 8°C, respectivamente. A ambas temperaturas, las dos fracciones redujeron los recuentos de la bacteria de forma significativa. La fracción 1 de romero redujo los recuentos por debajo de 2 unidades logarítmicas transcurridas 4 horas de incubación a 30°C, mientras que la fracción 2 de romero obtuvo el mismo efecto pasadas 6 horas desde el inicio del experimento (figura 3).

De manera similar la fracción 1 del extracto de romero redujo la población de *L. monocytogenes* por debajo de 2 unidades logarítmicas después de 16 días de incubación a 8°C (figura 4). La fracción 2 del extracto de romero también demuestra ser un eficaz antimicrobiano reduciendo los recuentos por debajo de 2 unidades logarítmicas después de 24 días de incubación.

La fracción 2 del extracto de orégano fue la única seleccionada con el fin de estudiar su capacidad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* en brócoli a 30°C, debido a los interesantes resultados obtenidos en caldo TSB en trabajos anteriores (figura 5).

La fracción 2 de orégano provocó una reducción de la población de *Listeria monocytogenes* con respecto al control (sin adición de orégano) desde el comienzo, siendo mas significativo al final de la incubación, con una disminución de 3 unidades logarítmicas (figura 5).

Existen pocos estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en brócoli. Lis- Balchin y col. (2003) ensayaron aceites esenciales obtenidos a partir de hojas de geranio (*Sweet Mimosa*, *Mabel Grey*, *P. graveolens*, *Atomic Snowflake*, *Royal Oak* y *Attar of Roses*) a una concentración de 1000 ppm frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes* en sopa de brócoli, obteniendo una total inhibición de la bacteria Gram positiva con todos los aceites probados.

CONCLUSIONES

Concluyendo, podemos afirmar que la actividad antibacteriana de los extractos supercríticos en jugo de brócoli incubado a 30 y 8 °C sobre *L. monocytogenes* inhibió su crecimiento siendo éste aproximadamente 3 unidades logarítmicas inferior que el control cuando se adicionó la fracción 2 de laurel y orégano. Las dos fracciones de romero provocaron un efecto bactericida tanto a 30 como a 8 °C tras 20 horas y 25 días de incubación, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida por el Ministerio de Educación y cultura, proyecto AGL2002-04059-C02-02, así como a la beca concedida por la Fundación CajaMurcia.

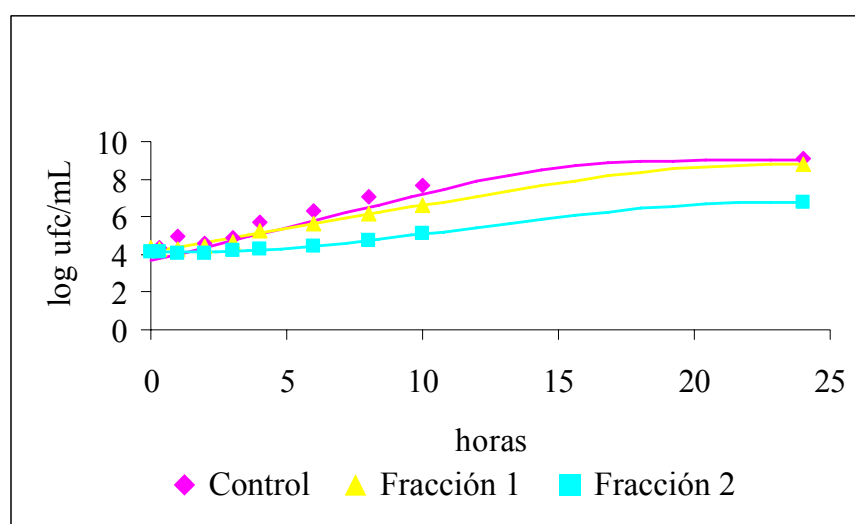
BIBLIOGRAFÍA

- Aureli, P., Fiorucci, G.C. and Caroli, D. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine*, 342: 1236-1241.
- Baranyi, J, Roberts, T.A. and McClure P.A. 1993. A non-autonomous different equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10: 43–59.
- Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *Journal of Food Science*, 55:755-758.
- Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1991 Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:1367-1371.
- Carlin, F. and Nguyen-The, C. 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* on four types of minimally processed green salads. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 222-226.
- Carlin, F., Nguyen-the, C. and Abreu da Silva, A. 1995. Factors affecting the growth of *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh endive. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 636-646.
- Francis, G.A., Thomas, C. and O’Beirne, D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 1-22.
- Lis-Balchin, M., Steyrl, H. and Krenne, E. 2003. The comparative effect of novel Pelargonium essential oils and their corresponding hydrosols as antimicrobial agents in a model food system. *Phytotherapy Research*. 17: 60-65.
- Nguyen U., Evans, D.D. and Frakman G. 1994. Natural antioxidants produced by supercritical fluid extraction. In “Supercritical Fluid Processing of Foods and Biomaterials”. Ed. S.S.H. Rizvi. Chapman & Hall. London. p.103.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Condiciones de trabajo y preparación de los extractos supercríticos

| Muestra | Condiciones extractor | Condiciones separador | Cantidad de muestra (mg) |
|------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| Orégano: | | | |
| Fracción 1 | 250 bar, 60°C | 100 bar, 60°C | 200,6 |
| Fracción 2 | 250 bar, 60°C | 20 bar, 20°C | 200,9 |
| Romero: | | | |
| Fracción 1 | 250 bar, 60°C | 100 bar, 60°C | 200,5 |
| Fracción 2 | 250 bar, 60°C | 20 bar, 20°C | 201,0 |
| Laurel: | | | |
| Fracción 1 | 250 bar, 60°C | 100 bar, 60°C | 202,0 |
| Fracción 2 | 250 bar, 60°C | 20 bar, 20°C | 200,6 |

**Figura 1** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en Brócoli adiccionado con las diferentes fracciones de laurel durante la incubación a 30°C

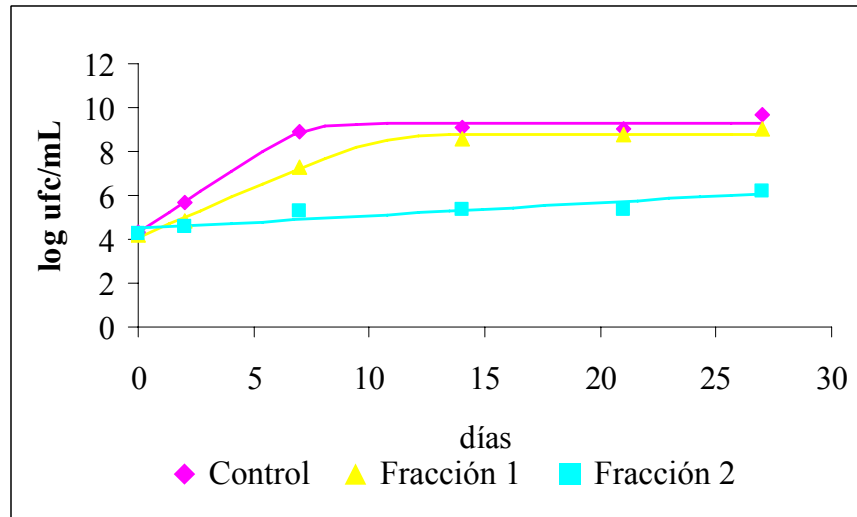


Figura 2 Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en Brócoli adicionado con las diferentes fracciones de laurel durante la incubación a 8°C

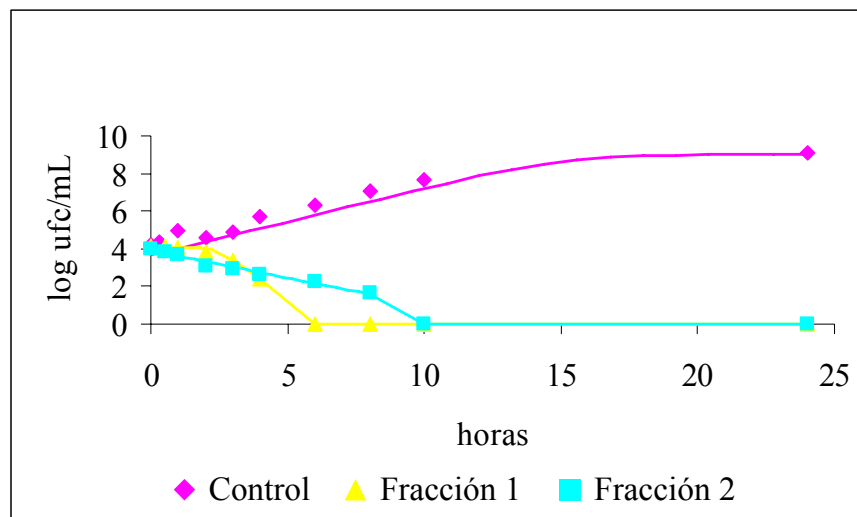


Figura 3 Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en Brócoli adicionado con las diferentes fracciones de romero durante la incubación a 30°C

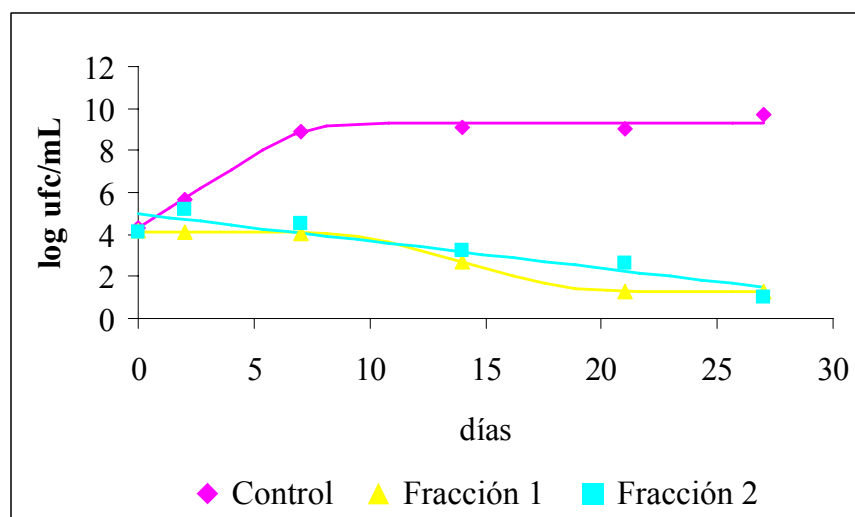


Figura 4 Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en Brócoli adicionado con las diferentes fracciones de romero durante la incubación a 8°C

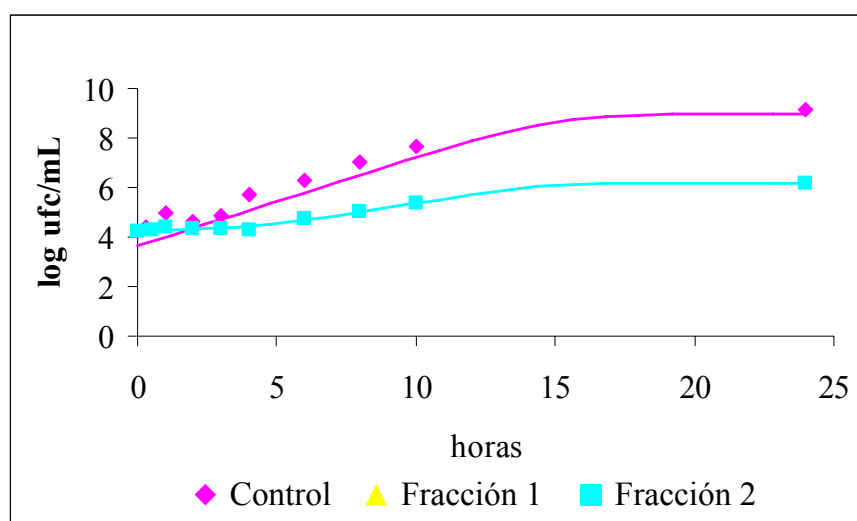


Figura 5 Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* en Brócoli adicionado con las diferentes fracciones de orégano durante la incubación a 30°C