

<https://doi.org/10.23913/ciba.v9i17.97>

Artículos Científicos

## Estudio in vitro del efecto del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (AECC) en el control de *Listeria* *monocytogenes* NCTC 11994

*Study in vitro of essential oil of Cymbopogon citratus (EOCC) on Listeria*  
*monocytogenes NCTC 11994 control*

*Estudo in vitro do efeito do óleo essencial de Cymbopogon citratus (AECC)*  
*no controle de Listeria monocytogenes NCTC 11994*

Minor-Pérez, H.

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, División de Ingeniería Química y  
Bioquímica, México

[hminorperez@yahoo.com.mx](mailto:hminorperez@yahoo.com.mx)

<https://orcid.org/0000-0003-1279-0081>

### Resumen

*Listeria monocytogenes* tiene resistencia a diversos ambientes adversos. En condiciones de refrigeración puede sobrevivir periodos largos de tiempo. Además, el consumo de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* puede causar listeriosis. Las bacterias del género *Listeria* spp., son bacilos anaerobios facultativos que no forman esporas, no contienen cápsula y son ubicuas, es decir, están ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Algunos estudios indican que expresan mecanismos de resistencia fisiológica, e.g. al estrés térmico y ácido. Para el control de *Listeria monocytogenes* pueden usarse sustancias como el aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, que tiene un contenido de citral > 70%. El citral es un monoterpeno compuesto de dos isómeros el neral y el geranial. Este compuesto tiene actividad antimicrobiana sobre *Enterobacter zakazakii* y *Echerichia coli*. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones (PICs, PBCs, MICs y MBCs) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 en un sistema modelo. Se realizó un análisis estadístico, con una comparación múltiple de medias de Duncan (SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA). Los



resultados del estudio a los tiempos de 1 min y 60 min mostraron en algunos tratamientos una inhibición significativa ( $P > 0.05$ ) de entre 45%-50% para las concentraciones de 10,000 mg/L, 2000 mg/L y 500 mg/L. Sin embargo, en algunos tratamientos se observó crecimiento significativo, específicamente en los tratamientos del AECC de 50 mg/L y 100 mg/L. Los resultados experimentales se ajustaron a un modelo lineal para ambos sistemas de estudio, el primero relacionado con la Inhibición (%) y el segundo con el Crecimiento (%) de la bacteria control (*Listeria monocytogenes* NCTC 11994). En este estudio se observó que a una concentración del AECC de 10000 mg/L se pudo realizar el control significativo del crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, aceite esencial de citral, inhibición/crecimiento

## Abstract

*Listeria monocytogenes* has great resistance to adverse environments. Under refrigeration conditions it can survive long periods of time. In addition, the consumption of foods contaminated with *Listeria monocytogenes* can cause listeriosis. The genus *Listeria* spp. are facultative anaerobic bacilli that do not form spores, do not contain a capsule and are ubiquitous, that is, they are widely distributed in the environment. Some studies mention mechanisms of physiological resistance, e.g. to thermal and acid stress. The control of this pathogenic microorganism can be carried out with natural preservatives such as the essential oil of *Cymbopogon citratus*; which has a citral content  $> 70\%$ . Citral is a monoterpene composed of two isomers, neral and geranial. It has antimicrobial activity against *Enterobacter zakazakii* and *Echerichia coli*. In this study was evaluated the effect of the concentration (PICs, PBCs, MICs and MBCs) of the essential oil of *Cymbopogon citratus* on control of *Listeria monocytogenes* NCTC11994 in a model system. A statistical analysis was performed, with a multiple comparison test of Duncan means (SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA). Inhibition (%) and growth (%) was evaluated during study time: 1 and 60 min showed. In some treatments its were significant effect ( $P > 0.05$ ) on variable respons. It was inhibition between 45-50% for concentrations of EOCC, 10,000 mg/L , 2000 mg/L and 500 mg/L. Significant growth was observed, specifically in the treatments of 50 mg/L and 100 mg/L. The experimental results were adjusted to a linear model for both study systems, the first related to inhibition (%) and the second to the growth (%) of *Listeria*

*monocytogenes* NCTC 11994. In this study it was observed at EOCC concentration of 10000 mg/L a significant control of the growth of *Listeria monocytogenes*,

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, essential oil of *Cymbopogon citratus*, inhibition/growth.

## Resumo

*Listeria monocytogenes* tem resistência a vários ambientes adversos. Em condições de refrigeração, pode sobreviver a longos períodos de tempo. Além disso, a ingestão de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes* pode causar listeriose. As bactérias do gênero *Listeria* spp. são bacilos anaeróbicos facultativos que não formam esporos, não contêm cápsulas e são onipresentes, ou seja, estão amplamente distribuídos no ambiente. Alguns estudos indicam que eles expressam mecanismos de resistência fisiológica, p. ao estresse térmico e ácido. Para o controle de *Listeria monocytogenes*, podem ser utilizadas substâncias como o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, com conteúdo citral > 70%. Citral é um monoterpeno composto por dois isômeros, o neral e o geranial. Este composto possui atividade antimicrobiana em *Enterobacter zakazakii* e *Echerichia coli*. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações (PICs, PBCs, MICs e MBCs) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* no controle de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 em um sistema modelo. Foi realizada análise estatística, com uma comparação múltipla das médias de Duncan (SAS System, Windows™ Versão 6.12, EUA). Os resultados do estudo em tempos de 1 e 60 minutos mostraram em alguns tratamentos uma inibição significativa ( $P > 0,05$ ) entre 45% -50% para as concentrações de 10.000 mg / L, 2000 mg / L e 500 mg / L. Em alguns tratamentos, foi observado um crescimento significativo, especificamente nos tratamentos AECC de 50 mg / L e 100 mg / L. Os resultados experimentais foram ajustados para um modelo linear para ambos os sistemas de estudo, o primeiro relacionado à Inibição (%) e o segundo relacionado ao Crescimento (%) das bactérias controle (*Listeria monocytogenes* NCTC 11994). Neste estudo, observou-se que a uma concentração de 10.000 mg / L no AECC, um controle significativo do crescimento de *Listeria monocytogenes* poderia ser realizado,

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, óleo essencial citral, inibição / crescimento.

Fecha recepción: Agosto 2019

Fecha aceptación: Noviembre 2019

## Introducción

Actualmente la industria de alimentos tiene como uno de sus objetivos principales elaborar productos con mejores características sensoriales, que tengan una mayor proporción de componentes naturales y con una alta calidad nutricional. Un aspecto importante en el diseño y desarrollo de alimentos son las estrategias de conservación para obtener una mayor vida útil y que el alimento sea inocuo. Este aspecto ha sido poco explorado en los productos que requieren de refrigeración y aquellos considerados listos para consumirse (LPC) [ICMSF, 2011; Jay, 2005].

En los últimos años se ha reportado contaminación de alimentos por una gran variedad de microorganismos que pueden dañar la salud de los humanos, *e.g.* de acuerdo con el informe sobre tendencia de brotes de origen alimentario los microorganismos comunes son: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Yersinia*. Los principales alimentos implicados son el huevo, alimentos mezclados, productos pesqueros y congelados [EFSA, 2007; Mortimore].

Las bacterias anteriores son de importancia en lo que se refiere a calidad sanitaria, sin embargo *Listeria monocytogenes*, ha adquirido una mayor relevancia porque causa listeriosis, con una tasa de mortalidad entre 20% y 30% de los pacientes hospitalizados (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2000). Se manifiesta en adultos, especialmente en personas inmunodeprimidas, incluye efectos como la septicemia, meningitis (o meningoencefalitis), encefalitis e infecciones intrauterinas en mujeres embarazadas, las cuales podrían resultar en abortos espontáneos [Marzocca, Marucci, Siga, y Alvarez, 2004; Torres-Vitela y Castillo-Ayala, 2010].

La bacteria se encuentra extendida en el medio ambiente y es particularmente resistente a los efectos del congelado, secado, calentamiento, entre otros. Es resistente a pH bajo, a elevada concentración de NaCl y se considera una bacteria psicrótrofa [Lou y Yousef. 1996].

Con respecto a los orígenes de los brotes de listeriosis, algunos reportes indican que algunos alimentos específicos son más peligrosos que otros, considerándose de alto riesgo los denominados listos para consumir, conservados por un período de tiempo prolongado a

temperaturas de refrigeración, congelación y aquellos que poseen una población elevada de *Listeria monocytogenes*, mayor a 100 UFC/g o mL [ICMS, 2011].

El control de microorganismos patógenos en los alimentos, puede realizarse con diversas estrategias, como el empleo de sustancias de origen natural, *e.g.* los aceites esenciales de algunos vegetales. Éstos son líquidos aceitosos obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como: flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Algunos son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos [ICMFS, 2011].

Cada aceite esencial tiene propiedades características, generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes. Las estructuras químicas son del tipo alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos) y fenilpropanos. Uno de los aceites esenciales que ha demostrado actividad antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes* es el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (AECC). Éste tiene como principal componente una mezcla de dos aldehídos con la misma fórmula molecular pero diferentes estructuras, citral a o geranial y citral b o neral [Plazas-Tovar, Wolf-Maciel, Ferreira-Pinto, Maciel-Filho y Ramalho-Gomes, 2010]. Este compuesto tiene actividad antimicrobiana sobre *Enterobacter zakazakii* y *Echerichia coli* [Arroyo, Somolinos, Cebrián, Condón y Pagán, 2010; Somolinos, García, Mackey y Pagán, 2010a]. Estos compuestos proporcionan la propiedad de dañar la membrana celular de hongos y bacterias gram positivas o negativas [Paranagama, 1991; Doyle-Beuchat, 2001].

En este estudio se evaluó el efecto de las concentraciones (PICs, PBCs, MICs y MBCs) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC11994 en un sistema modelo. Se pretende generar información sobre la respuesta de la bacteria control a diferentes condiciones ambientales adversas, para posteriormente desarrollar estrategias eficientes de control de *Listeria monocytogenes*, como pueden ser los procesos combinados empleando el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y las bajas temperaturas tanto en sistemas *in vitro* como *in situ*.

## Metodología

### Preparación del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*

El AECC, se adquirió en la empresa “Herbalise and essence oils, S.A. de C.V.” ubicada en Ecatepec de Morelos, Estado de México. Éste se filtró con membranas de acetato de celulosa (0.22  $\mu\text{m}$ , Durapore® Membrane Filters Millipore) para eliminar la flora microbiana contaminante. Posteriormente se prepararon soluciones stock de  $10^6$  mg/L,  $10^5$  mg/L,  $10^4$  mg/L y  $10^3$  mg/L en agua destilada estéril (adicionada de Tween 80 al 1%). Estas soluciones se almacenaron en frascos ámbar a una temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ . Se determinó la densidad de cada solución para calcular los volúmenes a utilizar en las diferentes concentraciones del AECC.

### Cepa microbiana y condiciones de cultivo

*Listeria monocytogenes* NCTC 11994 pertenece a la colección microbiana de la Universidad de Murcia, España. Durante este estudio la cepa se conservó en crioviales a  $-80^\circ\text{C}$ . Ésta se sembró por estría cruzada en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y 1.5% de agar bacteriológico (w/v Bioxon, México). La muestra se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Una colonia de la bacteria control se utilizó para inocular en caldo TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 12 h. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de este pre-cultivo para ser inoculados en 5 mL de TSBYE y la muestra se incubó durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ , para obtener el cultivo de estudio.

### Estudio microbiológico

Un volumen 100  $\mu\text{L}$  del cultivo obtenido previamente se vació en tubos Eppendorf con diferentes volúmenes de una solución de agua estéril + Tween 80 (1%). Se agregó el aceite esencial para obtener las diferentes concentraciones de estudio (0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L, 1000 mg/L, 2000 mg/L, 5000 mg/L y 10000 mg/L). Las muestras se agitaron en un Vortex-Mixer (Cole-Parmer, EUA) durante 1 min. Todos los tratamientos se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  en un baño de temperatura controlada (Polystat Temperature Controller, Cole-Parmer, EUA). A los tiempos de 1 min y 60 min se realizó

una cuenta en placa con la técnica de la gota (Miles y Misra, 1938). Todos los tratamientos se analizaron por duplicado. En estudios previos (no mostrados) se determinaron las diferentes concentraciones inhibitorias: MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) fue definida como la concentración de AECC que mantuvo la población inicial de *Listeria monocytogenes* sin ningún cambio a través del tiempo de incubación. Las PICs (Concentración Parcial Inhibitoria) se definió como la concentración de AECC menor que la MIC que inhibió las poblaciones de *Listeria monocytogenes* en comparación con la muestra control (sin AECC). Las PBCs (Concentración Parcial Bactericida) fue considerada como la concentración de AECC más alta que la MIC donde se presentó una reducción significativa de *Listeria monocytogenes* durante el tiempo de estudio. Las MBCs (Concentración Mínima Bactericida) fue definida como la concentración de AECC en la cual el 99.9% de *Listeria monocytogenes* fue inactivada en las condiciones experimentales evaluadas (Cava y col. 2007).

### **Análisis estadístico**

Los tratamientos se analizaron estadísticamente con una ANOVA y una comparación múltiple de medias con la prueba de Duncan (SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA).

### **Resultados y discusión**

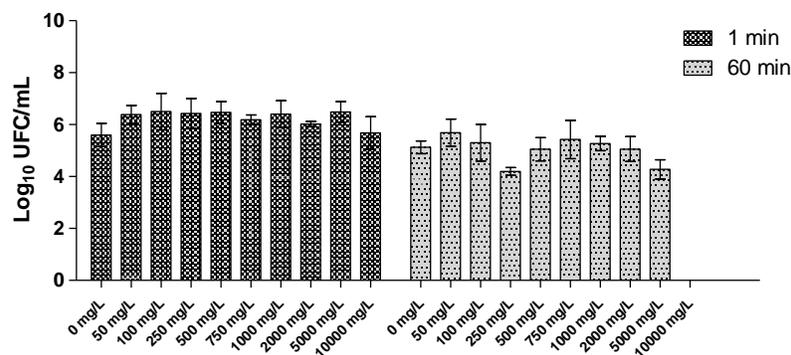
*Listeria monocytogenes* es una bacteria patógena de importancia en los alimentos. Su control es difícil debido a sus características biológicas que le permiten adaptarse a diferentes condiciones ambientales adversas (ICMFS, 2011). En las Figuras 1,2 y 3 se muestran las poblaciones de *Listeria monocytogenes* a los tiempos de 1 min y 60 min. Se observa que en la mayoría de los tratamientos evaluados hubo inhibición. Las Figuras 2 y 3 muestran los resultados de inhibición y crecimiento a los tiempos de 1 min y 60 min. En el primer tiempo en todos los tratamientos se observó la inhibición significativa ( $P > 0.05$ , Tabla 5) mayor de entre 45-50% para las concentraciones de 10,000 mg/L, 2000 mg/L y 500 mg/L. Sin embargo, en algunos tratamientos se observó crecimiento significativo ( $P > 0.05$ , Tabla 5), específicamente en los tratamientos de 50 mg/L y 100 mg/L. Esta condición puede explicarse porque a bajas concentraciones de AECC la bacteria control puede emplear el mismo, como sustrato. Hubo tratamientos, que muestran posiblemente una respuesta fisiológica específica

de *Listeria monocytogenes* a la presencia de AECC, por ejemplo a una concentración de 5000 mg/L se observó el mayor crecimiento (sólo menor que en los tratamientos de 50 mg/L y 100 mg/L). Este comportamiento sugiere que *Listeria monocytogenes* tiene una respuesta fisiológica de defensa a esta concentración de AECC, por lo cual se favorece el crecimiento. Algunos estudios han mostrado la formación de proteínas específicas de protección (e.g. proteínas de estrés térmico) cuando la cepa es sometida a tratamientos térmicos (Lou y Yousef, 1996).

El análisis estadístico (Tablas 1-3) muestra que los resultados experimentales se ajustaron a un modelo lineal para ambos sistemas de estudio, el primero relacionado con la Inhibición (%) y el segundo con el Crecimiento (%) de la bacteria control (*Listeria monocytogenes* NCTC 11994). Los modelos describen la influencia de los factores investigados en forma independiente: tiempo (A) y concentración (B) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (AECC, mg/mL), así como el efecto de la interacción (A\*B). Estos parámetros tuvieron un efecto significativo (Tabla 1-5) sobre la variable respuesta (Log UFC/mL). Los coeficientes de determinación para los modelos lineales en el estudio de inhibición (%) y el de crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* indican que sólo 0.05% y 0.19% respectivamente de la variación en la variable respuesta no puede ser explicado por los modelos desarrollados. Los valores de F para las variables fijas y las interacciones de estudio, fueron útiles para explicar el grado de significancia. Para el estudio de inhibición de *Listeria monocytogenes*, la variable fija que tuvo mayor significancia de acuerdo con la F y la  $Pr > F$ , fue el tiempo posteriormente la concentración de AECC y por último la interacción. En el estudio del crecimiento de *Listeria monocytogenes* se observa un comportamiento similar. En estas condiciones experimentales, para el crecimiento de la cepa control, se observa que el valor de F (para el crecimiento) para el tiempo, es mayor, en comparación con todos los otros parámetros (tanto de inhibición como crecimiento) lo cual indica que los cambios en la variable fija, tiempo (A) tienen el mayor efecto sobre la variable respuesta. Algunos estudios mencionan que *Listeria monocytogenes* puede desarrollar mecanismos de resistencia a los aceites esenciales e incluso utilizarlos como fuente de sustrato bajo condiciones específicas como algunas concentraciones del AECC (PICs o PIBs). En este estudio se observó que a una concentración del AECC de 10000 mg/mL se pudo realizar el control de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Se observó inhibición significativa (Figuras 1 y 2, Tabla 5). Los resultados experimentales *in vitro* y el análisis estadístico proporcionan información sobre el

control significativo de *Listeria monocytogenes* con el AECC. Sin embargo, su aplicación en sistemas alimentarios puede tener algunas limitantes, debido a que un alimento tiene otros componentes que afectan la actividad antimicrobiana del AECC. Es necesario realizar estudios *in situ* con alimentos modelo para determinar las concentraciones MICs que deben emplearse para el control significativo de *Listeria monocytogenes*; así mismo se deben considerar las regulaciones gubernamentales en relación con los aditivos empleados en alimentos.

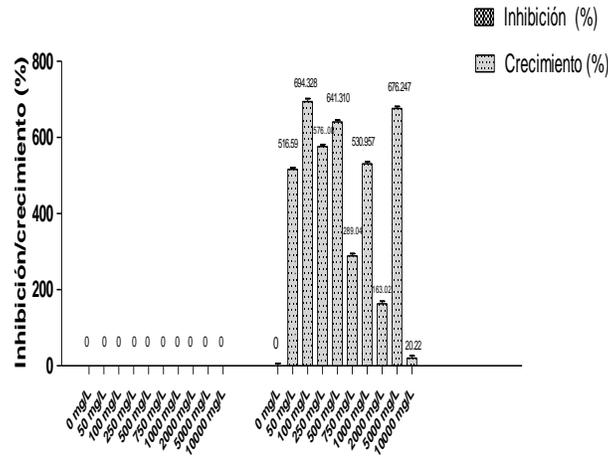
**Figura 1.** (a) Poblaciones de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (mg/L) a los tiempos de 1 in y 60 min y temperatura de 37°C



Fuente: Elaboración propia

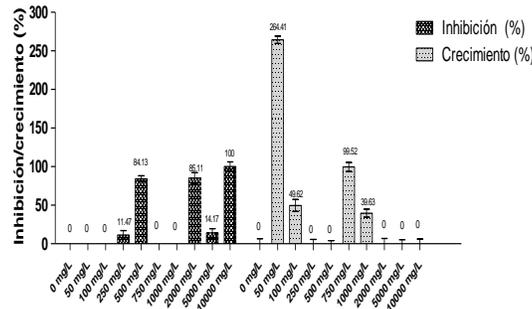
**Figura 2.** Inhibición/crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (mg/L) al tiempo de

1 min



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 3.** Inhibición/crecimiento de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con diferentes concentraciones (mg/L) de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* al tiempo de 60 min.



Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 1.** ANOVA del efecto de las variables fijas: concentración (A) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (AECC) y tiempo (B) sobre la variable de respuesta: inhibición (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	19	40837.671	2149.351	211.18	0.0001
Error	20	203.567	10.177		
Total	39	41041.228			

R-Square= 0.9950

\*Los valores de “Prob > F” menores que 0.050 indican que el modelo estadístico evaluado es significativo

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 2.** ANOVA del efecto de las variables fijas: concentración (A) del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (AECC) y tiempo (B) la variable respuesta: crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	35	2806510.384	147711.072	581.73	0.0001
Error	36	5078.332	253.916		
Total	71	2811588.717			

R-Square= 0.9981

\*Los valores de “Prob > F” menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.** ANOVA para el efecto de los factores: concentración del AECC (mg/L) y tiempo (min) sobre la inhibición/crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
Inhibición (%)		
A-Tiempo	876.42	0.0001
B- Concentración de AECC (mg/L)	176.16	0.0001
A*B – Tiempo*AECC	172.29	0.0001
Crecimiento (%)		
A – Tiempo	5195.35	0.0001
B – Concentración de AECC (mg/L)	350.75	0.0001
A*B – Tiempo*AECC	300.09	0.0001

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 4.** Prueba de Duncan para la comparación del efecto del tiempo sobre la inhibición/crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Inhibición (%)			Crecimiento (%)		
Tiempo (min)	Promedio	Prueba de Duncan*	Tiempo (min)	Promedio	Prueba de Duncan*
60	31.492	A	1	411.390	A
1	1.625	B	60	48.184	B

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una  $\alpha = 0.05$

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 5.** Prueba de Duncan para la comparación del efecto de la concentración del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (AECC) y el tiempo sobre la inhibición/crecimiento (%) de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Inhibición (%)			Crecimiento (%)		
Concentración de AECC (mg/L)	Promedio (%)	Prueba de Duncan*	Concentración de AECC (mg/L)	Promedio (%)	Prueba de Duncan*
10000	50	A	50	390.25	A
2000	45.528	A	100	375.99	A
500	45.408	A	5000	345.31	B
5000	8.905	B	500	330.33	B
250	6.618	B C	1000	292.65	C
0	2.5	C D	250	282.65	C
750	2.250	C D	750	192.14	D
1000	7.875	C D	2000	87.25	E
50	1.5	C D	10000	7.56	F
100	1	D	0	3.75	F

\*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una  $\alpha = 0.05$

Fuente: Elaboración propia.

## Conclusiones

En las condiciones experimentales evaluadas se encontró un efecto significativo sobre la inhibición y el crecimiento de la *Listeria monocytogenes* en algunos tratamientos de concentraciones de aceite esencial de *Cymbopogon citratus*. Esto puede ser explicado debido al efecto de las diferentes variables de estudio: concentración de aceite esencial y tiempo. Además del posible desarrollo de mecanismos de resistencia microbiana por la cepa de estudio.

## Referencias

- Arroyo, C., Somolinos, M., Cebrián, G., Condón, S. & Pagán, R. (2010). Pulsed electric field cause sublethal injuries in the outer membrane of *Escherichia sakazakii* facilitating the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*. 51, 525-531. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02931.x.
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A. & Marín, F. (2007). Antimicrobial Activity of Clove and Cinnamon Essential Oils against *Listeria monocytogenes* in Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection*. 70, 2757-2763. doi: 10.4315/0362-028x-70.12.2757
- Doyle-Beuchat, M. (2001). *Listeria monocytogenes*. En: Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Michael P. Doyle, Larry R. Beuchat, Thomas J. Montville (Eds). (pp. 355-370). Edición de la Lengua Española. Ed. Acribia S A, Zaragoza.
- EFSA. (2007). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods and the related risk for human illness. EFSA (Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)). *EFSA Journal*. Publicación en línea. doi: 10.2805/19118, 599:1-42.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2011). Fish and Seafood Products. Surimi on Minced Fish Products. En: Microorganisms in Food 8. Springer, NY. 121-123
- Jay, M.J., Loessner, M.J. & Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology. USA. Springer. Seventh Edition.
- Lou, Y. & Yousef, A.E. (1996). Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *Journal of Food Protection*. 59, 465-471. doi.org/10.4315/0362-028X-59.5.465
- Marzocca, M.A., Marucci, P.L., Siga, M.G. & Alvarez, E.E. (2004). Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). *Rev. Argent. Microbiol.* [online]. Recuperado de <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-argentina-de-microbiologia/articulo/deteccion-de-listeria-monocytogenes-en-distintos-productos-alimenticios-y-en-muestras-ambientales-de-una-amplia-cadena-de-supermercados-de-la-ciudad-de-bahia-blanca-argentina>

- Miles, A.A. & Misra, SS, Irwin, J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*. 38, 732-49
- Mortimore, S. & Wallace, C. (2013). HACCP. A practical approach. USA. Springer. Third Edition.
- Paranagama, P.A. (1991). Analysis of Sri Lankan Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy. En: Industrial Technology Institute. Senanayake, U.M. Colombo, Sri Lanka (Eds).
- Plazas-Tovar, L., Wolf-Maciel, M., Ferreira-Pinto, G., Maciel-Filho, R. & Ramalho-Gomes, D. (2010). Factorial design applied to concentrate bioactive component of *Cymbopogon citratus* essential oil using short path distillation. *Chemical Engineering Research and Design*. 88, 239-244. doi.org/10.1016/j.cherd.2009.07.018
- Somolinos, M., García, D., Mackey, B. & Pagán, R. (2010a). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*. 108, 1928-1939. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04597.x
- Torres-Vitela, M.R. & Castillo-Ayala, A. (2010). Agentes patógenos transmitidos por alimentos. México. Universidad de Guadalajara.