



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EFECTO COMBINADO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y QUITOSANO PROCEDENTE DE CRUSTÁCEO E INSECTO SOBRE SALMONELLA ENTERICA VAR TYPHIMURIUM

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA: JAZMIN DAYUMARA VITERI ECHEVERRÍA

TUTOR ACADÉMICO: ANTONIO MARTÍNEZ LÓPEZ

COTUTORA: MARÍA DOLORES RODRIGO ALIAGA

DIRECTORA EXPERIMENTAL: MARÍA UBEDA-MANZANARO CRESPO

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, JULIO 2019

EFFECTO COMBINADO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y QUITOSANO PROCEDENTE DE CRUSTÁCEO E INSECTO SOBRE *SALMONELLA ENTERICA* VAR *TYPHIMURIUM*

Viteri Echeverría, Jazmín Dayumara; Martínez López, Antonio¹; Rodrigo Aliaga, María Dolores¹; Ubeda-Manzanaro Crespo, María¹

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos suponen actualmente una problemática de alerta y preocupación. Por otra parte, la calidad y seguridad de los alimentos durante su almacenamiento y distribución está influenciada por la actividad de los microorganismos. Para proteger a los sistemas alimentarios, las industrias están apostando por el uso de tecnologías de conservación emergentes como los ultrasonidos, pulsos de luz, radiación ultravioleta, altas presiones hidrostáticas, solas o combinadas con antimicrobianos naturales. La finalidad de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de quitosano proveniente de crustáceos e insectos en sinergia con altas presiones hidrostáticas sobre *S. Typhimurium*. La valoración del efecto antimicrobiano de los quitosanos se dio a través del estudio del comportamiento cinético del microorganismo, a partir de muestras tratadas y no tratadas previamente por APH (300 MPa – 2 min). Asimismo, se evaluó el daño celular (número de células dañadas) generado por el tratamiento de APH y por los quitosanos sobre *S. Typhimurium*. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las muestras de quitosanos sin combinación con APH después de 6 horas de incubación sólo redujeron la población en aproximadamente 1 ciclo logarítmico, mientras que las muestras de quitosanos combinados con altas presiones hidrostáticas redujeron 4 ciclos logarítmicos de la población de *S. Typhimurium*.

PALABRAS CLAVE: antimicrobianos, altas presiones hidrostáticas, quitosano, insectos, crustáceos, microorganismos, *S. Typhimurium*.

RESUM

Les malalties transmeses per aliments suposen actualment una problemàtica d'alerta i preocupació. D'altra banda, la qualitat i seguretat dels aliments durant el seu emmagatzematge i distribució està influenciada per l'activitat dels microorganismes. Per protegir els sistemes alimentaris, les

¹ Departamento de conservación y seguridad alimentaria. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos

indústries estan apostant per l'ús de tecnologies de conservació emergents com els ultrasons, polsos de llum, radiació ultraviolada, altes pressions hidrostàtiques, soles o combinades amb antimicrobians naturals. La finalitat d'aquest estudi va ser avaluar l'efecte antimicrobià de quitosan provinent de crustacis i insectes en sinergia amb altes pressions hidrostàtiques sobre *S. Typhimurium*. La valoració de l'efecte antimicrobià dels quitosanos es va donar a través de l'estudi del comportament cinètic del microorganisme, a partir de mostres tractades i no tractades prèviament per APH (300 MPa - 2 minuts). Així mateix, es va avaluar el dany cel·lular (nombre de cèl·lules danyades) generat pel tractament de APH i pels quitosanos sobre *S. Typhimurium*. Els resultats obtinguts van permetre determinar que les mostres de quitosanos sense combinació amb APH després de 6 hores d'incubació només van reduir la població en aproximadament 1 cicle logarítmic, mentre que les mostres de quitosanos combinats amb altes pressions hidrostàtiques van reduir 4 cicles logarítmics de la població de *S. Typhimurium*.

PARAULES CLAU: antimicrobians, altes pressions hidrostàtiques, quitosan, insectes, crustacis, microorganismes, *S. Typhimurium*.

ABSTRACT

Foodborne diseases are currently a problem of alertness and concern. On the other hand, the quality and safety of the food during storage and distribution is influenced by the activity of the microorganisms. To protect food systems, industries are betting on the use of emerging conservation technologies such as ultrasound, pulses of light, ultraviolet radiation, high hydrostatic pressures, alone or in combination with natural antimicrobials. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial effect of chitosan from crustaceans and insects in synergy with high hydrostatic pressures on *S. Typhimurium*. The evaluation of the antimicrobial effect of the chitosan was given through the study of the kinetic behavior of the microorganism, from samples treated and not previously treated by APH (300 MPa - 2 min). Likewise, the cell damage (number of damaged cells) generated by the APH treatment and by the chitosan on *S. Typhimurium* was evaluated. The results obtained allowed us to determine that the samples of chitosan without combination with APH after 6 hours of incubation only reduced the population in approximately 1 logarithmic cycle, while the chitosan samples combined with high hydrostatic pressures reduced 4 logarithmic cycles of the population of *S. Typhimurium*.

KEYWORDS: antimicrobials, high hydrostatic pressures, chitosan, insects, crustaceans, microorganisms, *S. Typhimurium*.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan una de las mayores preocupaciones de las autoridades sanitarias. Los patógenos alimentarios son los causantes de diferentes toxiinfecciones por medio de alimentos contaminados que provocan enfermedades y decesos (Fu et al., 2016). Una de las cuatro principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo es la *Salmonella*. Los serotipos de *Salmonella* más significativos de transmisión de animales a humanos son: *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (WHO, 2018).

Por otra parte, la calidad y seguridad de los alimentos durante su almacenamiento y distribución está influenciada por la actividad de los microorganismos. Por lo que merece una atención especial proteger a los sistemas alimentarios de microorganismos patógenos y de descomposición (Fu et al., 2016). Una de las opciones más habituales para proteger a los sistemas alimentarios es la utilización de conservantes artificiales. Sin embargo, las industrias están apostando por el uso de conservantes naturales que inhiban el crecimiento de los microorganismos, un ejemplo de antimicrobiano natural es el quitosano (Ayala, 2015).

El quitosano es un polímero bioactivo, derivado N-desacetilado de la quitina. Los exoesqueletos de crustáceos e insectos están conformados por una gran parte de quitina. Al quitosano se le atribuyen ciertas propiedades como bioadhesividad, inmunoadyuvante, biocompatibilidad, capacidad de absorción, renovación, no alergenicidad, biodegradabilidad, antioxidante, antifúngico, antimicrobiano y anticancerígeno (Mujtaba et al., 2019). Las diferentes propiedades del quitosano han despertado el interés de los investigadores, en los últimos años varios estudios han demostrado que podría ser una alternativa oportuna como antimicrobiano en los sistemas alimentarios. La actividad antibacteriana del quitosano corresponde a su interacción iónica en el interior y la superficie las células bacterianas (Marei et al., 2019). También es sabido que el efecto antimicrobiano del quitosano depende de la procedencia de este (Marqués et al., 2018).

Generalmente, el quitosano se produce a partir del exoesqueleto de mariscos, no obstante, los insectos son una fuente de recursos alternativos escasamente explorados. La preparación de quitosano a partir de insectos es promisorio y una forma nueva de ampliar la fuente del quitosano (Luo et al., 2019).

Otra forma común de proteger a los sistemas alimentarios de microorganismos patógenos y de la descomposición es la aplicación de tratamientos térmicos por calor. En los últimos años, la industria ha indagado sobre tratamientos alternativos a la conservación por calor, de modo que, las nuevas tecnologías de conservación no térmicas han despertado el interés de los investigadores (Morata, 2015). Un ejemplo de nuevas tecnologías de conservación son las altas presiones hidrostáticas.

El principio de las altas presiones hidrostáticas es someter al alimento a presiones muy elevadas (50-1000 MPa) a temperatura ambiente o de refrigeración para disminuir la carga bacteriana (Barriga, 2018). Las ventajas

de esta tecnología engloban al mantenimiento de la calidad original del alimento, debido a que se alteran mínimamente las propiedades nutricionales y sensoriales y a la mejora de la seguridad alimentaria, a causa de que se reduce drásticamente la flora bacteriana (Sánchez, 2018).

En consecuencia a lo mencionado anteriormente, la finalidad de este proyecto fue evaluar y comparar la capacidad antimicrobiana de quitosano proveniente de insectos y crustáceos en sinergia con altas presiones hidrostáticas sobre *Salmonella* Typhimurium.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Antimicrobianos naturales

Los quitosanos empleados fueron comprados en forma de escamas a diferentes empresas. El quitosano procedente de crustáceos a Sigma-Aldrich (Ref. 417963) y el de insectos, más concretamente, de *Tenebrio molitor*, a Mealford, S.A. (Ref. 6101).

Con cada uno de ellos se preparó una disolución stock al 1 % (p/v), para ello se pesó 1 g de cada tipo de quitosano y se disolvió en 100 mL de ácido acético al 1% (v/v). Después, la mezcla fue filtrada con el uso de un filtro de jeringa de PVDF de 0,45 µm de diámetro de poro.

2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los quitosanos sobre *Salmonella* Typhimurium

2.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se prepararon medios control (TSB pH 7,30, Tryptic Soy Broth, Scharlab, Barcelona, España), control ácido (TSB pH 6,25), medio con quitosano de crustáceos (TSB pH 6,25 quitosano crustáceo al 0,15 %) y medio con quitosano de insectos (TSB pH 6,25 quitosano insecto al 0,15 %). Posteriormente, el pH de las muestras se ajustó a 6,25 y se esterilizaron térmicamente. A continuación, se inocularon con *Salmonella* Typhimurium, llegando a una concentración final en el medio de 10⁶ ufc/mL

Posteriormente, cada medio inoculado se incubó en una estufa a 37°C con agitación (400-500 rpm) durante 49 horas.

2.2.2 SIEMBRA

Durante la siembra, se realizaron diluciones seriadas con agua de peptona estéril al 0,1%, se sembraron las diluciones en placas y se llenaron por vertido de medio TSA (Tryptic Soy Agar) (Scharlab, Barcelona, España). Finalmente, se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas.

El efecto antimicrobiano de los quitosanos se evaluó en términos de crecimiento/inactivación, log (N), a lo largo del tiempo de cultivo (ver tabla 1).

TABLA 1. Intervalos de tiempo de siembra para muestras de antimicrobianos naturales

Tiempo	Horas
T0	0
T1	3
T2	6
T3	24
T4	49

2.3 Efecto sinérgico de los quitosanos y altas presiones hidrostáticas sobre *Salmonella Typhimurium*

2.3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Al igual que en apartado anterior, se prepararon medios control (TSB pH 7,30, Tryptic Soy Broth, Scharlab, Barcelona, España), control ácido (TSB pH 6,25), medio con quitosano de crustáceos (TSB pH 6,25 quitosano crustáceo al 0,15 %) y medio con quitosano de insectos (TSB pH 6,25 quitosano insecto al 0,15 %). Posteriormente, el pH de las muestras se ajustó a 6,25 y se esterilizaron térmicamente. A continuación, se inocularon con *Salmonella Typhimurium*, llegando a una concentración final en el medio de 10^7 ufc/mL.

Tras el tratamiento por altas presiones hidrostáticas, cada medio inoculado se incubó en una estufa a 37°C con agitación (400-500 rpm) durante 49 h.

2.3.2 ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

Se realizó el tratamiento por altas presiones hidrostáticas utilizando el equipo de la planta piloto del IATA (EPSI, Bélgica). Se colocaron las muestras en tubos Falcon™ de 50 mL con tapa rosca. Y posteriormente, los tubos fueron cubiertos con bolsas selladas al vacío e introducidos en el equipo. Para este estudio se ha elegido un tratamiento de altas presiones hidrostáticas poco intenso (300 MPa – 2 min), buscando que la concentración microbiana tras el tratamiento sea alta y por lo tanto que sea posible hacer un seguimiento de la concentración de *S. Typhimurium* durante el almacenamiento.

2.3.3 SIEMBRA

Durante la siembra, se realizaron diluciones seriadas con agua de peptona estéril al 0,1%, se sembraron las diluciones en placas y se llenaron por vertido de medio TSA. Finalmente, se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas.

El efecto antimicrobiano de los quitosanos y las altas presiones se evaluó en términos de crecimiento/inactivación log (N), a lo largo del tiempo de cultivo (ver tabla 2).

TABLA 2. Intervalos de tiempo de siembra para muestras de antimicrobianos naturales

Tiempo	Horas
T inicial	Antes de las altas presiones
T0	0
T1	3
T2	6
T3	24
T4	49

2.4 Evaluación del daño celular sobre *S. Typhimurium* expuesta a la aplicación de los quitosanos no combinados y combinados con altas presiones hidrostáticas

Las muestras se sembraron en medio TSA suplementado con 3% (p/v) de NaCl siguiendo el mismo protocolo de siembra mencionado en los apartados anteriores.

El daño celular producido por la aplicación de los quitosanos y la aplicación combinada con altas presiones hidrostáticas fue evaluado a través de la diferencia entre la población viable obtenida del recuento de la siembra en medio TSA normal y la población intacta obtenida del recuento de la siembra en medio TSA + NaCl. La lesión subletal es macroscópicamente detectable por la incapacidad de formar colonias visibles en medios que contienen cloruro de sodio, a los que las células no lesionadas normalmente muestran resistencia (Noriega et al, 2013).

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa STATGRAPHICS® XVII (StatPoint Technologies Inc., USA). Este análisis incluyó la ejecución de un análisis de la varianza univariante (ANOVA) utilizando tres repeticiones de cada tratamiento para comprobar si existen diferencias significativas entre tratamientos para un tiempo fijo, o entre tiempos para un tratamiento en concreto. Además, se complementó con una prueba post hoc de Tukey HSD al 5% para identificar los grupos significativamente diferentes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los quitosanos sobre *Salmonella Typhimurium*

La figura 1 muestra las curvas de crecimiento de *S. Typhimurium* en los controles y las curvas con quitosano. La curva de crecimiento de la muestra Control pH 7,30 evidencia un crecimiento bacteriano exponencial normal,

alcanzando la fase estacionaria a las 6 horas de incubación. De igual modo, la curva de crecimiento de la muestra Control Ácido pH 6,25 evidencia un comportamiento similar al de la muestra Control pH 7,30, por lo que podemos inferir que la acidificación del medio hasta pH 6,25 con ácido acético no afecta *a priori* al crecimiento de las células de este microorganismo.

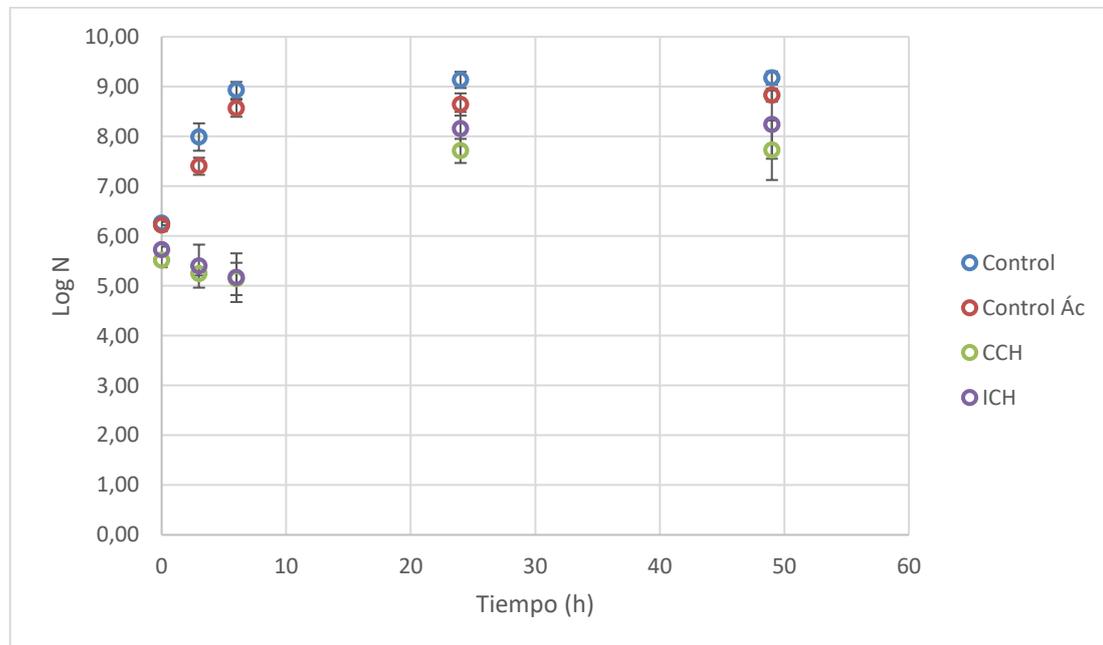


FIGURA 1. Curva de crecimiento/inactivación de *S. Typhimurium* en presencia de los controles y los quitosanos procedentes de crustáceos e insectos

En cuanto al efecto del quitosano, en la figura 1 se puede observar que al principio y hasta las 6 horas se produce una disminución del número de células viables (0,5 ciclos logarítmicos), pero a partir de este momento hay un crecimiento paulatino de células, aunque no llega a los niveles de los controles al cabo de las 49 horas.

Como a las 6 horas de incubación, los controles (Control y Control Ác) alcanzan la fase estacionaria, se eligió este tiempo para realizar un análisis comparativo entre los diferentes tratamientos y así caracterizar las posibles diferencias en el comportamiento de las curvas.

Para determinar las tendencias del crecimiento bacteriano en los diferentes tratamientos (Figura 1), se realizó un ANOVA de las células viables entre los tiempos 0 h y 6 h para cada tratamiento. Tanto en el tratamiento Control como en el Control Ácido, el valor-P fue menor de 0,05, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas en la densidad celular entre los dos tiempos lo cual es bastante obvio al observar la figura 1. En ambos casos los resultados confirman un crecimiento bacteriano exponencial característico.

En el caso de los tratamientos Quitosano de Crustáceos (CCH) y Quitosano de Insectos (ICH), se obtuvo un valor-P mayor que 0,05, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas en la población bacteriana entre el tiempo 0 h y el tiempo 6 h. Este resultado confirma que, durante las 6 primeras horas de incubación en los medios que tienen quitosano, bien de insecto o de crustáceo, se produce un efecto

bacteriostático sobre el microorganismo *S. Typhimurium*. Es importante por tanto hacer notar que el principal efecto que tiene la presencia de quitosano en el medio de incubación es un incremento de la fase de latencia del microorganismo con un máximo de 6 horas. En ambos casos la inactivación celular se produce desde el tiempo 0 h, aunque se observa que a las 24 horas las células se recuperan y no hay cambios significativos de la densidad celular con respecto al tiempo.

El resultado del ANOVA realizado para las células viables a tiempo 6 h de los 4 tratamientos mostró un valor-P menor que 0,05, lo que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; estas diferencias se representan en el resultado de la prueba *post hoc* Tukey HSD (Tabla 3). Con ello se confirma que tanto el Control como el Control ácido no presentan diferencias significativas entre ellos a las 6 horas, pero si son significativamente diferentes de los medios tratados con quitosano, los cuales evidencian una reducción de la población de células viables con respecto a la observada para los controles en ese tiempo, aunque los efectos de ambos quitosanos son similares, ya que no hay diferencias significativas entre ellos.

TABLA 3. Prueba Tukey al 5% de las células viables en tiempo 6 h de los 4 tratamientos

TRATAMIENTOS	GRUPOS HOMOGÉNEOS	
	A	B
CCH	X	
ICH	X	
Control Ác		X
Control		X

Diversos estudios han demostrado que el quitosano inhibe el crecimiento microbiano por la interacción entre su grupo policatiónico y los grupos aniónicos de las membranas celulares microbianas, generando una lisis, que conlleva a la pérdida de compuestos proteicos y otros constituyentes intracelulares (Chien et al., 2016). El quitosano muestra actividad antibacteriana solo en un medio ácido, que generalmente se atribuye a la pobre solubilidad del quitosano a pH alto (Hosseinnejad y Jafari, 2016).

Como se puede observar en la figura 1, existe cierta diferencia aunque no significativa a las 6 horas en la reducción de la población entre la muestra de quitosano de crustáceos y la de insectos. Según Marqués et al (2008), la efectividad de la acción antibacteriana del quitosano está influenciada por diferentes factores, tales como: el peso molecular, el grado de desacetilación, pH, temperatura, microorganismo objetivo y fuentes de quitosano; esto podría explicar esa ligera diferencia de capacidad antimicrobiana de los dos quitosanos en estudio.

3.2 Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre *Salmonella Typhimurium*

Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento de APH elegido en este estudio es suave (300 MPa – 2 min). En consecuencia, tanto en la muestra APH Control pH 7,30 como en la muestra APH Control Ác pH 6,25 no se evidencia apenas muerte sobre las células de *S. Typhimurium* después de aplicar el tratamiento de altas presiones hidrostáticas tal como se aprecia en la figura 2.

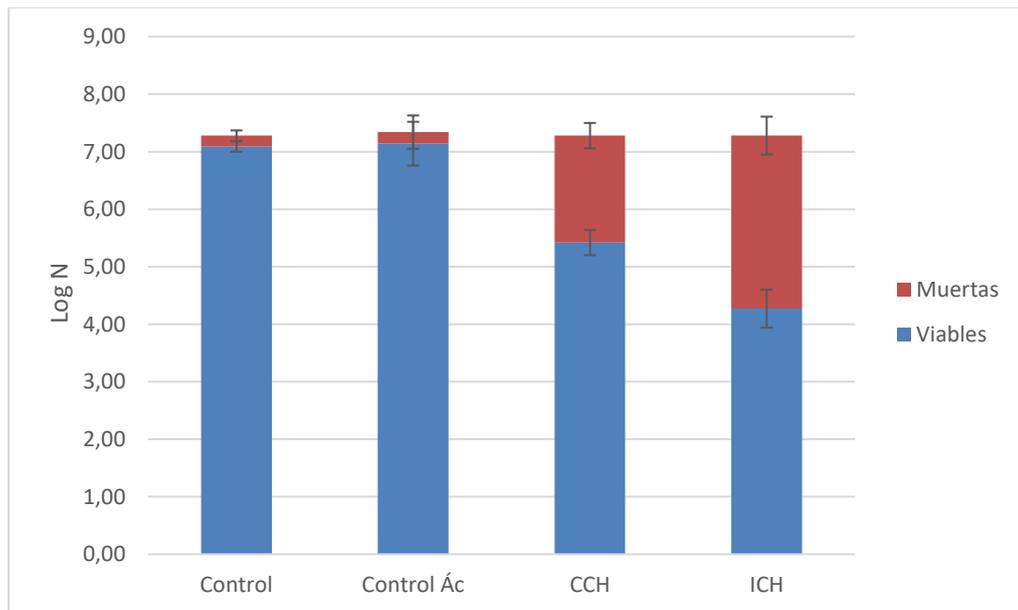


FIGURA 2. Efecto de las APH sobre la inactivación (muertas) de *S. Typhimurium* para cada una de las muestras estudiadas (control, control ácido, quitosano de crustáceos y quitosano de insectos)

3.3 Efecto combinado del quitosano y altas presiones hidrostáticas sobre *Salmonella Typhimurium*

La figura 2 muestra el efecto combinado de las APH y el quitosano tras el tratamiento (barras CCH e ICH). Los resultados muestran una inactivación de 1,86 y 3 ciclos logarítmicos para la muestra conteniendo quitosano de crustáceo e insecto respectivamente. Por lo tanto, se puede inferir que existe un efecto sinérgico entre la aplicación de las APH y el quitosano, ya que los niveles de inactivación alcanzados con el tratamiento combinado son superiores a los alcanzados mediante cada uno de los tratamientos aplicados de manera independiente (ver figura 1).

La figura 3 muestra las curvas de crecimiento de *S. Typhimurium* en los controles y los medios con quitosano después del tratamiento con altas presiones hidrostáticas durante la incubación. La curva de crecimiento de la muestra APH Control pH 7,30 evidencia un crecimiento bacteriano exponencial normal, alcanzando la fase estacionaria a las 6 horas de incubación. De igual modo, la curva de crecimiento de la muestra APH Control Ác pH 6,25 evidencia un comportamiento similar al de la muestra control.

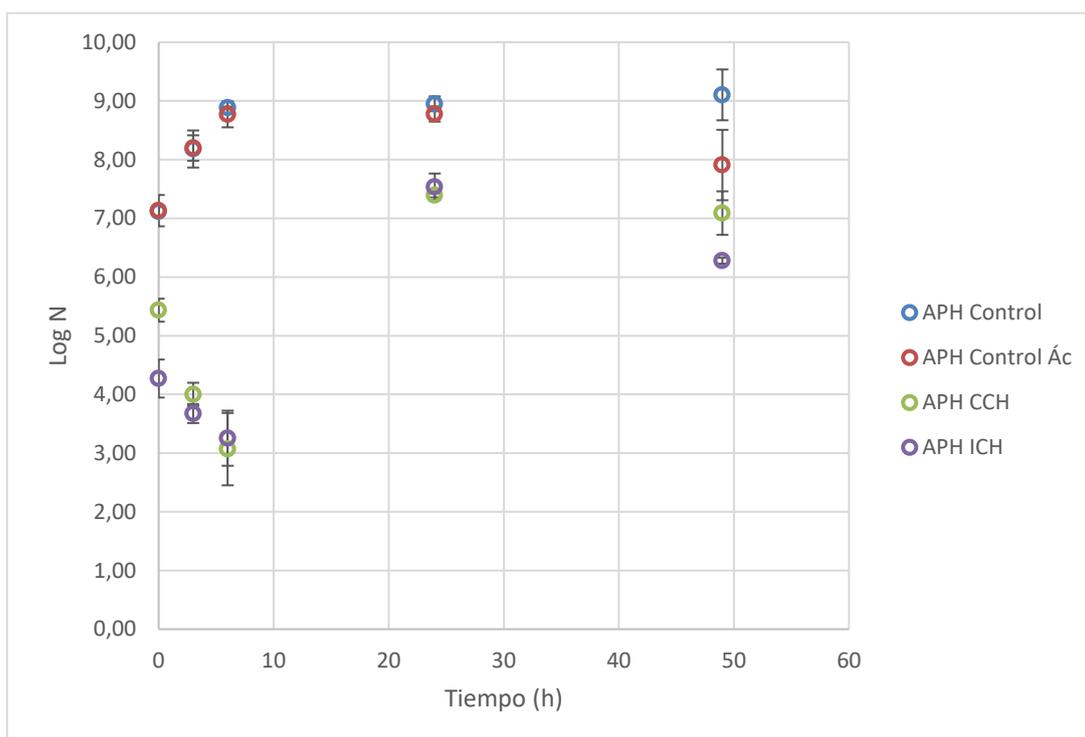


FIGURA 3. Curva de crecimiento/inactivación de *S. Typhimurium* en presencia de los controles y de los quitosanos procedentes de crustáceos e insectos combinados con altas presiones hidrostáticas

El resultado del ANOVA realizado para las células viables para el tiempo 6 h de los 4 tratamientos con APH mostró un valor-P menor que 0,05, lo que nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos; tal como se puede apreciar en el resultado de la prueba *post hoc* Tukey HSD (Tabla 4). Con ello se confirma que tanto el control como el control ácido combinados con altas presiones hidrostáticas no presentan diferencias significativas entre ellos, pero si son diferentes de los medios en los que había quitosano combinado con un tratamiento de altas presiones hidrostáticas, los cuales evidencian una reducción de la población de células viables con respecto a la observada para los controles en ese tiempo, aunque los efectos de ambos quitosanos son similares, ya que no hay diferencias significativas entre ellos.

TABLA 4. Prueba Tukey al 5% de las células viables en tiempo 6 h de los 4 tratamientos con APH

TRATAMIENTOS	GRUPOS HOMOGÉNEOS	
	A	B
APH CCH	X	
APH ICH	X	
APH Control Ác		X
APH Control		X

Como se puede observar en la figura 3, la curva de crecimiento/inactivación de la muestra APH Quitosano de Crustáceos pH 6,25 evidencia que desde el tiempo 0 h al tiempo 6 h se produce un efecto bactericida de 2,4 ciclos logarítmicos sobre *S. Typhimurium*. Si comparamos la curva de crecimiento de la figura 1 con la figura 3, se puede apreciar que en el primer caso (ausencia de altas presiones) sólo se consigue reducciones de 0,5 ciclos logarítmicos claramente inferiores a los de la figura 3, este resultado puede poner en evidencia un efecto sinérgico entre el quitosano y la aplicación de APH. Sin embargo, como ocurría en los tratamientos sin altas presiones hidrostáticas, el cultivo tratado con quitosano de crustáceo combinado con APH se recupera a las 24 horas y no hay cambios significativos de la densidad celular a las 49 horas.

Del mismo modo, en el caso de la muestra APH Quitosano de insectos pH 6,25, la curva de crecimiento/inactivación evidencia que desde el tiempo 0 h hasta el tiempo 6 h se produce un efecto bactericida de 1 ciclo logarítmico sobre *S. Typhimurium*. De manera análoga a lo ocurrido con quitosano de crustáceo, se pone de manifiesto un efecto sinérgico entre el quitosano de insecto y la aplicación de APH cuando se compara este dato con el producido en ausencia de la aplicación de altas presiones (0,5 ciclos logarítmicos). Sin embargo, a las 24 horas de incubación las células se recuperan y a las 49 horas se produce una reducción de la población de 1,26 ciclos logarítmicos, que podría ser explicada por un envejecimiento del cultivo por acumulación de productos de desecho del metabolismo celular, agotamiento de nutrientes, etc.

Para corroborar los resultados anteriores, se realizó un ANOVA de las células viables entre los tiempos 0 h y 6 h para cada uno de los tratamientos con APH. Tanto en el tratamiento APH Control como en el APH Control Ácido, el valor-P fue menor que 0,05, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas de la densidad celular entre los dos tiempos. En ambos casos los resultados confirman un crecimiento bacteriano exponencial normal.

En el caso de los tratamientos APH Quitosano de crustáceos y APH Quitosano de insectos, se obtuvo un valor-P menor que 0,05, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas en la población bacteriana entre el tiempo 0 h y el tiempo 6 h. En ambos casos, estos resultados junto con los resultados obtenidos en la curva de crecimiento (Figura 3) indican que se ha producido un efecto bactericida sobre el microorganismo, ya que existen diferencias significativas en el recuento de células entre los dos tiempos, presentando una bajada representativa de la población, a diferencia de lo observado cuando no se realiza el tratamiento por altas presiones (Figura 1). En este caso el resultado más significativo de la presencia del quitosano, aparte de la reducción de 1 ciclo logarítmico en el número de microorganismos es un aumento de la fase de latencia hasta las 6 horas lo mismo que ocurría en el caso de los tratamientos sin altas presiones hidrostáticas, es decir que el efecto combinado quitosano/altas presiones no parece aumentar la fase de latencia del microorganismo más allá de las 6 horas.

A pesar de que los antimicrobianos naturales han demostrado tener un efecto bacteriostático su potencial es limitado, por lo que algunos autores informaron que su combinación con altas presiones hidrostáticas refuerza su

efecto bactericida (Montiel et al., 2016). Esto se ha podido constatar mediante un efecto sinérgico en nuestro trabajo ya que las muestras de quitosano sin combinación con APH sólo redujeron la población en algo menos de 1 ciclo logarítmico, mientras que las muestras de quitosano combinadas con altas presiones hidrostáticas redujeron 4 ciclos logarítmicos de la población de *S. Typhimurium* durante la fase de tratamiento.

3.4 Evaluación del daño celular sobre *S. Typhimurium* expuesta a la aplicación de los quitosanos no combinados y combinados con altas presiones hidrostáticas

3.4.1 EVALUACIÓN DEL DAÑO CELULAR SOBRE *Salmonella* EXPUESTA A LA APLICACIÓN DE LOS QUITOSANOS NO COMBINADOS CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

En las figuras 4 y 5, se puede observar el número de células intactas, dañadas y muertas de la población de *S. Typhimurium*. En la muestra Control pH 7,30 y en la muestra Control Ác pH 6,25 apenas se produce daño sobre las células.

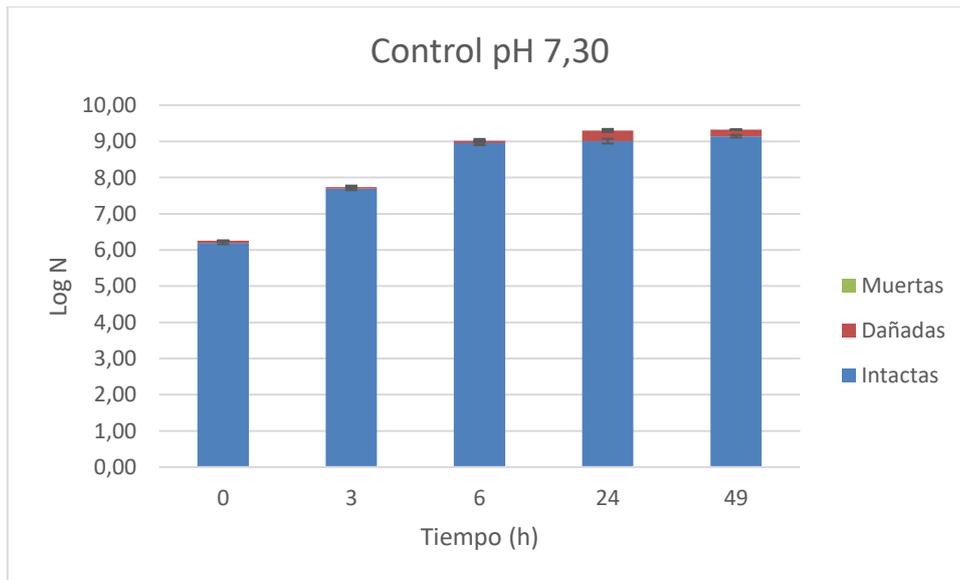


FIGURA 4. Daño celular de *S. Typhimurium* de la muestra control pH 7,30

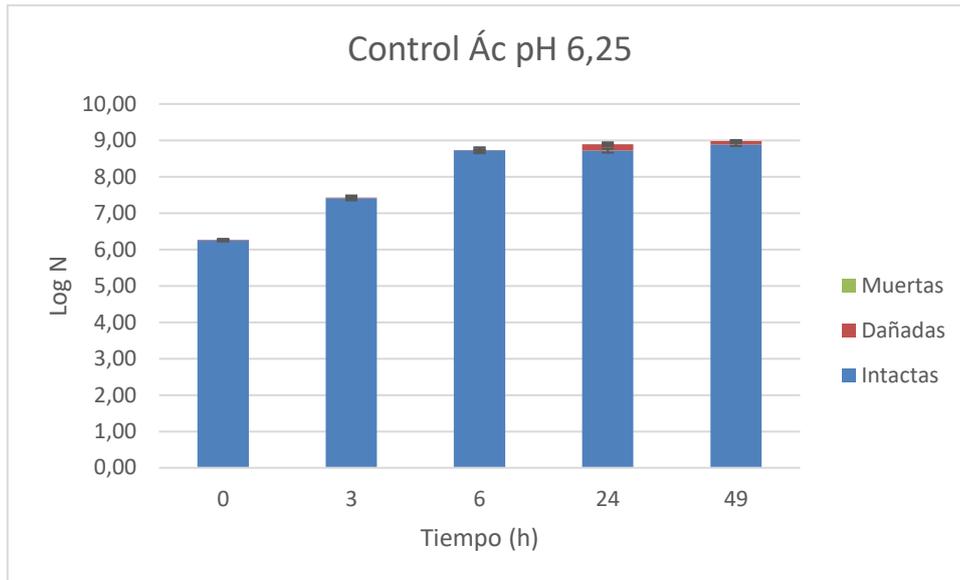


FIGURA 5. Daño celular de *S. Typhimurium* de la muestra control ácido pH 6,25

En las figuras 6 y 7, se puede observar el número de células intactas, dañadas y muertas de la población de *S. Typhimurium* en presencia de quitosano de crustáceo e insecto. El daño producido por el quitosano es menor de 0,2 ciclos logarítmicos, valor prácticamente despreciable teniendo en cuenta la variabilidad del método experimental. Por lo tanto, en ausencia de tratamiento de altas presiones hidrostáticas, la exposición a quitosano no da lugar a células dañadas.

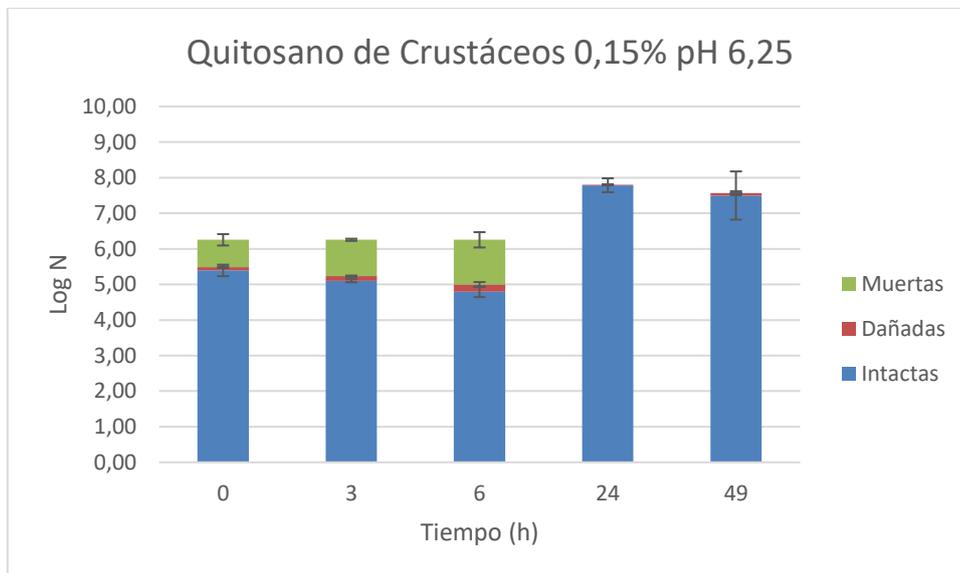


FIGURA 6. Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la muestra de quitosano de crustáceos 0,15% pH 6,25

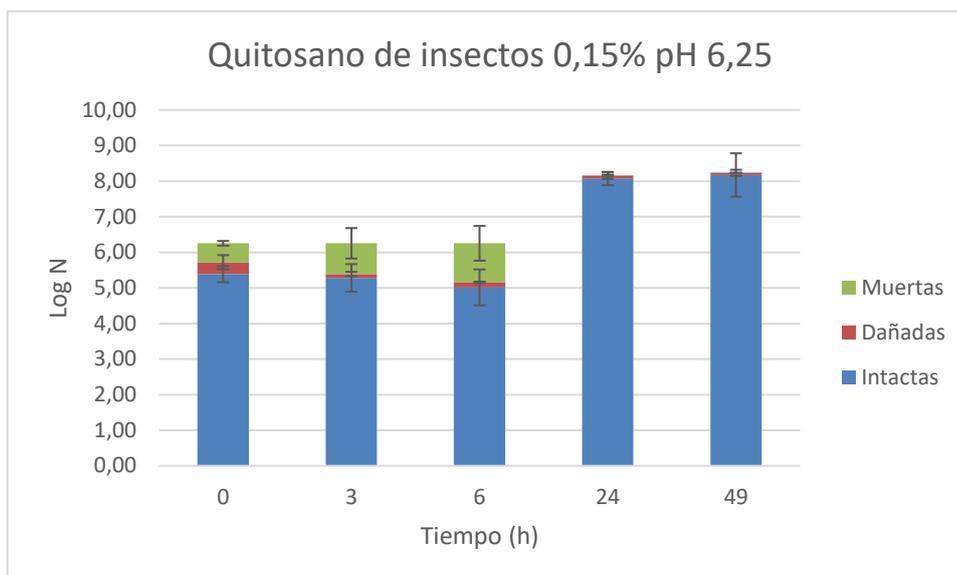


FIGURA 7. Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la muestra de quitosano de insectos 0,15% pH 6,25

3.4.2 EVALUACIÓN DEL DAÑO CELULAR SOBRE *Salmonella* EXPUESTA A LA APLICACIÓN DE LOS QUITOSANOS COMBINADOS CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

La aplicación de tecnologías de conservación combinadas en condiciones subletales, como se propone en este trabajo, es una buena estrategia, ya que permite incrementar la inactivación microbiana conseguida con niveles bajos de intensidad de tratamiento y por lo tanto permite mantener la calidad de los alimentos. Sin embargo, bajo estas condiciones pueden aparecer células dañadas subletalmente (Criado et al., 2015; Lim et al., 2013). Las células dañadas son células viables no cultivables en medios selectivos (Wu, 2008; Wesche et al., 2009) y cuyos mecanismos de resistencia pueden ser diferentes a aquellos de las células intactas, por lo tanto, es interesante hacer un estudio de la evolución de esta población, cuando se combina APH y quitosano.

En las figuras 8 y 9, se puede observar el número de células intactas, dañadas y muertas de la población de *S. Typhimurium* en las muestras control (ausencia de quitosano) tratadas por APH. En ambos casos la proporción de células dañadas es despreciable. En la muestra APH Control Ácido pH 6,25 a las 49 horas se produce una reducción de las células intactas y un leve aumento del número de células dañadas. Estos datos presentan cierta variabilidad entre las repeticiones realizadas, lo que podría justificarse por las condiciones de envejecimiento del cultivo.

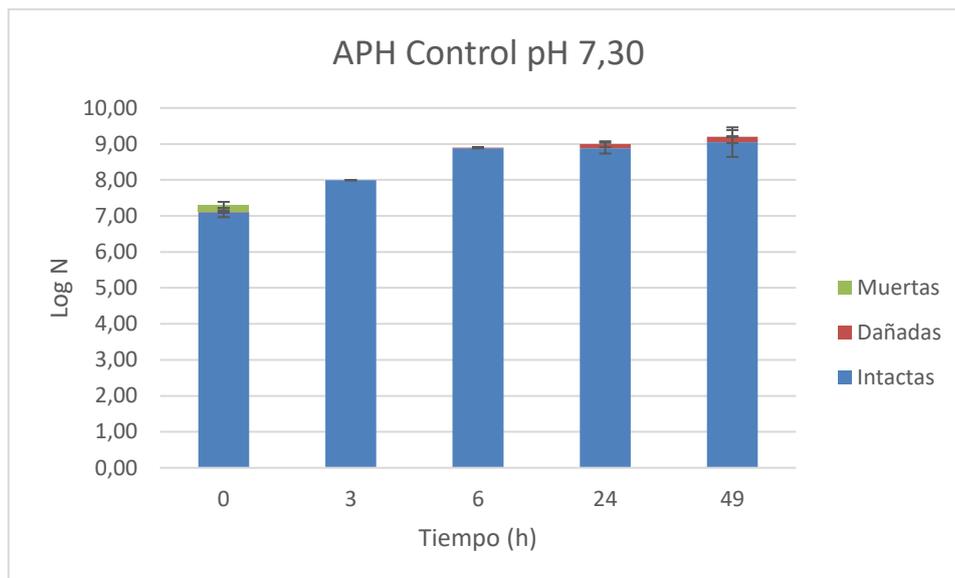


FIGURA 8. Daño celular de *S. Typhimurium* de la muestra control pH 7,30 sometida a altas presiones hidrostáticas

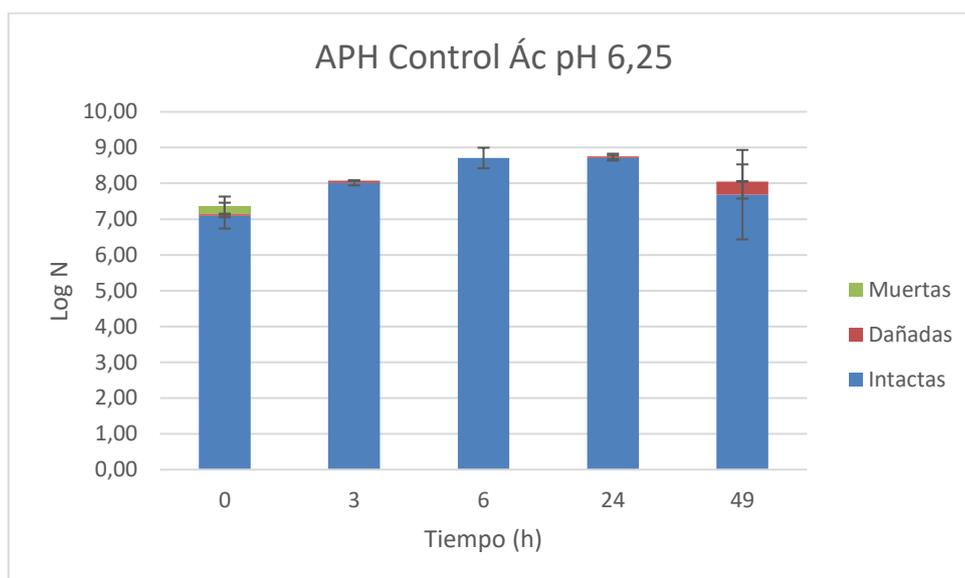


FIGURA 9. Daño celular de *S. Typhimurium* de la muestra control ácido pH 6,25 sometida a altas presiones hidrostáticas

Del mismo modo, en la figura 10 se puede observar el número de células intactas, dañadas y muertas de la población de *S. Typhimurium*. El daño producido como consecuencia del tratamiento combinado de APH- quitosano crustáceos también resulta despreciable (<0,2 ciclos logarítmicos).

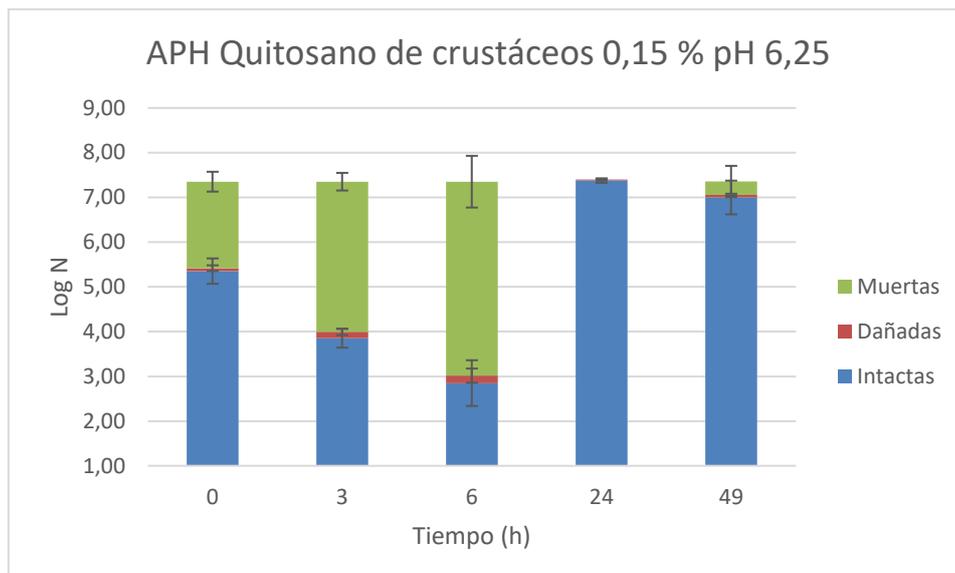


FIGURA 10. Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la muestra de quitosano de crustáceos 0,15% pH 6,25 combinada con altas presiones hidrostáticas

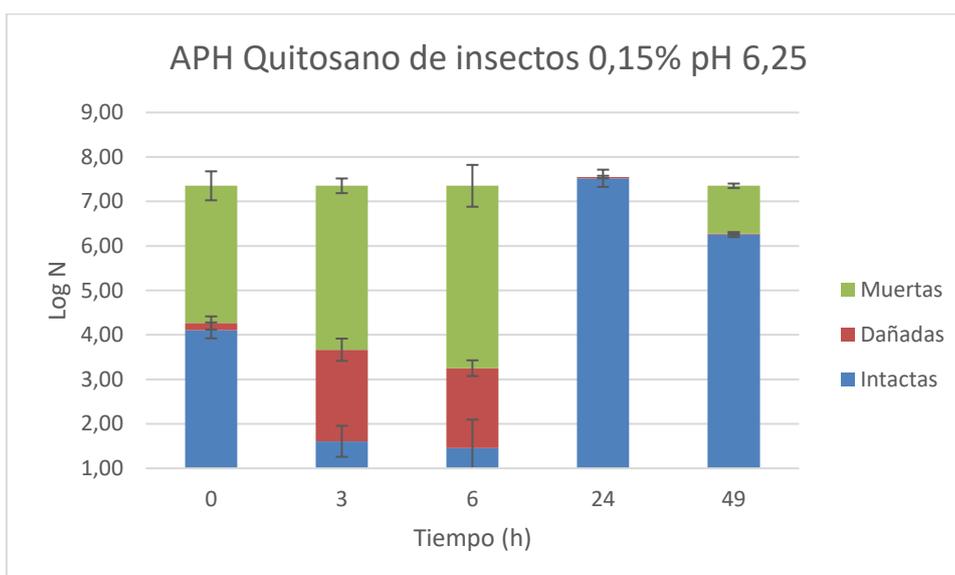


FIGURA 11. Daño celular de *S. Typhimurium* por efecto de la muestra de quitosano de insectos 0,15% pH 6,25 combinada con altas presiones hidrostáticas

En el caso de la muestra APH Quitosano de insectos pH 6,25 (Figura 11) en los tiempos 3 h y 6 h se evidencia una proporción significativa de células dañadas (2,06 y 1,80 ciclos logarítmicos, respectivamente). Este resultado es interesante porque implica un mecanismo de acción diferente en el quitosano de insecto frente al quitosano de crustáceo. Ya se ha comentado anteriormente que la actividad antimicrobiana del quitosano depende varios factores intrínsecos a la molécula, por lo que estas disimilitudes podrían justificar, esta diferencia de comportamiento observada en el presente trabajo.

Para corroborar si los valores de daño observados son significativamente diferentes entre los distintos tratamientos combinados con altas presiones hidrostáticas, se realizó un ANOVA de las células dañadas en tiempo 6 h para los 4 tratamientos con APH. El valor-P obtenido fue menor que 0,05, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, confirmándose mayores valores de daño en la población de APH Quitosano de insectos que en el resto de tratamientos (Tabla 5).

TABLA 5. Prueba Tukey al 5% de las células dañadas en tiempo 6 h de los 4 tratamientos con APH

TRATAMIENTOS	GRUPOS HOMOGÉNEOS	
	<i>A</i>	<i>B</i>
APH Control Ác	X	
APH Control	X	
APH CCH	X	
APH ICH		X

Adicionalmente, para comprobar si los valores de daño producido por el quitosano de insectos en las muestras tratadas por altas presiones y sin tratar son estadísticamente significativos, se realizó un ANOVA de las células dañadas en tiempo 6 h. El resultado de esta prueba (p -valor $<0,05$) confirma que en el medio con quitosano procedente de insectos tratado con altas presiones hidrostáticas, la fracción de células dañadas en la población de viables es significativamente mayor que la obtenida en el medio de quitosano de insectos sin tratar por altas presiones. Convendría caracterizar el quitosano de insecto con el objeto de aclarar estas diferencias.

Como se ha comentado anteriormente, la aparición de células dañadas podría suponer un riesgo desde el punto de vista de sus posibles cambios de resistencia o de virulencia, sin embargo, los resultados del presente trabajo indican que, en este caso, el riesgo es mínimo ya que los tratamientos combinados o bien no producen células dañadas o bien estas desaparecen tras 24 h de almacenamiento.

Los microorganismos son resistentes a los antimicrobianos químicos/naturales selectivos debido a su capacidad para excluir tales agentes de la célula, principalmente por la acción de la membrana celular y el transporte. Sin embargo, si la membrana y los mecanismos de transporte activo se dañan, por ejemplo, por altas presiones hidrostáticas, esta tolerancia puede perderse. Por lo que, los antimicrobianos en sinergia con altas presiones hidrostáticas presentan una mayor efectividad (Oliveira et al., 2018), esto se constata con los resultados obtenidos en este trabajo, los cuales evidencian una mayor inactivación de la población bacteriana después de la combinación de APH con el quitosano.

4. CONCLUSIONES

- Los quitosanos procedentes de crustáceos e insectos han demostrado tener un efecto bacteriostático contra *S. Typhimurium* durante las primeras 6 horas de incubación.
- La presencia de quitosano tanto de insectos como de crustáceos con y sin altas presiones hidrostáticas incrementa la fase de latencia del cultivo en 6 horas.
- Cuando la exposición bacteriana al quitosano procedente de crustáceos e insectos se combina con las altas presiones hidrostáticas (300 MPa - 2min), se obtiene un efecto bactericida logrando reducciones de 4 ciclos logarítmicos de *S. Typhimurium* en 6 horas a 37°C, aunque dicho efecto revierte tras 24 h y 49 h de almacenamiento.
- Existe un efecto sinérgico entre la aplicación de APH y quitosano.
- El quitosano procedente de insectos produce mayor cantidad de células dañadas que el quitosano de crustáceos.

5. AGRADECIMIENTOS

Le agradezco en primer lugar a Dios mi padre celestial, porque ha sido mi conductor de vida, con él todo lo puedo.

A mi papá Víctor, mi gran ejemplo de perseverancia y quién vive siempre inmortalizado en mi corazón.

A mis padres Rodrigo y Dayumara, por apoyarme en cada aspecto que ha englobado la experiencia de estudiar en el exterior. Sin duda su amor y su guía han sido mi motor para terminar con éxito este máster.

A mis hermanos Víctor y Mateo, porque tan sólo con su existencia me impulsan cada día a ser mejor.

A mis abuelitas Gladysita, Olivita y Laurita, por sus oraciones, cariño y apoyo constante.

A mi amiga Nancy, indudablemente esta etapa no hubiese sido la misma si es que no te hubiera conocido. Gracias a ti esta experiencia se me ha hecho ligera y amena, eres una bendición.

6. REFERENCIAS

- Ayala Valencia, Germán. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Scientia Agroalimentaria*. 2. 32.
- Barriga, María. (2018). "Aplicación de altas presiones para mejorar la seguridad alimentaria y prolongar la vida útil de alimentos preparados listos para consumir", [en línea]. Trabajo práctico – diplomado en salud pública. Dirección URL: <http://escuelasalud.gobex.es/files/cms/web/uploaded_files/Trabajos_DSP_2018/Barriga_Rubio_Maria_Jesus.pdf>. [Consulta: 15 de mayo. 2019]
- Criado, M.N., Belda-Galbis, C.M., Martínez, A., Rodrigo, D. (2015). *Stevia rebaudiana* Bertoni Antioxidant Activity and Its Preservative Potential Combined with High Hydrostatic Pressure. *Stevia rebaudiana: Chemical Composition, Uses and Health Promoting Aspects*. ISBN: 978-1-63463-358-1

- Chien, R. C., Yen, M. T., & Mau, J. L. (2016). Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate polymers*, 138, 259-264
- Fu, Sarkar, Bhunia, & Yao. (2016). Delivery systems of antimicrobial compounds to food. *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.013>
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 85, 467-475.
- Lee, J., & Kaletunç, G. (2010). Inactivation of *Salmonella Enteritidis* strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin. *International journal of food microbiology*, 140(1), 49-56.
- Lim, S.W., Kim, S.W., Lee, S.C., Yuk, H.G. (2013). Exposure of *Salmonella* Typhimurium to guava extracts increases their sensitivity to acidic environments. *Food Control*, 33, 2, 393-398.
- Luo, Qiang, Wang, Ying, Han, Qianqian, Ji, Lisu, Zhang, Hongmei, Fei, Zhenghao, & Wang, Yanqing. (2019). Comparison of the physicochemical, rheological, and morphologic properties of chitosan from four insects. *Carbohydrate Polymers*, 209, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.030>
- Marei, Elwahy, Salah, El Sherif, & El-Samie. (2019). Enhanced antibacterial activity of Egyptian local insects' chitosan-based nanoparticles loaded with ciprofloxacin-HCl. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.204>
- Marqués, A., Encarnação, S., Pedro, S., & Nunes, M. L. (2008). In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2357-2360.
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., & Medina, M. (2016). Natural antimicrobials and high-pressure treatments on the inactivation of *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in cold-smoked salmon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2573-2578.
- Morata, Antonio. (2015). Nuevas Tecnologías de Conservación de Alimentos 2010 2Ed-Resumen. 10.13140/RG.2.1.4187.6641.
- Mujtaba, Morsi, Kerch, Elsabee, Kaya, Labidi, & Khawar. (2019). Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 889–904. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109>
- Noriega, Velliou, Van Derlinden, Mertens, & Van Impe. (2013). Effect of cell immobilization on heat-induced sublethal injury of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria innocua*. *Food Microbiology*, 36(2), 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.015>
- Oliveira, T. L. C., Ramos, A. L., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Cristianini, M. (2015). Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends in food science & technology*, 45(1), 60-85.
- Ogihara, H., Yatuzuka, M., Horie, N., Furukawa, S., & Yamasaki, M. (2009). Synergistic effect of high hydrostatic pressure treatment and food additives on the inactivation of *Salmonella enteritidis*. *Food Control*, 20(11), 963-966.
- Sánchez-Moreno, Concepción, González-Peña, Diana, Colina-Coca, Clara, & Ancos, Begoña de. (2018). Métodos físicos no tradicionales de control microbiológico aplicables al proceso de elaboración de hortalizas de IV Gama. *Agrociencia Uruguay*, 22(1), 26-36. <https://dx.doi.org/10.31285/agro.22.1.3>
- WHO. "*Salmonella* (no tifoidea)", [en línea]. (2018) Dirección URL: <[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. [Consulta: 15 de mayo. 2019]
- Wuytack, E. Y., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B. & Michiels, C. W. (2003). Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection*, 66(1), 31-37.