

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**Actividad bactericida del extracto etánolico de *Aloysia citridora*
“cedrón” en bacterias alteradoras de carne fresca.**

Autor: Dra. Flor Teresa García Huamán

Co-Autor: Tec. Marleny Ángeles Trauco

CHACHAPOYAS - 2021

DEDICATORIA

***A TODOS LOS COMPROMETIDOS CON LA
INVESTIGACIÓN Y EL USO DE PLANTAS MEDICINALES***

AGRADECIMIENTO

A las autoridades de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas por permitirnos el uso del laboratorio de Tecnología Agroindustrial.

A mis amigos, colegas y compañeros de trabajo, de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, por las acertadas sugerencias en el desarrollo de la presente investigación.

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTO | iii |
| ÍNDICE | iv |
| RESUMEN | v |
| ABSTRACT | vi |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MATERIAL Y MÉTODO | 6 |
| 2.1 Diseño de la investigación. | 6 |
| 2.2 Muestra biológica. | 6 |
| 2.3 Métodos técnicas e instrumentos de recolección de datos y procedimiento. | 6 |
| 2.3.1 Obtención del extracto de <i>Aloysia citridora</i> | 6 |
| 2.3.2 Instalación de tratamientos. | 7 |
| 2.3.3 Aislamiento primario e identificación de bacterias | 8 |
| 2.3.4 Recuento de bacterias. | 8 |
| 2.3.5 Determinación de la actividad bactericida. | 8 |
| 2.3.6. Medición de la actividad antibacteriana | 8 |
| IV. RESULTADOS | 10 |
| V. DISCUSIÓN | 12 |
| VI. CONCLUSIONES | 15 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 16 |
| ANEXO: Fotos | 20 |

Actividad bactericida del extracto etánolico de *Aloysia citridora* “cedrón” en bacterias alteradoras de carne fresca.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad bactericida del extracto etánolico de *Aloysia citridora* “cedrón” en bacterias alteradoras de carne. Se utilizó como muestra biológica carne fresca (vacuno, pollo y pescado). Se preparó el extracto etanólico utilizando 100g de hoja triturada con un litro de etanol, macerado por 8 días a temperatura ambiente. El filtrado de la maceración se sometió a evaporación por 72 horas a 42 °C. Se trabajó con un grupo control (10g de carne y 90 ml de agua destilada) y un grupo experimental (10g de carne y 90 ml de extracto etanólico), luego se procedió a las siembras microbianas. Se encontró que el halo de inhibición promedio, de crecimiento para *Staphylococcus aureus* fue de 12mm, lo que demuestra la propiedad antibacteriana de *Aloysia citridora* para *Staphylococcus aureus*, además se observó inhibición de crecimiento bacteriano en agar Macconkey y agar nutritivo, en los grupos experimentales, mientras que en el grupo control se observó crecimiento. Respecto a los recuentos en agar nutritivo el mayor valor fue de 1.21×10^3 ufc/ml para el grupo control con carne de pollo. Se concluye que el extracto etánolico de *Aloysia citridora* tiene actividad bactericida en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, bacterias alteradoras de carne fresca.

Palabras clave: Actividad bactericida, extracto etanólico

Bactericidal activity of the ethanolic extract of *Aloysia citridora* "cedrón" in spoilage bacteria of fresh meat.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the bactericidal activity of the ethanolic extract of *Aloysia citridora* "cedrón" in meat spoilage bacteria. Fresh meat (beef, chicken and fish) was used as biological sample. The ethanolic extract was prepared using 100g of crushed leaf with one liter of ethanol, macerated for 8 days at room temperature. The filtrate from the maceration was subjected to evaporation for 72 hours at 42 °C. We worked with a control group (10g of meat and 90 ml of distilled water) and an experimental group (10g of meat and 90 ml of ethanolic extract), then proceeded to microbial seeding. It was found that the average growth inhibition halo for *Staphylococcus aureus* was 12mm, which demonstrates the antibacterial property of *Aloysia citridora* for *Staphylococcus aureus*, in addition bacterial growth inhibition was observed in Macconkey agar and nutrient agar, in the experimental groups, while in the control group growth was observed. Regarding the counts in nutrient agar, the highest value was 1.21×10^3 cfu/ml for the control group with chicken meat. It is concluded that the ethanolic extract of *Aloysia citridora* has bactericidal activity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, fresh meat spoilage bacteria.

Keywords: Bactericidal activity, ethanolic extract.

I.-INTRODUCCIÓN

Un bactericida es una sustancia que tiene la capacidad de eliminar bacterias, microorganismos unicelulares u otros organismos, los bactericidas pueden venir en forma de desinfectantes, antisépticos o antibióticos.

Un principio activo de las plantas es el principio bactericida, cuando es capaz de eliminar las bacterias o inhibir su crecimiento, sin producir daño al organismo infectado. Los antibacterianos actúan sobre la pared celular de las bacterias, sobre la membrana celular, sobre el ADN de las bacterias y sobre los ribosomas encargados de sintetizar las proteínas.

Algunas investigaciones se enfocan en la búsqueda de nuevos aditivos alimentarios, como son los extractos de hojas de plantas. Sin embargo, su composición y bioactividad están influenciados por el solvente y el método de extracción utilizado durante su obtención, ya que los extractos de hojas de plantas obtenidos con solventes polares y métodos de extracción no convencionales, muestran mayor contenido de fitoquímicos, actividad antioxidante y actividad antibacteriana (Ramírez, et al., 2018).

Se ha comprobado que *Origanum vulgare* (oregano), *Tagetes elliptica* (chincho) y *Tagetes minuta* (huacatay) son plantas naturales que tienen un buen efecto antimicrobiano (Bussmann, et al., 2008).

Londoño y López (2016), estudiaron la actividad bactericida y fungicida in vitro de extractos etanólicos y el obtenido con acetato de etilo al 2% de *Tithonia diversifolia*, realizaron extracciones usando los solventes etanol, acetato de etilo y hexano. Se hicieron las pruebas de sensibilidad y concentración mínima inhibitoria *In vitro*, determinando que la bacteria *S. aureus* presentó sensibilidad frente a los extracto etanol y acetato de etilo de *Tithonia diversifolia*. Los demás organismos presentaron nula sensibilidad a los extractos.

Córdova, et. al. 2016, estudiaron la actividad antibacterina y antifúngica de un extracto hexánico proveniente de la raíz de *Salvia apiana*. Los extractos de salvia a las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/ml causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

Sin embargo, no presentaron efecto significativo sobre *Escherichia coli* y *Candida tropicalis*.

Mathews, 2007, evaluó la actividad bactericida y fungicida de extractos crudos de cuatro especies forestales *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* y *J. copaia*, determinando su concentración inhibitoria mínima (CIM) en mg/ml frente a cepas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Los extractos crudos acuosos de *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* demostraron tener actividad inhibitoria frente a bacterias en concentraciones de 5 a 50 mg/ml y los de *J. copaia* mostraron escasa actividad antimicrobiana.

Aloysia citridora, conocida como cedrón, es una planta de la familia Verbenacea, originaria de America del Sur, se cultiva como planta ornamental y por sus propiedades medicinales. Los extractos de *Aloysia citridora* son ricos en fenilpropanoides, especialmente verbascósido que presentan actividad biológica como antioxidantes y bactericidas.

Las plantas son conocidas por múltiples beneficios y atributos, entre ellos el principio bactericida, se han utilizado desde culturas ancestrales hasta el día de hoy con un valor agregado que es la evolución y aprovechamiento de estos, en diversos campos del sector agroindustrial (Ody,2000).

La industria cárnica tiene como uno de sus objetivos incrementar la vida útil de sus productos, la que se ve afectada por factores tales como la oxidación de lípidos y la actividad bacteriana, para evitarlo se utilizan aditivos sintéticos que pueden ejercer efectos adversos en la salud humana lo que provoca desconfianza en los consumidores.

Los productos decontaminantes deben reunir ciertas propiedades para ser utilizados en alimentos, como poseer actividad bactericida fuerte y rápida, no dejar residuos que puedan afectar al consumidor, no afectar las características organolépticas y ser aceptado por el público consumidor (Van Der Marel, et al. , 1988)

La carne y los productos cárnicos son fuente importantes de nutrientes tales como vitaminas, minerales y aminoácidos, también contienen grasa y ácidos grasos, tanto saturados como insaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados poseen dobles enlaces, los cuales a altas

concentraciones son fácilmente susceptibles a oxidación produciendo compuestos oxidativos secundarios que desencadenan el proceso oxidación de lípidos factor responsable del deterioro de la calidad en carne y productos cárnicos durante su almacenamiento (Warnants et al.,1996, Faustman et al., 2010).

La carne y sus productos es un medio ideal para el crecimiento de microorganismos deteriorativos y patógenos, tales como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytógenes*, *Pseudomona* spp. *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, por mencionar algunos (Heredia et al. 2014).

Algunas bacterias de la carne, como las del género *Pseudomona* producen amoniaco como producto del metabolismo de aminoácidos, lo que ocasiona la elevación del pH durante la alteración cárnica (Marshall y Balá, 2001). Los microorganismos Gram negativos que predominan durante la contaminación aerobia de la carne, son responsables generalmente de la producción de olores pútridos y sulfurosos (Nychas et al.,1988).

Los microorganismos de la carne provienen de las operaciones inherentes a su obtención, también del suelo, del tracto gastrointestinal, del cuero, del contenido gastrointestinal, de los operarios y equipos utilizados (Rodríguez y Aparicio, 2018).

La mayoría de los microorganismos en carne son Gram positivas mesófilos como: *micrococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. Una fracción algo menor está compuesta por bacterias gram negativas psicrofilos originados en el suelo, agua, vegetación (Rodríguez y Aparicio, 2018)

El crecimiento de los microorganismos, es considerado uno de los factores responsables del deterioro de la carne y sus productos, representando más del 20% de las pérdidas a nivel mundial (Saucier, 2016). Son numerosos los factores que influyen sobre el tipo y tasa de crecimiento microbiano en los productos cárnicos pudiéndose dividir en intrínsecos (contenido de nutrientes, ph, actividad de agua, potencial redox) y extrínsecos (temperatura, humedad y tensión de oxígeno), (Greer, 1988).

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es

el análisis conductimétrico (Sawai, et al.,2002). Las técnicas de difusión han sido ampliamente usados para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana (Freixa, et. al.,1998).

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento de microorganismos (Ramirez y Marin, 2009)

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnica son el agar Miuller Hinton, agar tripticasa soya y agar nutritivo, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (Ramírez y Marin, 2009).

En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación de los alimentos, esto debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con intoxicaciones. La demanda de productos frescos mínimamente tratados está aumentando, así como el interés por los agentes antimicrobianos de origen natural (derivados de vegetales), por esto en la actualidad se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, permitiendo con esto productos semejantes al producto fresco pero con menos aditivos (Rodríguez, 2011)

Actualmente se ha puesto especial atención a compuestos biológicamente activos extraídos de diversas especies de plantas tradicionales empleadas en la medicina herbolaria como una posible alternativa para la eliminación de microorganismos (Córdova, et. al. 2016).

En general, cada vez se descubren más plantas o partes de estas que contienen antimicrobianos naturales, por ejemplo los que incluyen compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, se tendrá mayor seguridad y mejor calidad de los alimentos ya que este tipo de antimicrobianos se consideran como fuentes potencialmente seguras (Rodríguez, 2011).

Algunos microorganismos se adquieren por contacto directo a través de la ingesta de alimentos contaminados y/o almacenados insalubrementemente (Londañó, et al. 2016). La carne fresca es un

alimento rico en nutrientes y altamente perecedero por la presencia de microorganismos agregados en las diferentes etapas de su obtención.

La presencia de microorganismos en carne no sólo es relevante por su potencial efecto alterador del producto final, sino también y por albergar patógenos de alto riesgo en salud pública (Rodríguez y Aparicio, 2018).

El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que afecte negativamente a las características sensoriales (Rodríguez, 2011).

Es importante también con la finalidad de disminuir la carga microbiana y aumentar el tiempo de vida útil de los alimentos, la utilización de conservantes naturales obtenidos de los extractos de las plantas, ante la acción de los microorganismos, con el fin de impedir su deterioro por un tiempo determinado bajo ciertas condiciones de almacenamiento.

Aloysia citridora es una planta cultivable en la región Amazonas, sus hojas contienen aceite esencial, cuyo componente principal es el citral, además limoneo, linalol, cineol, terpinol y cariofileno, un aldehído sesquiterpénico al que se le atribuye acción eupéptica y espasmolítica. También se ha encontrado que tiene propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus*.

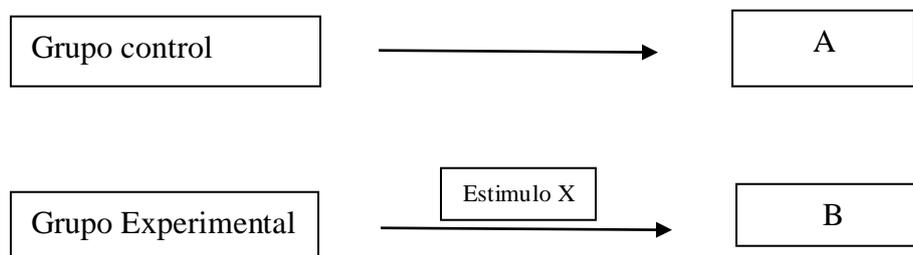
Por lo anteriormente mencionado es importante determinar la actividad bactericida del extracto etanólico de *Aloysia citridora* en el bacterias alteradoras de carne de ganado de vacuno, carne de pollo y carne de pescado, con la finalidad de disminuir el recuento bacteriano aumentando el tiempo de vida útil del alimento.

El objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad bactericida del extracto etanólico de *Aloysia citridora* en el bacterias alteradoras de carne.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Diseño de investigación

Se aplicó el diseño experimental con dos grupos después o con pos prueba únicamente y grupo control.



2.2. Muestra biológica.

Carne de vacuno, carne de pollo, carne de pescado.

2.3. Método, técnicas e instrumentos.

2.3.1. Obtención del extracto de *Aloysia citriodora* “cedrón”

Recolección de hojas: Las hojas de planta medicinal *Aloysia citriodora* “cedrón”, se recolectaron del anexo Taquia, ubicado en el distrito de Chachapoyas, departamento de Amazonas, para ello se utilizaron bolsas de primer uso, las mismas que fueron transportadas al laboratorio de Tecnología Agroindustrial de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Se pesó 4 Kg. de hojas y se lavó con agua destilada estéril. Posteriormente se secó a temperatura ambiente, sin exposición solar para su deshidratación por 24 horas. Luego se colocó en una estufa a 37°C por 24 horas. (Pimentel et al., 2015), (Azuero, et al., 2016).

Obtención de extracto de plantas: Los 4kg de hojas secas fueron extendidas en una mesa y se seleccionaron las hojas libres de hongos. Luego se pulverizaron en una trituradora y se colocaron en un frasco de vidrio y se le agregará 1L. de etanol químicamente puro (QP) por cada 100g. de hoja triturada. Se almacenó a temperatura ambiente por un lapso de 8 días para su maceración. (Pimentel et al., 2015). El macerado se filtró usando un papel de filtro WhatmanN°40, los remanentes se dejaron en maceración por 8 días y luego se filtraron con la misma técnica. Posteriormente el filtrado fue sometido a evaporación a 40°C por 72

horas para extraer el etanol; logrando una evaporación de aproximadamente el 80%. Al extracto etanólico se le realizó la prueba de esterilización utilizando caldo tioglicolato, para evidenciar de ser el caso, crecimiento microbiano a través del enturbiamiento del medio de cultivo (Pimentel et al., 2015).

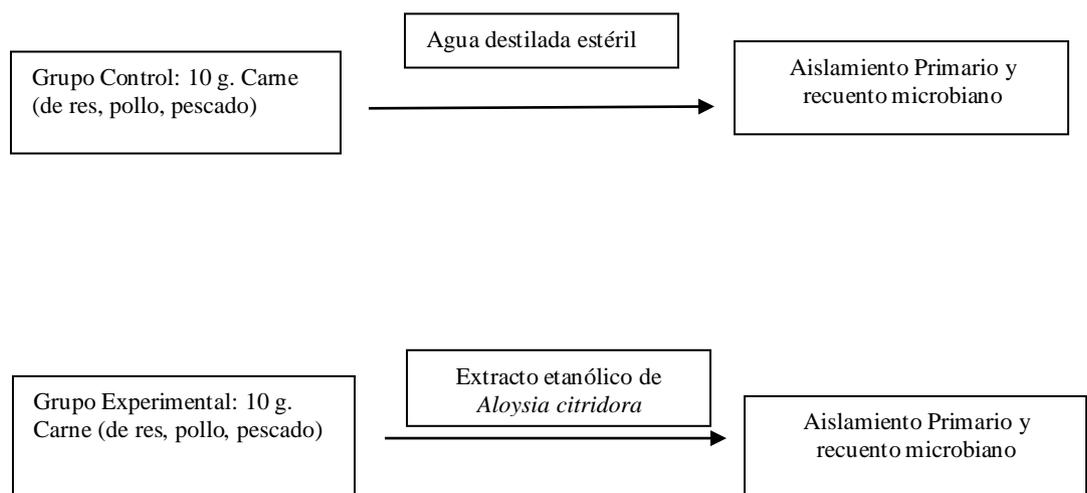
2.3.2. Instalación de los tratamientos.

Tratamiento del grupo control: Se colocó 10g. de carne (vacuno, pollo, pescado) en 90 ml. de agua destilada estéril (dilución 10^{-1}). Luego se sembró en agar Mac Conkey y agar para estafilococos. Se realizó el recuento bacterino en agar nutritivo.

Tratamiento del grupo experimental: Se colocó 10g. de carne (vacuno, pollo, pescado) en 90 ml. de extracto etanólico. Se dejó reposar por 24 horas y posteriormente se retiró la muestra de carne y se colocó sobre un papel absorbente estéril.

Se colocó 10g. de la muestra de carne (vacuno, pollo, pescado del paso anterior) en 90 ml. de agua destilada estéril (dilución 10^{-1}), luego se sembró en agar Mac Conkey y agar para estafilococos. También se realizó el recuento en agar nutritivo.

Aplicación del diseño experimental:



Número de tratamientos:

| Muestra (10 g.) | Grupo | |
|------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| | Experimental : 90 ml. de <i>Aloysia citridora</i> | Control: 90 ml. de agua destilada estéril |
| Carne de res | T1 | T4 |
| Carne de pollo | T2 | T5 |
| Carne de pescado | T3 | T6 |

2.3.3. Aislamiento primario e identificación bioquímica de bacterias alteradoras de carne.

El aislamiento de bacterias se realizó en agar Mac Conkey, para determinar la presencia de enterobacterias. La siembra fue por estría y las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. La identificación bioquímica se realizó en agar TSI, LIA, Citrato, Indol.

Se aisló *Staphylococcus aureus* en agar Baird Parker. La siembra fue por estría y las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. La identificación bioquímica se realizó a través de la prueba de la catalasa y coagulasa.

2.3.4. Recuento de bacterias.

De la muestra original (carne de res, pollo y pescado) se realizaron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Se utilizó agar Miuller Hinton y la siembra fue por incorporación de 1 ml. de muestra.

2.3.5. Determinación de la actividad bactericida del extracto etanólico de *Aloysia citridora*.

La actividad bactericida se determinó en función a la inhibición o disminución del crecimiento bacteriano en agar Mac Conkey y al número de unidades formadoras de colonia por mililitro en el recuento bacteriano en las placa de agar nutritivo.

2.3.6. Medición de la actividad antibacteriana:

Después de 24 a 48h de incubación de las placas Petri, se midió los halos de inhibición. Las zonas claras que se formaron alrededor de los discos, se

consideraron halos de inhibición, los cuales fueron medidos, registrando para cada uno el diámetro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. (Azuero, et al., 2016).

Tabla 1. Grados de inhibición del crecimiento bacteriano.

| Grados de inhibición | Rangos de diámetros |
|----------------------------------|----------------------------|
| Ninguna actividad antimicrobiana | (-) Menor 6 mm. |
| Poca actividad antimicrobiana | (1+) 6-8 mm. |
| Mediana actividad antimicrobiana | (2+) 8-10 mm. |
| Alta actividad antimicrobiana | (3+) 10-14 mm. |

(Azuero, et al., 2016).

III. RESULTADOS

Tabla 2.

Presencia y recuento de bacterias en carne fresca de vacuno en grupo control y experimental

| Grupo | Presencia(+)/Ausencia(-) | | | | | | Recuento(ufc/ml) | | | |
|--------------|--------------------------|-----|-----|------------------------------|-----|-----|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | Bacterias mesófilas viables | | | |
| | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | Promedio |
| Control | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | 98x10 ¹ (980) | 9.88x10 ² (988) | 94x10 ¹ (940) | 96.9x10 ¹ (969) |
| Experimental | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 0 | 0 | 0 | 0 |

La tabla 2, muestra el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* en el grupo control (+) pero no en el grupo experimental (-). El grupo control presenta en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 96.9x10¹ UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables, para la muestra carne fresca de vacuno.

Tabla 3.

Presencia y recuento de bacterias en carne fresca de pollo en grupo control y experimental

| Grupo | Presencia(+)/Ausencia(-) | | | | | | Recuento(ufc/ml) | | | |
|--------------|--------------------------|-----|-----|------------------------------|-----|-----|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | Bacterias mesófilas viables | | | |
| | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | Promedio |
| Control | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | 1.23x10 ³ (1230) | 1.22x10 ³ (1220) | 1.2x10 ³ (1200) | 1.216x10 ³ (1216) |
| Experimental | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 0 | 0 | 0 | 0 |

La tabla 3, se observa el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* en el grupo control (+) pero no en el grupo experimental (-). El grupo control presenta en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 1.216x10³ UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables, para la muestra carne fresca de pollo.

Tabla 4.

Presencia y recuento de bacterias en carne fresca de pescado en grupo control y experimental

| Grupo | Presencia(+)/Ausencia(-) | | | | | | Recuento(ufc/ml) | | | |
|--------------|--------------------------|-----|-----|------------------------------|-----|-----|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | Bacterias mesófilas viables | | | |
| | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | R1 | R2 | R3 | Promedio |
| Control | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | 68x10 ¹ (680) | 66x10 ¹ (660) | 68x10 ¹ (680) | 67.3x10 ¹ (673) |
| Experimental | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 0 | 0 | 1x10 ¹ (10) | 0,33x10 ¹ (3.3) |

En la tabla 4, se evidencia el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Staphylococcus aureus* en el grupo control (+) pero no en el grupo experimental (-). El grupo control presenta en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 67.3x10¹ UFC/ml., mientras que en el grupo experimental se presenta un crecimiento de bacterias mesófilas viables de 0.33x10¹ UFC/ml, para la muestra carne fresca de pescado.

Tabla 5.

Diámetro de halo de inhibición (mm) en placas con Escherichia coli y Staphylococcus aureus

| Microorganismo | Diámetro de Halo de Inhibición (mm) | | | PROMEDIO |
|------------------------------|-------------------------------------|------|------|----------|
| | R1 | R2 | R3 | |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | 0 | 0 | 0 mm |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 12 | 10.5 | 13.5 | 12 mm |

En la tabla 5, se muestra que el halo de inhibición promedio, de crecimiento de *Escherichia Coli* es 0mm y de *Staphylococcus aureus* es 12mm,

IV. DISCUSIÓN

La carne fresca es reconocida como un producto alimenticio altamente perecedero debido a su composición biológica. El crecimiento microbiano y el metabolismo muscular dependen de las condiciones de los canales al momento del sacrificio, del tipo de envasado utilizado y las condiciones de almacenamiento. Las tecnologías de preservación de la carne tratan mayormente de inhibir el deterioro microbiano (Buitria, 2017).

Los alimentos constituyen un medio idóneo para las bacterias porque les proveen de nutrientes y humedad y hacen que los alimentos se alteren y no sean adecuados para el consumo, causan la putrefacción de carnes y pescados. Son las denominadas bacterias alterantes, que estropean el alimento y limitan, con la ayuda de reacciones fisicoquímicas, la vida útil del alimento.

Existen bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) que son alterantes de los alimentos y en especial de la carne fresca (carne de pollo, carne de vacuno, carne de pescado), por ello se recurre a la búsqueda de sustancias antimicrobianas para alargar el tiempo de vida útil del alimento.

Las plantas y sus propiedades antimicrobianas, últimamente han recibido mucha atención de los científicos, ya que presentan actividad antibacteriana capaz de combatir agentes patógenos como *Staphylococcus aureus* (Moromi, et al., 2009).

Se han realizado diversos estudios de los componentes de la planta encontrando metabolitos secundarios que han dado respuesta positiva en el control de los diferentes microorganismos; lo que permite tener un conocimiento sobre el potencial que tiene el material vegetal como agente antimicrobiano (Londañó, et al. 2016), esta afirmación se corrobora en la presente investigación donde el extracto etánolico de *Aloysia citridora* tiene actividad bactericida en las bacterias alteradoras de carne fresca como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, observándose ausencia de crecimiento de estas bacterias en el grupo experimental.

Los metabolitos secundarios de las plantas pertenecen a tres grupos, según sus orígenes biosintéticos: 1) Los terpenoides, entre ellos se encuentran los aceites esenciales 2) Los compuestos fenólicos y sus derivados donde destacan los flavonoides, 3) Los componentes

nitrogenados o alcalinos. Todos estos grupos contienen metabolitos con propiedades antimicrobianas.

Las fitoalexinas son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides, de bajo peso molecular que se sintetizan en los vegetales ante una infección microbiana. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos que se acumulan en algunas plantas en altas concentraciones, después de infecciones bacterianas, se sintetizan muy rápido en pocas horas después del ataque microbiano, son tóxicas a un espectro amplio de bacterias patógenas. En general las fitoalexinas no son potentes antibióticos y son de baja especificidad, muchas son biocidas y otras tienen efectos bioestáticos.

De forma general, los metabolitos secundarios se agrupan en terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides y glucósidos, todos estos se sintetizan a partir de diferentes rutas, es decir en la síntesis de terpenos, participan la ruta del ácido mevalónico y la ruta de la deoxixilulosa fosfato. Por su parte la ruta del ácido shikímico y del ácido malónico están involucrados en la síntesis de compuestos fenólicos o polifenoles mientras que los alcaloides, son sintetizados a partir de una red metabólica más compleja que involucra a las rutas del mevalonato, ácido shikímico, ácido malónico y mezclas de estas. Dentro de los compuestos fenólicos o polifenoles, las cumarinas son probablemente algunos de los productos naturales más abundantes (Venancio et al., 2021).

Al igual que a la mayoría de los metabolitos secundarios, a las cumarinas se les atribuye un papel como parte del sistema de defensa de las plantas, ya que muchas de estas se ha demostrado que poseen actividad bactericida (Venancio et al., 2021).

En la investigación de Modak, et al. (2001), sobre actividad antibacteriana de flavonoides aislados de *Heliotropium sinuatum*, se encontró que presentan actividad antibacteriana en *Escherichia coli* K-12, se logró cuantificar la actividad antibacteriana de los compuestos aislados de la resina.

Los extractos etanólicos de plantas medicinales contienen metabolitos secundarios que le confiere propiedades antimicrobianas para bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) y bacterias aerobias mesófilas viables, debido a ello, en la presente investigación se encontró crecimiento de las bacterias antes

mencionadas en el grupo control a diferencia de la ausencia de crecimiento microbiano en el grupo experimental (carne de pollo, carne de vacuno y carne de pescado) que fue tratado con extracto etanólico de *Aloysia citridora* .

El recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en la carne fresca de vacuno, fue de 96.9×10^1 UFC/ml. para el grupo control, mientras que en el grupo experimental no se presentó crecimiento de bacterias mesófilas viables. En la carne fresca de pollo, el recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en el grupo control fue de 1.216×10^3 UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presentó crecimiento de bacterias mesófilas viables. A diferencia de la muestra de carne fresca de pescado, donde existió crecimiento tanto en el grupo control como en el grupo experimental, presentando en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 67.3×10^1 UFC/ml. y 0.33×10^1 UFC/ml, respectivamente, esto se puede justificar al alto contenido de microorganismos en la carne de pescado por ser un alimento altamente perecedero y por el contenido de metabolitos secundarios de la planta que depende las etapas de desarrollo y procesos fisiológicos de la planta.

En el estudio fitoquímico del aceite esencial de *Aloysia aloysioides* y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica, realizado por Huanca (2021), se encontró que existe actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 19 mm. mientras que para *Escherichia coli* no se encontró halo de inhibición, resultados similares se encontraron en la presente investigación pero con extractos etanólicos de *Aloysia citridora*, donde el halo de inhibición promedio, de crecimiento *Staphylococcus aureus* fue de 12mm, lo que demuestra la propiedad antibacteriana de *Aloysia citridora* para *Staphylococcus aureus* pero no para *Escherichia coli* que no presentó halo de inhibición, probablemente porque la concentración bacteriana fue muy alta en relación a la concentración de extracto etanólico utilizado en el disco de antibiograma o por que la planta utilizada no había completado sus etapas de desarrollo.

V. CONCLUSIONES

- El extracto etánolico de *Aloysia citridora* tiene actividad bactericida en las bacterias alteradoras de carne fresca como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, observándose ausencia de crecimiento en el grupo experimental.
- El recuento de bacterias aerobias mesófilas viables es de 96.9×10^1 UFC/ml. para el grupo control, mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables, en la muestra carne fresca de vacuno.
- En la carne fresca de pollo, el recuento de bacterias aerobias mesófilas viables en el grupo control es de 1.216×10^3 UFC/ml., mientras que en el grupo experimental no se presenta crecimiento de bacterias mesófilas viables.
- En la muestra de carne fresca de pescado, existe crecimiento tanto en el grupo control como en el grupo experimental, presentando en promedio un recuento de bacterias aerobias mesófilas viables de 67.3×10^1 UFC/ml. y 0.33×10^1 UFC/ml, respectivamente.
- El halo de inhibición promedio, de crecimiento *Staphylococcus aureus* es 12mm, lo que demuestra la propiedad antibacteriana de *Aloysia citridora* para *Staphylococcus aureus* pero no para *Escherichia coli* que no presentó halo de inhibición.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azuero A., Jaramillo C., San Martín, D., D'Armas H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en el Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI* 9(20),11-18.

Bussmann R, Douglas S., Pérez F., Diaz D. Actividad antibacteriana de plantas medicinales del norte del Perú. (2008). Tesis de título profesional. Iquitos, Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. p.119.

Buitria L. (2017). Vida útil de la carne: Influencia del envasado y sistema de producción. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/7130/1/LUZARDO-BUIATRIA-2017.pdf>

Córdova I., Aragón O., Díaz L., Franco S., Serafín N., Pozos A., Soto T., Martínez F., Isiordia M. (2016). Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología* 48(3):217-221.

Faustman C., Sun Q., Mancini R. y Suman S. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science* 86:86-94.

Freixa B., Vila R.,Vargas L.,Lozano N., Adzet T., Caniguera S. (1998). Screening for antifungal activity of nineteen *Latin American Plants*. *Phytotherapy Research*. Vol.12 (6). P.427.

Greer G.(1988). Bacteria and meat quality. 31 Conferencia Anual del Instituto Canadiense de Ciencia y Tecnología de los alimentos, Winnipeg, Canadá.

Heredia N., Dávila J., Solís S., García S. (2014). Productos cárnicos: Principales patógenos y estrategias no térmicas de control. *Nacameh* 8:S20 – S24.

Huanca C. (2021). Estudio fitoquímico del aceite esencial de la *Aloysia aloysioides* Loes & Moldenkey y su evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica. [Tesis

de pregrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química. Escuela Profesional de Química]. Repositorio Institucional Cybertesis UNMSM.

Londañó D., López D. (2016). Determinación de la actividad bactericida y fungicida in vitro de *Tithonia diversifolia* (Helmsl) A. Gray. Trabajo de grado para optar el título de maestría en ciencias naturales y matemáticas – Biología. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.

Mathews, J. (2007). Actividad bactericida y fungicida de extractos crudos de cuatro especies forestales. Tesis para optar el título de Ingeniero en Recursos Naturales Renovables, Mención Forestales. Universidad Agraria de la Selva.

Marshal D.L., Bal´m M.F. (2001). Microbiology of meats. En Hui, Y.H., Nip W.K., Roger R.W. y Young O.A. Eds., Meat Science and Applications. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. EUA.

Modak B., Arrieta A., Torres R, Urzua A. (2002). Actividad antibacteriana de Flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: *Efecto del tipo de estructura*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química V 7 N1*. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442002000100005

Moromi H., Martínez E., Donal P. (2009). Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Odontol Sanmarquina 12 (1): 25-28*

Nychas G.J., Dillon V.M., Board R.G. (1988). Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products. *Biotechnology and Applied Biochemistry 10:203-231*.

Ody, P. (2000). *The complete Guide Medicinal Herbal*, Pub. Dorling Kinderley.

Pimentel E., Castillo D., Quintana M., Maurtua D., Villegas L., Díaz C. (2015), Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias

andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatol Herediana* 25(3),268-267.

Ramírez L., Marín D. (2009). Metodologías para evaluar invitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Science et Technia. Año XV N°42. pp.* 263-268.

Ramírez M., Vargas R., Torres B., Torrescano G., Sánchez A. (2018). Extractos de hojas de plantas para conservar la calidad de la carne y los productos cárnicos frescos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Vol. XX, Número 3, pp. 155-164.*
<http://biotecnia.unison.mx>

Rodríguez R., Aparicio L. (2018). Aspectos de ecología microbiana en carnes y productos frescos y refrigerados. Aplicaciones y relevancia. *ITEPA, Carnes y Alimentos, Año 19 N°63, pp.16-18.*

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

Saucier L. (2016). Microbial spoilage, quality and safety within the context of meat sustainability. *Meat Science* 120: 78-84

Sawai J., Maekawa Y., Y.T., K.H. (2002). Indirect conductimetric assay of antibacterial activities. *Journal of industrial Microbiology and Technology. Vol.29 p.296.*

Van Der Marel G.M., Van Logtestijn J.G., Mossel D.A.A. (1988). Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in-plant lactic acid. decontamination. *International Journal of Food Microbiology* 6 (1):31-42

Venancio C, Pérez C. Ibarra E.(2021). Cumarinas: Metabolitos secundarios de amplia actividad en plantas. *Portal Comunicación Veracruzana.*
<https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1311-cumarinas-metabolitos-secundarios-de-amplia-actividad-en-plantas>

Warnants N., Van M., Boucqué C. (1996). Incorporación of dietary polyunsaturated fatty acids in pork tissues and its implications for the quality of the end products. *Meat Science* 44: 125-144.

ANEXO



Foto1. *Aloysia citridora* "cedrón"



Foto2. Lavado de hojas de cedrón



Foto 3. Secado de hojas de cedrón



Foto 4. Molido de hojas de cedrón



Foto 5. Preparación de medios de cultivo



Foto 6. Obtención de extractos etanólicos



Foto 7. Muestras de carne: Pescado, pollo, vacuno



Foto 8. Carne pesada para diluciones

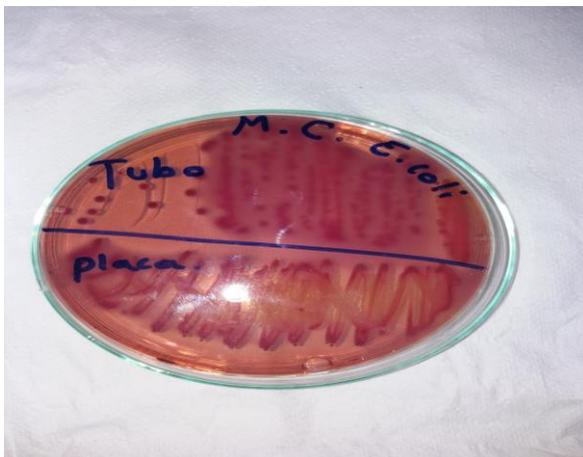


Foto 9. Aislamiento de *Escherichia coli*



Foto 10. Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

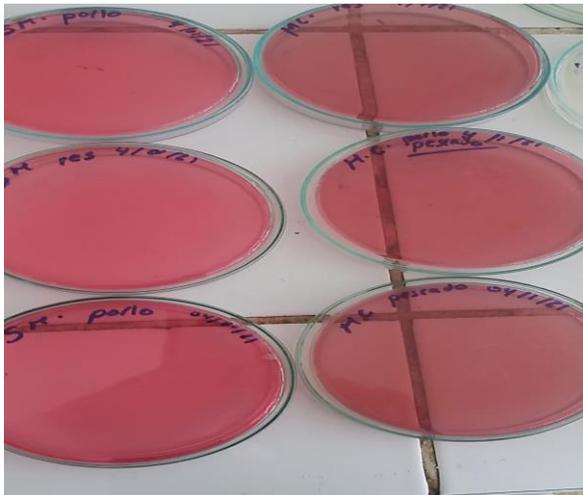


Foto 11. Tratamiento experimental. Agar Mac Conkey

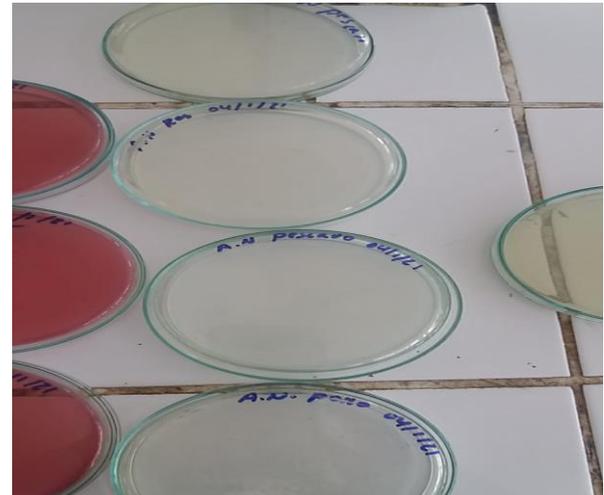


Foto 12. Tratamiento experimental. Agar Miuller Hinton



Foto 13. Tratamiento control. Agar Miuller Hinton



Foto 14. Tratamiento control. Agar Mac Conkey

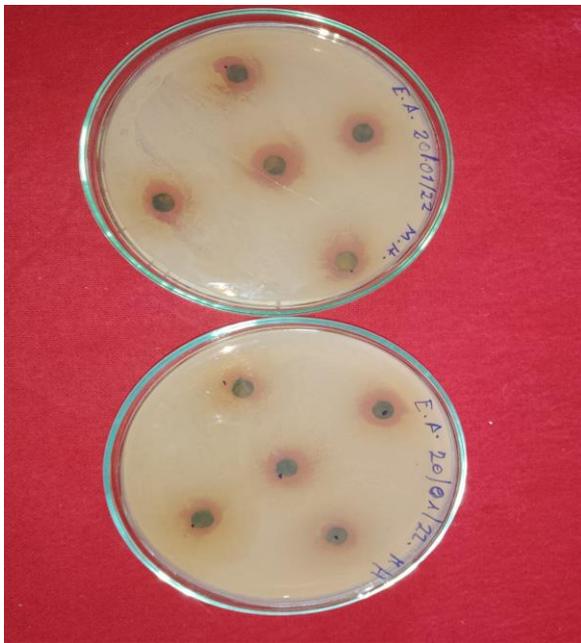


Foto 15. Presencia de halo de inhibición

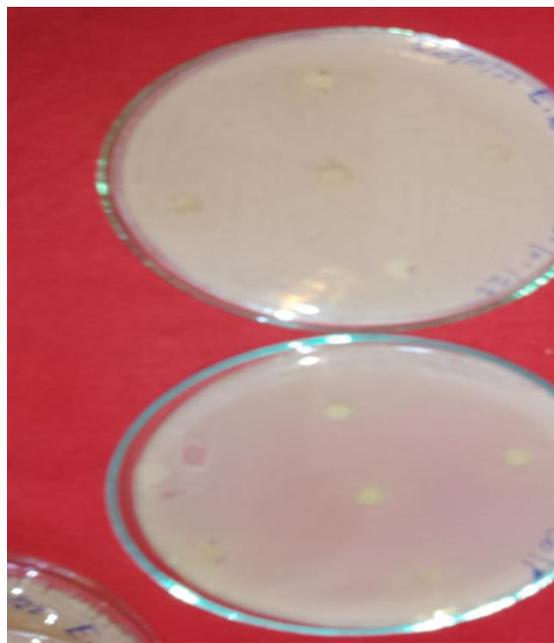


Foto 14. Presencia de halo de inhibición