



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para  
el Desarrollo

Empleo de antimicrobianos naturales para el control de  
bacterias productoras de histamina en alimentos

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad  
Alimentaria

AUTOR/A: Camarena Bononad, Paula

Tutor/a: Fuentes López, Ana

Cotutor/a: Ruiz Rico, María

Cotutor/a: Barat Baviera, José Manuel

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

# EMPLEO DE ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA EL CONTROL DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA EN ALIMENTOS

Paula Camarena Bononad, Ana Fuentes López<sup>1</sup>, José Manuel Barat Baviera<sup>1</sup>, María Ruiz Rico<sup>1</sup>

## RESUMEN

La acumulación de histamina en el organismo puede desencadenar diversos cuadros clínicos, siendo la dieta la principal fuente de histamina para el hombre. La presencia de esta amina biógena en los alimentos se asocia al desarrollo de determinadas especies bacterianas. Debido a que, una vez generada la histamina en el alimento, esta resiste cualquier tratamiento posterior, la mejor estrategia para mitigar los problemas asociados a su presencia es evitar su formación. En este sentido, en el presente trabajo se ha evaluado la efectividad de diferentes compuestos de origen natural para inhibir el crecimiento de bacterias seleccionadas por su capacidad de producir histamina en alimentos: *Raoultella planticola*, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Oenococcus oeni*. Entre los compuestos evaluados, eugenol, carvacrol, timol y cinamaldehído han demostrado ser los más efectivos para inhibir el crecimiento de microorganismos capaces de producir histamina en alimentos y, por tanto, de evitar la generación de histamina incluso a concentraciones inferiores a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de algunos de los microorganismos estudiados. El empleo de compuestos procedentes de aceites esenciales durante el procesado y conservación de los alimentos sería una estrategia interesante para prevenir la acumulación de histamina en el organismo y, por tanto, mitigar sus efectos adversos, especialmente en aquellos individuos con una actividad baja de la enzima Diamino Oxidasa (DAO). Este tipo de pacientes se ven obligados, en la mayoría de los casos, a mantener una dieta restrictiva prescindiendo de alimentos esenciales como pescados azules, derivados lácteos y otros alimentos fermentados, de forma que el empleo de compuestos naturales con actividad antimicrobiana podría contribuir a su mejora nutricional y de salud.

**PALABRAS CLAVE:** Histamina, antimicrobianos naturales, actividad antimicrobiana, bactericida.

## RESUM

L'acumulació d'histamina a l'organisme pot desencadenar diversos quadres clínics, sent la dieta la principal font d'histamina per a l'home. La presència d'aquesta amina biògena als aliments s'associa al desenvolupament de determinades espècies bacterianes. A causa que, una vegada generada la histamina a l'aliment, aquesta resisteix qualsevol tractament posterior, la millor estratègia per a mitigar els problemes associats a la seua presència és evitar la seua formació. En aquest sentit, en el present

<sup>1</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

treball s'ha avaluat l'efectivitat de diferents compostos d'origen natural per a inhibir el creixement de bacteris seleccionats per la seua capacitat de generar histamina en aliments: *Raoultella planticola*, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Streptococcus salivarius* subesp. thermophilus i *Oenococcus oeni*. Entre els compostos avaluats, eugenol, carvacrol, timol i cinamaldehyd han demostrat ser els més efectius per a inhibir el creixement de microorganismes capaços de generar histamina en aliments, i per tant, evitar la generació d'histamina inclús a concentracions inferiors a la Concentració Mínima Inhibitòria (CMI) d'alguns dels microorganismes estudiats. La utilització de compostos procedents d'olis essencials durant el procés i conservació d'aliments seria una estratègia interessant per a previndre l'acumulació d'histamina a l'organisme i, per tant, mitigar els seus efectes adversos, especialment en aquells individus amb una activitat baixa de l'enzima Diamino Oxidasa (DAO). Aquest tipus de pacients es veuen obligats, en la majoria dels casos a mantindre una dieta restrictiva prescindint d'aliments essencials com peixos blaus, derivats lactis i altres aliments fermentats, de manera que la utilització de compostos naturals amb activitat antimicrobiana podria contribuir a la seua millora nutricional i de salut.

PARAULES CLAU: Histamina, antimicrobians naturals, activitat antimicrobiana, bactericida.

## ABSTRACT

The accumulation of histamine in the organism can trigger various clinical conditions, with diet being human's primary source of histamine. The presence of this biogenic amine in food is associated with the development of certain bacterial species. Since, once histamine is generated in food, it resists any subsequent treatment, the best strategy to mitigate the problems associated with its presence is to avoid its formation. In this sense, this study has evaluated the effectiveness of different compounds of natural origin in inhibiting the growth of bacteria selected for their ability to produce histamine in food: *Raoultella planticola*, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus and *Oenococcus oeni*. Among the compounds evaluated, eugenol, carvacrol, thymol and cinnamaldehyde have proved to be the most effective in inhibiting the growth of microorganisms capable of producing histamine in food and, therefore, in preventing the generation of histamine even at concentrations below the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of some of the microorganisms studied. Using compounds from essential oils during food processing and preservation would be an interesting strategy to prevent histamine accumulation in the organism and, consequently, mitigate its adverse effects, especially in those individuals with low activity of the Diamino Oxidase (DAO) enzyme. In most cases, these patients are forced to maintain a restrictive diet without essential foods such as oily fish, dairy products, and other fermented foods, so the use of natural compounds with antimicrobial activity could contribute to their nutritional and health improvement.

KEYWORDS: Histamine, natural antimicrobials, antimicrobial activity, bactericide.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La histamina es una amina biógena compuesta por un anillo imidazólico y un grupo etilamino como cadena lateral (Camps, 2016). Resulta de la descarboxilación del aminoácido histidina por la enzima L-histidina descarboxilasa (Carpintero et al., 2019). La histamina se puede encontrar de forma natural en el organismo, donde ejerce funciones fisiológicas y fisiopatológicas. Entre estas funciones destaca su participación en diferentes procesos como la regulación de la circulación local, la hipermeabilidad capilar, la contracción y relajación de la musculatura lisa y de los vasos sanguíneos, la secreción del ácido clorhídrico en el estómago, las respuestas de hipersensibilidad inmediata, los procesos alérgicos y los inflamatorios como parte de una respuesta inmune a patógenos externos, la cicatrización de los tejidos y además se ha identificado su actuación como neurotransmisor del sistema nervioso central (International Society of DAO deficiency, 2022). La histamina también puede tener un origen exógeno y llegar al organismo a través de la dieta. En los alimentos, la histamina es producida por una gran diversidad de especies bacterianas con actividad de la enzima histidina descarboxilasa, siendo los alimentos donde se pueden encontrar mayores concentraciones de histamina los productos derivados de la pesca y productos fermentados, como los derivados lácteos, el vino, la cerveza y los embutidos.

Respecto a los productos de la pesca, la histamina se relaciona fundamentalmente con el pescado azul de la familia *Scombridae* (escómbridos), como el atún, la caballa, y el bonito, debido a que este tipo de pescado es rico en histidina, el aminoácido precursor. También pueden encontrarse concentraciones elevadas de histamina en otros pescados como los pertenecientes a la familia *Clupeidae*, como son la sardina, la anchoa y el arenque. El modo de conservación y elaboración del pescado también influye en la concentración final de histamina en el alimento. En este sentido, según un estudio realizado por Yesudhasan et al. (2013), donde se analizaron diferentes productos de la pesca procedentes de pescados escombroides y no escombroides, se determinó que los productos que se conservaban en seco presentaban mayores concentraciones de histamina, mientras que el pescado congelado presentaba las concentraciones de histamina más bajas. Cabe destacar que el contenido máximo de histamina únicamente está contemplado en la legislación para los productos pesqueros. En el *Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*, se establecen los límites máximos tolerables para productos de la pesca comercializados dentro de la Unión Europea (UE).

Otro grupo de alimentos donde se han encontrado niveles elevados de histamina y de otras aminas biógenas son los derivados lácteos. Entre estos productos, son los quesos los que presentan mayores contenidos de histamina, siendo el tratamiento de la leche empleada como materia prima y el tiempo de maduración del queso los factores que determinan la mayor o menor concentración de esta amina biógena en el producto final. En este aspecto, la presencia de histamina es mayor en quesos de leche cruda que en los quesos obtenidos a partir de leche tratada térmicamente, y mayor

también en quesos de larga maduración en comparación con los quesos frescos o de maduraciones más cortas (Botello-Morte et al., 2022). Otros factores como la especie animal de la cual procede la leche para la fabricación de los quesos no influyen en la concentración de histamina en el producto final.

En el caso de los vinos, la generación de histamina se produce durante la fermentación maloláctica por la acción de las bacterias lácticas encargadas de transformar el ácido málico en ácido láctico. No todas las bacterias lácticas tienen la misma capacidad de producir histamina, encontrándose importantes variaciones en función de la especie y sobre todo la cepa, siendo la principal especie responsable de producir histamina en vino *Oenococcus oeni* (Bebegal et al., 2012).

El consumo de alimentos que contienen niveles elevados de histamina puede producir una toxiinfección alimentaria, conocida como la intoxicación por histamina. Los síntomas asociados a esta intoxicación aparecen a los pocos minutos de la ingesta, pudiendo provocar efectos neurológicos y cutáneos, acción sobre el sistema cardiovascular, las glándulas endocrinas y el músculo liso (Bartuano et al., 2018). Para paliar estos síntomas, los cuales suelen ser leves y desaparecen en poco tiempo, se emplean antihistamínicos y broncodilatadores.

Sin embargo, en algunos individuos se genera un cuadro más grave, debido a su incapacidad de metabolizar la histamina dentro del organismo. Esta incapacidad se asocia al déficit de la enzima Diamino Oxidasa (DAO), la cual es la encargada de la desaminación oxidativa de la histamina. La intolerancia a la histamina es un síndrome producido por la acumulación excesiva de histamina, que da lugar a numerosos síntomas gastrointestinales y extra-gastrointestinales (Nievas, 2020). En pacientes con déficit de DAO, aparecen síntomas inespecíficos que se podrían reducir con la suplementación de DAO y con una dieta libre de histamina.

La histamina resiste a la congelación y también es termorresistente, por lo que los procesos térmicos, como la cocción, la pasteurización o la esterilización, son incapaces de eliminarla del alimento una vez esta se ha generado (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2021). Es por ello por lo que la mejor estrategia de control de la histamina en la cadena alimentaria es evitar su formación. Entre estas medidas se consideran: mantener los productos pesqueros a temperaturas cercanas a 0 °C durante toda la cadena alimentaria, manipular los alimentos de forma higiénica y, en el caso de los productos fermentados, es esencial realizar una selección y control de las cepas bacterianas que pueden estar relacionadas con la formación de histamina.

Es por ello que el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos de origen natural frente a microorganismos con capacidad para generar histamina en alimentos, para ello se seleccionaron bacterias relacionadas con la presencia de histamina en pescado, queso y vino. Los componentes evaluados fueron compuestos orgánicos presentes en plantas, como el eugenol, carvacrol, timol, vainillina, cinamaldehído, ácido gálico, ácido ferúlico, geraniol, y quitosano, sustancia

procedente de la desacetilación parcial de la quitina procedentes de crustáceos e insectos.

Este trabajo presenta una vinculación directa con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en concreto contribuye a los siguientes ODS: ODS3 (Salud y bienestar) garantizando que los alimentos que llegan a la cadena alimentaria se encuentran libres de histamina y ofreciendo a los consumidores alimentos seguros, y ODS9 (Industria, innovación e infraestructura) mediante el desarrollo de nuevas estrategias que permitan a la industria alimentaria reducir la presencia de histamina en los alimentos.

## **2.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1.- Materiales**

Los microorganismos utilizados fueron *Raoultella planticola* (CECT 843) relacionada con la generación de histamina en pescados azules; *Lentilactobacillus parabuchneri* (CECT 5740), *Limosilactobacillus reuteri* (CECT 925) y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (CECT 986), siendo estas bacterias relacionadas con la presencia de histamina en quesos; y *Oenococcus oeni* (CECT 217) presente en vinos. Estos microorganismos fueron suministrados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Estas cepas se suministraron liofilizadas y se recuperaron según las instrucciones de la CECT. Para su crecimiento, se utilizaron como medios de cultivo BHI (para *S. salivarius* y *R. planticola*), MRS (para *L. parabuchneri* y *L. reuteri*) y MRS suplementado con 5 g/L de fructosa, 6 g/L de ácido málico y 0.5 g/L de L-cisteína (para *O. oeni*), en caldo y en medio sólido. Se estudió la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano de los siguientes compuestos: eugenol, carvacrol, timol, vainillina, cinamaldehído, ácido ferúlico, ácido gálico, quitosano, geraniol, isocianato de alilo y la lisozima, todos ellos suministrados por Sigma Aldrich Ltd. (St. Louis, USA).

En los ensayos realizados para comprobar la capacidad de las diferentes cepas de generar histamina se empleó como sustrato histidina suministrada por Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos empleados en la determinación cromatográfica de la histamina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) fueron suministrados por Merck Life Science, excepto el acetonitrilo, empleado como fase móvil, que fue suministrado por Scharlab S.L. (Sentmenat, Barcelona, España).

### **2.2.- Ensayo *in vitro* para la evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos frente a bacterias productoras de histamina**

En primer lugar, se llevó a cabo un cribado inicial empleando el método del antibiograma disco-placa con el objetivo de determinar la sensibilidad de los diferentes microorganismos a cada uno de los compuestos estudiados. Los compuestos con mayor actividad antimicrobiana, en cada caso, se emplearon para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración

Mínima Bactericida (CMB), mediante el método de microdilución. Los procedimientos empleados en cada caso fueron los descritos por Cantón et al. (2000). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 2.2.1.- MÉTODO DEL ANTIBIOGRAMA DISCO-PLACA

Se llevó a cabo la evaluación de la susceptibilidad de los diferentes microorganismos frente a los compuestos antimicrobianos mediante el ensayo del antibiograma disco-placa. Este ensayo consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con las sustancias cuya actividad se quiere determinar (Cantón et al., 2000). Para ello, se prepararon los inóculos de los diferentes microorganismos ajustando la absorbancia a 595 nm hasta un valor de 0.2. Cada inóculo se sembró en placa con el medio de cultivo adecuado, empleando un hisopo, y se colocaron los discos estériles impregnados con 20 µL de cada uno de los compuestos en estudio. Se utilizaron discos control con 20 µL de vancomicina como control negativo (C-) y 10 µL de DMSO como control positivo (C+). Las placas se incubaron a 37 °C en el caso de las cepas de *S. salivarius*, *L. parabuchneri* y *L. reuteri*, y a 30 °C en el caso de *R. planticola* y *O. oeni* (*O. oeni* en condiciones anaerobias) durante 24 h. Una vez transcurrido el período de incubación, se procedió a medir el halo de inhibición mediante un pie de rey.

Los resultados obtenidos en esta fase del trabajo se emplearon para seleccionar los compuestos con mayor actividad frente a los diferentes microorganismos en estudio y que serían empleados en los ensayos posteriores.

### 2.2.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los compuestos antimicrobianos frente a cada microorganismo se realizó el ensayo de microdilución. La mayoría de los investigadores citan la CMI como una medida del rendimiento antibacteriano de un compuesto. La definición de CMI, en algunas ocasiones difiere entre estudios, lo que dificulta la comparación de los resultados de diferentes trabajos. En algunos casos, se establece la CMB o la concentración bacteriostática, términos que concuerdan estrechamente con la CMI (Burt, 2004). Una de las definiciones adoptadas es la dada por Carson et al. (1995a), que definió la Concentración Mínima Inhibitoria o CMI como “la concentración más baja que resulta del mantenimiento o reducción de la viabilidad del inóculo del microorganismo diana después de un periodo de incubación determinado”. Por otro lado, la Concentración Mínima Bactericida o CMB se puede definir como “la menor concentración de antimicrobiano capaz de producir *in vitro*, en condiciones estándares, la muerte del 99.9% de un inóculo bacteriano” (Carson et al., 1995b).

Como se ha comentado, para establecer los valores de la CMI y la CMB de los diferentes compuestos se realizó el ensayo de microdilución,

empleando placas de 96 pocillos. Para ello, se prepararon disoluciones stock de cada antimicrobiano a una concentración inicial de 100 ppm en DMSO y, en el caso del quitosano, 100 ppm en acético al 1% (v/v). A partir de cada disolución stock se prepararon las diluciones de los antimicrobianos a diferentes concentraciones en los caldos de cultivo (TABLA 1). Asimismo, se prepararon los inóculos de cada microorganismo empleando los medios y condiciones requeridas para cada uno de ellos y ajustando el valor de absorbancia (595 nm) a 0.2, empleando un lector automático de microplacas.

**TABLA 1.** Rango de concentraciones (ppm) de los antimicrobianos evaluados en función del microorganismo utilizado en el ensayo.

	<i>R. planticola</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. parabuchneri</i>	<i>O. oeni</i>
<b>Eugenol</b>	0.3 - 4.0	0.25 - 1.50	0.75 - 7.0	0.25 - 7.0	0.25 - 2.0
<b>Carvacrol</b>	0.13 - 3.0	0.1 - 0.9	0.25 - 2.0	0.28 - 2.0	0.1 - 0.8
<b>Timol</b>	0.08 - 3.0	0.01 - 0.9	0.1 - 2.0	0.1 - 2.0	0.1 - 0.8
<b>Vainillina</b>	2.0 - 10.0	0.5 - 8.0	1.0 - 8.0	1.0 - 8.0	1.0 - 10.0
<b>Cinamaldehído</b>	0.025 - 2.25	0.025 - 0.4	0.1 - 0.8	0.05 - 1.0	0.1 - 1.0
<b>Ácido ferúlico</b>	2.0 - 8.0	0.5 - 8.0	0.5 - 8.0	1.0 - 8.0	2.0 - 10.0
<b>Ácido gálico</b>	2.0 - 10.0	0.5 - 10.0	0.5 - 10.0	1.0 - 8.0	0.5 - 10.0
<b>Quitosano</b>	0.1 - 8.0	0.5 - 4.5	1.0 - 8.0	0.5 - 8.0	0.1 - 8.0
<b>Geraniol</b>	0.9 - 5.5	0.25 - 4.0	0.5 - 4.0	1.0 - 4.0	1.0 - 4.0

A continuación, se diseñó la placa de 96 pocillos disponiendo en cada placa un control positivo, un control negativo y las diferentes concentraciones de cada uno de los antimicrobianos. Se llenaron los pocillos con 190  $\mu$ L de la disolución del antimicrobiano y 10  $\mu$ L del inóculo y se dejaron incubar durante el tiempo, temperatura y condiciones óptimas según cada microorganismo (condiciones descritas en el apartado 2.2.1.). Tras la incubación, se determinó la aparición de turbidez en cada uno de los pocillos midiendo la absorbancia del caldo contenido en cada uno a 595 nm y comparando los valores de absorbancia obtenidos respecto a los pocillos empleados como control negativo (caldo de cultivo con el antimicrobiano sin inocular). El valor de la CMI se estableció como la concentración más baja donde no se observó turbidez del caldo de cultivo. Tras esta comprobación, se procedió a la siembra de aquellos pocillos donde no se observó turbidez para así confirmar la inhibición del microorganismo. El valor de la CMB se estableció como la concentración más baja en la que no hubo crecimiento después del subcultivo del caldo fresco.

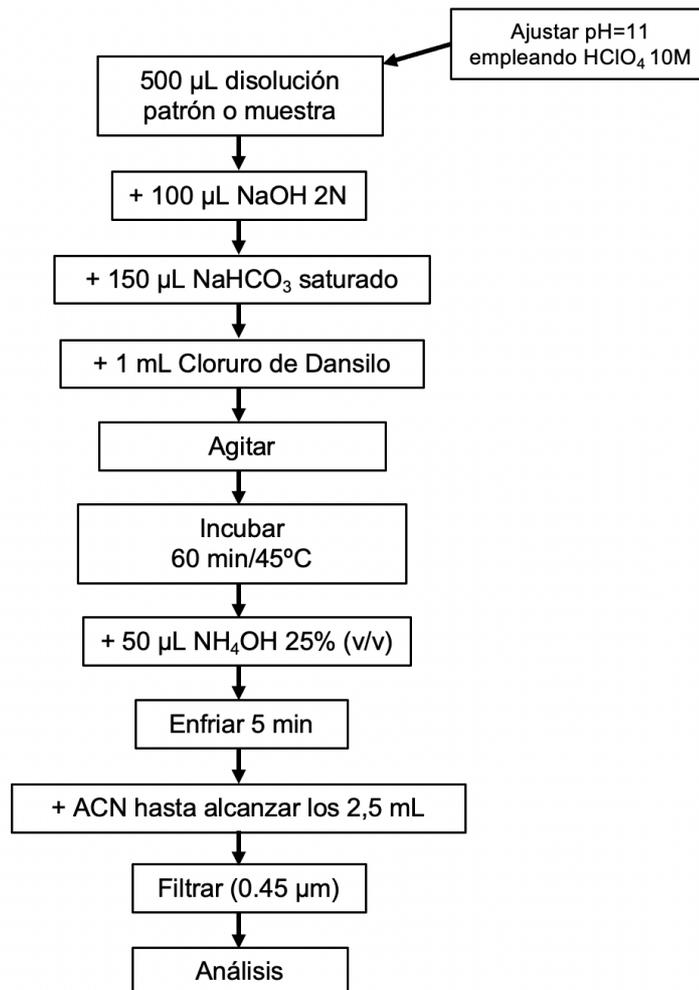
### **2.3.- Estudio *in vitro* para determinar la capacidad de las sustancias antimicrobianas en estudio para inhibir la formación de histamina**

Para determinar el efecto de los diferentes antimicrobianos sobre la capacidad de las cepas analizadas para producir histamina, se llevó a cabo un nuevo ensayo donde se expusieron los diferentes microorganismos a una concentración de antimicrobiano igual a la CMB, CMB/2 y CMB/4. Este ensayo

se llevó a cabo en placas de 24 pocillos. En estos pocillos se incorporó la disolución del antimicrobiano en caldo de cultivo, el inóculo de cada microorganismo y, finalmente, la disolución de histidina, para disponer de una concentración final en cada pocillo del 1%. A continuación, las placas se incubaron bajo las condiciones adecuadas para cada microorganismo. Tras la incubación, se determinó el valor de absorbancia a 595 nm del contenido de cada pocillo y se realizó la siembra para determinar el crecimiento microbiano producido en cada caso. Después, el caldo de cultivo se llevó a tubos Eppendorf, se centrifugó, se filtró empleando filtros de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se congeló hasta su análisis.

Las disoluciones filtradas se analizaron con el objetivo de determinar la cantidad de histamina generada en cada caso. La determinación de histamina de los diferentes caldos se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Para la determinación cromatográfica de la histamina se empleó el procedimiento descrito por Vinci et al. (2011). Para ello, se empleó una derivatización pre-columna utilizando cloruro de dansilo como reactivo derivatizante (FIGURA 1).



**FIGURA 1.** Protocolo de derivatización.

Tras la derivatización, las muestras fueron analizadas en un equipo HPLC Hitachi Ltd. (Japón) con una columna Eclipse XDB-C18 4.6x150 5U (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El volumen de inyección de las muestras fue de 50 µL y la temperatura de la columna se fijó en 25 °C durante el análisis. Las fases móviles empleadas fueron agua ultrapura (A) y acetonitrilo (B). El programa de elución comenzó con 3 minutos en modo isocrático A-B 50:50 (v/v) alcanzando, después de 20 minutos, una proporción A-B 10:90 (v/v). A continuación, se mantuvo 3 minutos de elución isocrática y, finalmente, se emplearon 4 minutos más para restablecer las condiciones iniciales (A-B 50:50, v/v). El flujo se mantuvo constante a 1.2 mL/min, durante un tiempo total de análisis de 30 minutos. Durante el análisis se monitorizó la señal a una longitud de onda de 275 nm.

## **2.4.- Análisis estadístico**

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XVIII (Manugistics, Rockville, USA). Los resultados obtenidos en las determinaciones microbiológicas y de histamina se analizaron mediante ANOVAS simples, empleando el procedimiento LSD (Least Significant Difference) a un nivel de significación  $\alpha=0.05$ . En el caso del método del antibiograma disco-placa, se consideró como variable el diámetro del halo de inhibición y como factor el compuesto bioactivo. En el estudio del efecto de los diferentes compuestos sobre la generación de histamina *in vitro* se consideró como variable la concentración de histamina generada y como factor la concentración del compuesto bioactivo.

## **3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1.- Ensayo *in vitro* para la evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos frente a bacterias productoras de histamina**

#### **3.1.1.- ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE HISTAMINA A LOS DIFERENTES COMPUESTOS ANIMICROBIANOS**

El estudio inicial de la actividad antimicrobiana de los diferentes compuestos frente a los microorganismos seleccionados se llevó a cabo mediante el ensayo del antibiograma disco-placa, tal y como se ha descrito anteriormente. En la TABLA 2 se muestran los valores promedio de los halos de inhibición de los compuestos utilizados.

En el caso de *R. planticola*, el compuesto con mayor efectividad fue el cinamaldehído, con un valor del halo de inhibición significativamente superior al resto (46 mm), seguido por timol y carvacrol con halos de inhibición de 30 y 26 mm, respectivamente. El cinamaldehído también fue el componente más efectivo frente a *L. reuteri* (halo de inhibición = 32 mm) y frente a *L. parabuchneri* (halo de inhibición = 32 mm). Mientras que el timol y carvacrol fueron los compuestos más efectivos para inhibir el crecimiento de *S. salivarius* (halos de inhibición = 48 mm para ambos compuestos) y *O. oeni*

(halos de inhibición = 50 y 49 mm, respectivamente). La vainillina tuvo una efectividad media para *S. salivarius*, *L. reuteri*, *O. oeni* y, ligeramente inferior para *L. parabuchneri*; sin embargo, no se observó halo de inhibición al exponer a *R. planticola* a este compuesto. Por otro lado, el eugenol, uno de los fenilpropanoides con demostrada actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram + y Gram – (Fitzerald et al., 2004), únicamente tuvo un efecto inhibitorio significativo frente a *S. salivarius* y *O. oeni*. En el caso de *O. oeni*, el eugenol tuvo un efecto antimicrobiano similar al observado para el timol y carvacrol (halo de inhibición = 50 mm).

En general, la efectividad del resto de compuestos como son ácidos ferúlico y gálico, quitosano, lisozima, isocianato de alilo y geraniol fue nula o muy baja, excepto para los casos del ácido ferúlico frente a *O. oeni* y del geraniol frente a *S. salivarius*, donde la efectividad de estos compuestos fue significativa.

La mayoría de los componentes evaluados en este trabajo son compuestos presentes en los aceites esenciales cuyas propiedades antimicrobianas han sido demostradas anteriormente para un amplio espectro de microorganismos (Bakkali et al., 2008). La efectividad de estos aceites esenciales se debe a las interacciones entre los diferentes compuestos (mayoritarios y minoritarios) que forman su composición como fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres o éteres o hidrocarburos. En general, se ha establecido que aquellos aceites esenciales que presentan aldehídos o fenoles en su composición, como el cinamaldehído, carvacrol, eugenol o timol, poseen una mayor actividad antibacteriana, seguidos de aquellos que contienen alcoholes y terpenos, como el geraniol (Bassolé et al., 2012).

El cinamaldehído es el componente mayoritario de la canela, y es responsable de la mayor parte de sus propiedades. Desde hace mucho tiempo la canela ha sido utilizada para preservar los alimentos debido a su acción antibacteriana (Balmont, 2014). El cinamaldehído pertenece a la familia de los fenilpropanoides que son sintetizados en plantas a partir del aminoácido fenilalanina. Dentro de este grupo también encontramos otros de los compuestos estudiados, como son el eugenol y la vainillina. La actividad antimicrobiana de este grupo se asocia principalmente a sus grupos hidroxilo y al tipo y número de anillos aromáticos (Cava, 2013). El eugenol es uno de los componentes mayoritarios del clavo de olor, al que se le asocia un efecto antiséptico y anestésico. La vainillina, compuesto presente en las semillas de la vainilla, además de su uso como aromatizante posee propiedades antioxidantes, antifúngicas, antimutagénicas y antimicrobianas (Fitzgerald et al., 2003). La estructura de la vainillina es similar a la del eugenol, siendo este una de las principales materias primas para la obtención de la vainillina artificial.

El timol y carvacrol son isómeros fenólicos y componentes mayoritarios en el aceite esencial de orégano. Ambos compuestos, al igual que el geraniol, son terpenoides donde su actividad antimicrobiana está ligada a sus grupos funcionales y para los cuales se ha demostrado que el grupo hidroxilo de los terpenoides fenólicos y la presencia de electrones deslocalizados son importantes para su actividad antimicrobiana (Walsh et al., 2003).

Además de los compuestos mencionados, otros metabolitos secundarios de plantas han sido recientemente estudiados por su actividad antimicrobiana. La efectividad de los ácidos ferúlico y gálico ha sido analizada frente a bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Borges et al., 2013).

El quitosano es otro de los compuestos naturales de actividad antimicrobiana demostrada. Puede ser obtenido a través del exoesqueleto de crustáceos, por procesos químicos y microbiológicos, y también puede ser producido por determinados hongos. Estas variaciones en los métodos de producción conducen a diferencias en el grado de desacetilación, distribución de los grupos acetilo, la longitud de la cadena y en la estructura del quitosano y, por tanto, influyen en su solubilidad y actividad antimicrobiana (Devlieghere et al., 2004). Verlee et al. (2017) observó que el quitosano es principalmente activo en la superficie celular, y que, según el tipo de microorganismo y el peso molecular, podrían desencadenarse otras actividades antimicrobianas, como la inhibición de la síntesis de ADN/ARN o la interrupción de la síntesis de proteínas. Es interesante destacar que, a pesar de que existe una extensa bibliografía sobre la actividad antimicrobiana de los compuestos empleados en el presente estudio, no se han encontrado trabajos científicos donde se haya evaluado su efectividad frente a las bacterias productoras de histamina empleadas en este trabajo. Sin embargo, según un estudio realizado por Barragán (2020), donde se analizaron dos cepas diferentes de *L. parabuchneri* frente a la nisina, que es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, se determinó que esta bacteriocina era capaz de inhibir los biofilms formados por *L. parabuchneri* en los quesos, ya que estos biofilms actúan como reservorios favoreciendo la acumulación de histamina en el producto final. Asimismo, en dicho estudio se mencionó que se podría considerar un posible efecto inhibitorio de la nisina sobre la ruta de biosíntesis de la histamina, con lo que además de reducir el número de bacterias formadoras de biofilm con capacidad de producir histamina, la nisina podría afectar a la síntesis de esta amina biógena (AB).

**TABLA 2.** Halos de inhibición (media (SD)), incluyendo el diámetro del disco (6 mm) tras 24 h de incubación.

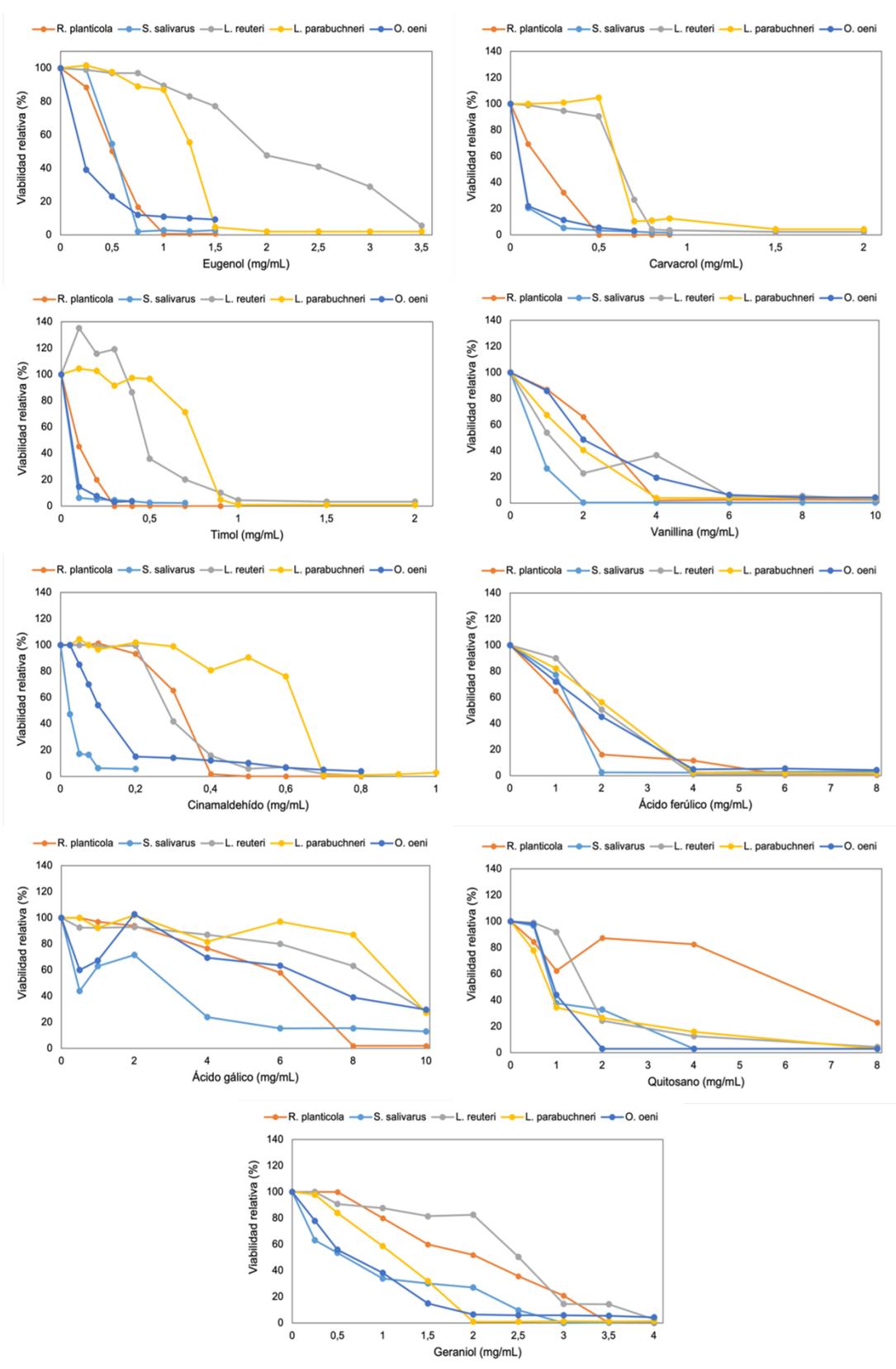
	<i>R. planticola</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. parabuchneri</i>	<i>O. oeni</i>
<b>Eugenol</b>	15 (1) <sup>c</sup>	41 (1) <sup>e</sup>	6 (0) <sup>b</sup>	9 (3) <sup>bc</sup>	50 (2) <sup>g</sup>
<b>Carvacrol</b>	26 (3) <sup>d</sup>	48 (3) <sup>f</sup>	17 (2) <sup>cd</sup>	9 (1) <sup>c</sup>	49 (2) <sup>g</sup>
<b>Timol</b>	30 (5) <sup>d</sup>	48 (2) <sup>f</sup>	15 (1) <sup>c</sup>	18 (5) <sup>d</sup>	50 (2) <sup>g</sup>
<b>Vainillina</b>	0 (0) <sup>a</sup>	22 (2) <sup>d</sup>	17 (1) <sup>d</sup>	8 (2) <sup>bc</sup>	21 (2) <sup>e</sup>
<b>Cinamaldehído</b>	46 (7) <sup>e</sup>	42 (1) <sup>e</sup>	32 (1) <sup>e</sup>	41 (2) <sup>e</sup>	44 (4) <sup>f</sup>
<b>Ácido ferúlico</b>	0 (0) <sup>a</sup>	4 (6) <sup>ab</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	6 (1) <sup>b</sup>	23 (1) <sup>e</sup>
<b>Ácido gálico</b>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	9 (2) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
<b>Quitosano</b>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	8 (0) <sup>c</sup>
<b>Geraniol</b>	8 (0) <sup>b</sup>	17 (2) <sup>c</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	4 (2) <sup>b</sup>
<b>Isocianato de alilo</b>	18 (9) <sup>c</sup>	6 (6) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	2 (4) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
<b>Lisozima</b>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	13 (1) <sup>d</sup>
<i>p-valor</i>	***	***	***	***	***

Letras diferentes en una misma columna indican la existencia de diferencias significativas a un nivel de significación  $p < 0,001$ .

A partir de los resultados, en este estudio se seleccionaron como compuestos de interés los terpenoides: carvacrol, timol y geraniol; los fenilpropanoides: eugenol, vainillina y cinamaldehído; los ácidos orgánicos: ácido ferúlico y gálico, y, finalmente, el quitosano.

### 3.1.2.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Debido a que el ensayo disco-placa no permite obtener una lectura directa del valor de las concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida (CMI y CMB) (Cantón et al., 2000), se realizó el ensayo de microdilución, tal y como ha sido descrito anteriormente. Para ello se incubaron los diferentes microorganismos en caldos de cultivo con concentraciones crecientes del antimicrobiano. Tras 24 h de incubación se procedió a inspeccionar visualmente la aparición de turbidez en el caldo como consecuencia del desarrollo microbiano, asimismo, se midió la absorbancia de estos caldos como medida aproximada del crecimiento de las bacterias inoculadas. A partir de los datos de absorbancia se calcularon los valores de viabilidad relativa, como la relación entre el valor de absorbancia medido en cada caso y la absorbancia de los caldos control positivo (caldos inoculados, pero sin el antimicrobiano). La representación de los valores de viabilidad relativa frente a las diferentes concentraciones ensayadas se muestra en la FIGURA 2. Las curvas de viabilidad relativa permiten comparar la efectividad de cada compuesto frente a los diferentes microorganismos en estudio.



**FIGURA 2.** Curvas de viabilidad relativa (%) de los diferentes microorganismos analizados para cada compuesto antimicrobiano.

En la TABLA 3 se muestran los valores de CMI de los diferentes compuestos antimicrobianos en función de los microorganismos utilizados. En el caso de *R. planticola* el compuesto de mayor efectividad fue el timol con un valor de CMI de 0.3 mg/L, seguido por el cinamaldehído y el carvacrol con valores de CMI de 0.4 y 0.5 mg/L respectivamente. Los compuestos menos efectivos fueron los ácidos ferúlico y gálico y el quitosano, este último con un valor de CMI superior a 8 mg/mL. El timol también fue el compuesto más efectivo para inhibir el crecimiento de *S. salivarius* y *O. oeni* con valores de CMI para este compuesto de 0.1 mg/L y 0.2 mg/L, respectivamente. Para ambos microorganismos el cinamaldehído presentó valores de CMI iguales al timol. Asimismo, el cinamaldehído fue el compuesto con un valor de CMI inferior en el caso de *L. reuteri* y *L. parabuchneri* (0.6 mg/L y 0.7 mg/L, respectivamente).

Para todos los microorganismos evaluados, el ácido gálico fue el compuesto con mayores valores de CMI, excepto en el caso de *R. planticola* donde el compuesto menos efectivo fue el quitosano, tal y como se ha comentado anteriormente. El otro ácido orgánico evaluado, el ácido ferúlico, presentó también una baja efectividad frente a todos los microorganismos. Estos resultados coinciden con los observados en el ensayo de susceptibilidad anteriormente comentado.

**TABLA 3.** Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (mg/mL) de los compuestos antimicrobianos frente a bacterias productoras de histamina.

	<i>R. planticola</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. parabuchneri</i>	<i>O. oeni</i>
<b>Eugenol</b>	1	0.75	3.5	3	1
<b>Carvacrol</b>	0.5	0.3	1.5	1.5	0.2
<b>Timol</b>	0.3	0.1	1	1	0.2
<b>Vainillina</b>	4	2	6	4	8
<b>Cinamaldehído</b>	0.4	0.1	0.6	0.7	0.2
<b>Ácido ferúlico</b>	6	2	4	4	4
<b>Ácido gálico</b>	8	4	>10	>10	>10
<b>Quitosano</b>	>8	2.5	4	1	1.5
<b>Geraniol</b>	3.5	3	2	2	2

Tras la comprobación de la turbidez, se procedió a la siembra de aquellos pocillos que no presentaban turbidez, ya que si se realiza un subcultivo en un medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida (Cantón et al., 2000). Como se puede observar en la TABLA 4, para *R. planticola* el compuesto de mayor efectividad fue el timol con un valor de CMB igual a 0.3 mg/mL. El cinamaldehído fue el compuesto más efectivo frente a *S. salivarius*, *L. reuteri* y *L. parabuchneri* con valores de CMB iguales a 0.2, 0.7 y 0.9 mg/mL, respectivamente. En el caso de *O. oeni* fueron el carvacrol y el timol con 0.4 mg/mL, ambos compuestos con un valor de CMB más bajo.

**TABLA 4.** Valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB) (mg/mL) de los compuestos antimicrobianos frente a bacterias productoras de histamina.

	<i>R. planticola</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. parabuchneri</i>	<i>O. oeni</i>
<b>Eugenol</b>	1	1	3.5	3	1.5
<b>Carvacrol</b>	0.5	0.7	1.5	2	0.4
<b>Timol</b>	0.3	0.5	1	1	0.4
<b>Vainillina</b>	10	2	6	4	9
<b>Cinamaldehído</b>	0.8	0.2	0.7	0.9	0.6
<b>Ácido ferúlico</b>	6	4	8	6	4
<b>Ácido gálico</b>	10	4	-	-	-
<b>Quitosano</b>	-	3	4	1	1.5
<b>Geraniol</b>	3.5	3	4	4	2

### 3.2.- Estudio *in vitro* para determinar la capacidad de las sustancias antimicrobianas en estudio para inhibir la formación de histamina

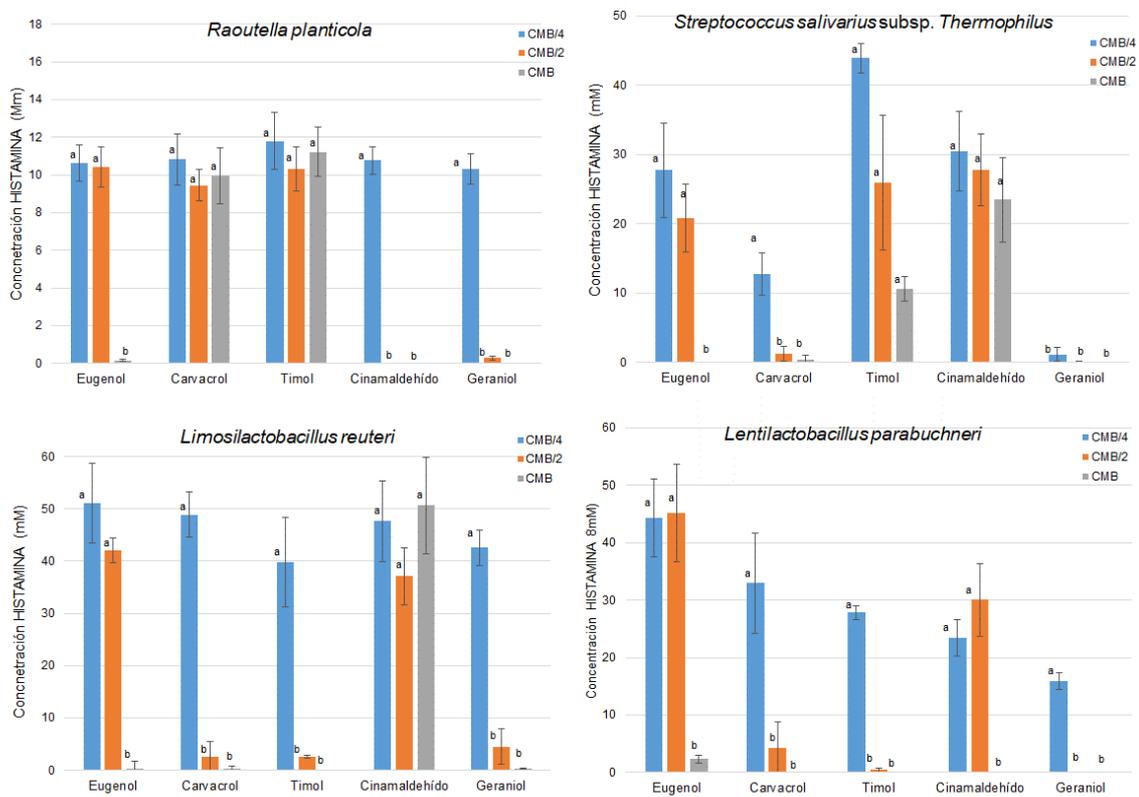
En la FIGURA 3 se muestran los valores de concentración de histamina generada por los microorganismos en estudio tras 24 h de incubación del caldo de cultivo suplementado con histamina. Las bacterias fueron expuestas a concentraciones de los antimicrobianos iguales a la CMB, CMB/2 y CMB/4 para determinar el efecto de estos compuestos sobre los microorganismos. Asimismo, se emplearon caldos control positivo para determinar la capacidad de cada uno de estos microorganismos para generar histamina.

Tras el periodo de incubación, *L. parabuchneri* y *L. reuteri* fueron los microorganismos con una mayor capacidad para generar histamina ( $53 \pm 9$  mM y  $48 \pm 11$  mM, respectivamente), no encontrándose diferencias significativas entre ambos microorganismos. Estos resultados coinciden con los datos en otros estudios donde se ha identificado *L. parabuchneri* como el principal productor de histamina en el queso, y que ha sido asociado a problemas de seguridad alimentaria por su capacidad para producir histamina en diferentes condiciones, como temperaturas de refrigeración o incluso en material de acero inoxidable (Díaz et al., 2016, Díaz et al., 2018, Møller et al., 2019, Møller et al., 2021). El otro microorganismo relacionado con la producción de histamina en los derivados lácteos, *S. salivarius*, demostró menor actividad histidina descarboxilasa, siendo la concentración de histamina final igual a  $29 \pm 10$  mM. El microorganismo con menor capacidad para generar histamina *in vitro* fue *R. planticola*, una de las principales bacterias mesófilas responsables de la formación de histamina en pescado (Palomares, 2009). La concentración final de histamina tras la incubación fue  $11 \pm 2$  mM en este caso.

Tras el periodo de 24 h de incubación, no se detectó histamina en el caldo de cultivo inoculado con *O. oeni*, microorganismo relacionado con la formación de histamina en vino, lo que podría indicar que este tipo de microorganismo precisaría de incubaciones más largas para producir esta amina biógena.

En el caso de *R. planticola* únicamente el eugenol a una concentración igual a la CMI, y el cinamaldehído y geraniol a concentraciones iguales a la

CMI y CMI/2 consiguieron inhibir completamente la generación de histamina, mientras que el carvacrol y timol a ninguna de las concentraciones ensayadas consiguieron reducir la presencia de histamina, siendo estos valores similares a la muestra control positivo. Para este microorganismo, ninguno de los compuestos analizados fue efectivo a concentraciones inferiores a la CMI/2. El geraniol fue especialmente efectivo en el caso de *S. salivarius* donde todas las concentraciones ensayadas (0,75, 1.5 y 3 ppm) consiguieron inhibir la generación de histamina. El carvacrol fue efectivo para impedir la formación de histamina cuando se empleó a una concentración igual a la CMI y la CMI/2 frente a *S. salivarius*, *L. reuteri* y *L. parabuchneri*, mientras que cuando este compuesto se empleó a una concentración igual a la CMI/4 únicamente redujo la concentración de histamina en un 41% y 60% en el caso de *S. salivarius* y *L. parabuchneri*, mientras que esa concentración no tuvo ningún efecto en el caso de *L. reuteri*.



**FIGURA 3.** Concentración de histamina (mg/L) generada por *R. planticola*, *S. salivarius*, *L. reuteri* y *L. parabuchneri* para cada una de las concentraciones del antimicrobiano evaluadas (CMB, CMB/2 y CMB/4).

El empleo de sustancias antimicrobianas de origen natural para inhibir el crecimiento de bacterias productoras de histamina ha sido analizado en otros estudios. Compuestos fenólicos, como kaempferol, ácido carnósico o luteína, presentes en hierbas aromáticas como el romero han demostrado ser efectivos para inhibir el desarrollo de cepas bacterianas relacionadas con la formación de aminas biógenas en alimentos (Özkütük, 2022). Asimismo, los

extractos de romero y salvia y los aceites esenciales de comino, clavo y menta han demostrado ser efectivos para reducir el contenido de histamina en productos (Özogul et al.,2011; Cai et al. 2015). Otras estrategias alternativas para reducir la presencia de histamina en alimentos es el empleo de cultivos microbianos, como *S. thermophilus*, que son empleados por su capacidad para degradar la histamina en alimentos (Guarcello et al., 2016).

#### **4.- CONCLUSIONES**

La presencia de histamina en el organismo puede tener un origen tanto natural, ya que forma parte del funcionamiento del sistema nervioso y digestivo, como exógeno, llegando al organismo a través de la dieta. La presencia de esta amina biógena en los alimentos se asocia al desarrollo de determinadas especies bacterianas. Entre los compuestos evaluados, eugenol, carvacrol, timol y cinamaldehído han demostrado ser los más efectivos para evitar el crecimiento de microorganismos productores histamina, y, en consecuencia, evitar la generación de esta. El empleo de este tipo de compuestos durante el procesado y conservación de los alimentos sería una estrategia interesante para prevenir la acumulación de histamina en el organismo y, por tanto, disminuir sus efectos adversos, en particular sería interesante para aquellos individuos con una deficiencia de la enzima DAO, debido a que este tipo de pacientes normalmente deben mantener una dieta restrictiva evitando alimentos esenciales como pescados azules, derivados lácteos y otros alimentos fermentados. De esta forma, el empleo de compuestos naturales con actividad antimicrobiana podría contribuir a su mejora nutricional y de salud.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a todas las personas del laboratorio que han estado presentes durante este TFM, en especial a Ana y María por todo el conocimiento que me han transmitido, por su ayuda, su apoyo, dedicación y paciencia.

Gracias a Patri, Mar y Sara por ayudarme en todo lo que han podido tanto en las prácticas como en el TFM, y porque sin ellas no habría sido lo mismo.

Gracias a toda mi familia y amigos por darme ánimos en todo siempre y, en particular, estos últimos meses.

#### **5.- REFERENCIAS**

Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. 2021. Histamina. Dirección URL: <https://acsa.gencat.cat/es/detall/article/Histamina#:~:text=La%20histamina%20es%20termorresistente%2C%20es,es%20resistente%20a%20la%20congelaci%C3%B3n.> [Consulta: 22 Ag. 2022]

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Balmont, C. C. 2014. Cinamaldehído: no sólo un dulce aroma. *Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, 14, 1-4.
- Barragán, I. 2020. Aplicación de bacteriocinas para el biocontrol de *Lactobacillus parabuchneri* productores de histamina: eficacia en la eliminación de biofilms. (Trabajo Fin de Grado, Universidad de Oviedo).
- Bartuano, L. M., Chung, E., & Franco, I. 2018. Intoxicación histamínica por consumo de atún: una revisión. *Prism. Tecnológico*, 9(1), 1.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- Berbegal, C., Lucio, O., Polo, L., & Ferrer, S. 2012. Nuevas tendencias para el desarrollo de la fermentación maloláctica en vino con *O. oeni*. *ACE: Revista de enología*, (130), 2.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, MJ, & Simões, M. 2013. Actividad antibacteriana y modo de acción de los ácidos ferúlico y gálico contra bacterias patógenas. Resistencia microbiana a los medicamentos, 19 (4), 256-265.
- Botello-Morte, L., Moniente, M., Gil-Ramírez, Y., Virto, R., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. 2022. Identification by means of molecular tools of the microbiota responsible for the formation of histamine accumulated in commercial cheeses in Spain. *Food Control*, 133, 108595.
- Burt, S. 2004. Aceites Esenciales: Sus propiedades antibacterianas y posibles aplicaciones en los alimentos: Una revisión. *Revista Internacional De Microbiología De Alimentos*, 94(3), 223-253.
- Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., & Li, J. 2015. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. *Food Control*, 56, 1-8.
- Camps, A. R. 2016. Aspectos clínicos y nutricionales de la intolerancia a la histamina en pacientes pediátricos con sintomatología digestiva crónica (Tesis Doctoral, Universitat de les Illes Balears).
- Cantón, R., García, J. E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., & García, J. A. 2000. Procedimientos en microbiología clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J J.
- Carpintero, M. S., Iñigo, S., Rodríguez, M. D. L. M. M., & Valentí, M. L. F. 2019. Predicción de la formación de histamina en pescados refrigerados ricos en histidina. *Revista Madrileña de Salud Pública: REMASP*, 1(5), 1-7.
- Carson, C. F., Cookson, B. D., Farrelly, H. D., & Riley, T. V. 1995a. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(3), 421-424.
- Carson, C. F., Hammer, K. A., & Riley, T. V. 1995b. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82(332), 181-185.
- Cava Roda, R. M. 2013. Efecto antimicrobiano de vainillina y de aceites esenciales de canela y clavo en leche de vaca pasteurizada (Tesis Doctoral, Universidad de Murcia).
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. y Debevere, J. 2004. Chitosan: actividad antimicrobiana, interacciones con componentes alimentarios y aplicabilidad como recubrimiento en frutas y hortalizas. *Microbiología de los alimentos*, 21 (6), 703-714.
- Díaz, M., del Río, B., Sanchez-Llana, E., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Alvarez, M. A. 2016. Histamine-producing *Lactobacillus parabuchneri* strains isolated from grated cheese can form biofilms on stainless steel. *Food Microbiology*, 59, 85–91. H
- Díaz, M., del Río, B., Sanchez-Llana, E., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Alvarez, M. A. 2018. *Lactobacillus parabuchneri* produces histamine in refrigerated cheese at a temperature-dependent rate. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(10), 2342–2348.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., & Nisbaid, A. 2003. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 113-122.

- Fitzgerald, DJ, Stratford, M., Gasson, MJ, Ueckert, J., Bos, A. y Narbad, A. 2004. Modo de acción antimicrobiana de la vainillina frente a *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* y *Listeria innocua*. *Revista de microbiología aplicada*, 97 (1), 104-113.
- Guarcello, R., De Angelis, M., Settanni, L., Formiglio, S., Gaglio, R., Minervini, F. & Gobbetti, M. 2016. Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(23), 6870-6880.
- International Society of DAO deficiency. 2022. La histamina. Dirección URL: <https://www.deficitdao.org/el-deficit-de-dao/la-histamina/>. [Consulta: 18 Ag. 2022]
- Møller, C. O. D. A., Castro-mejía, L., Krych, L., & Rattray, F. P. 2021. Histamine-forming ability of *Lentilactobacillus parabuchneri* in reduced salt Cheddar cheese. *Food Microbiology*, 98, Article 103789.
- Møller, C. O. D. A., Ücok, E. F., & Rattray, F. P. 2019. Histamine forming behaviour of bacterial isolates from aged cheese. *Food Research International*, 128, Article 108719.
- Moniente, M., García-Gonzalo, D., Llamas-Arriba, M. G., Virto, R., Ontañón, I., Pagán, R., & Botello-Morte, L. 2022. Potential of histamine-degrading microorganisms and diamine oxidase (DAO) for the reduction of histamine accumulation along the cheese ripening process. *Food Research International*, 160.
- Nievas Arias, M., & Hijós Larraz, L. A. 2020. Intolerancia a la histamina: tratamiento. Revisión bibliográfica. (Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza).
- Özogul, F., Kuley, E., & Kenar, M. 2011. Effects of rosemary and sage tea extract on biogenic amines formation of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. *International journal of food science & technology*, 46(4), 761-766.
- Özkütük, A. S. 2022. Antimicrobial effects of carnosic acid, kaempferol and luteolin on biogenic amine production by spoilage and food-borne pathogenic bacteria. *Food Bioscience*, 46, 101588.
- Palomares. 2009. Guía de prácticas correctas de higiene del sector del pescado. Ed: FEDACOVA
- Verlee, A., Mincke, S., & Stevens, C. V. 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate polymers*, 164, 268-283.
- Vinci, G., Restuccia, D., & Antiochia, R. 2011. Determination of biogenic amines in wines by HPLC-UV and LC-ESI-MS: A comparative study. *Sci. Technol. La Chim. l'Industria*, 9, 128-135.
- Walsh, S.E., Maillard, J.Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E., Charbonneau, D.L. y Bartolo, R.G. 2003. Actividad y mecanismos de acción de agentes biocidas seleccionados sobre bacterias grampositivas y negativas. *Revista de microbiología aplicada*, 94 (2), 240-247.
- Yesudhasan, P., Al-Zidjali, M., Al-Zidjali, A., Al-Busaidi, M., Al-Waili, A., Al-Mazrooei, N., & Al-Habsi, S. 2013. Histamine levels in commercially important fresh and processed fish of Oman with reference to international standards. *Food Chemistry*, 140(4), 777-783.