



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

Caracterización de la actividad antimicrobiana del
coproducto de la naranja procesada

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Marina Morales, Blanca

Tutor/a: Pagán Moreno, M^a Jesús

Cotutor/a: Nogueroles Meseguer, Ana Teresa

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Caracterización de la actividad antimicrobiana del coproducto de la naranja procesada

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Blanca Marina Morales
TUTOR/A ACADEMICO: Dra. M^a Jesús Pagan Moreno
COTUTOR/A: Ana Teresa Noguerol Meseguer
Grupo CUINA. Dto. Tecnología de Alimentos UPV.

Curso Académico: 2021-2022

VALENCIA, septiembre 2022

TÍTULO. “CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL COPRODUCTO DE LA NARANJA PROCESADA”.

RESUMEN

La citricultura española produce cerca de 7 millones de toneladas de cítricos al año, de las que más del 50% corresponden a las cortezas y membranas del endocarpio que quedan fuera de la cadena alimentaria humana, generando un gran impacto al medio ambiente debido a la cantidad de desechos generados en la producción. La población está cada vez más sensibilizada respecto a la sostenibilidad, por lo que se pretende gestionar bien estos desechos mediante su reutilización.

La biomasa que compone estos residuos es rica en agua, fibra dietética, proteínas, minerales, aceites esenciales y otros compuestos bioactivos como vitaminas, flavonoides y carotenoides. Dada la capacidad inhibidora del crecimiento de microorganismos que se ha atribuido a algunos de los componentes antes mencionados, en el presente trabajo se pretendió caracterizar la actividad antimicrobiana de dos co-productos en polvo de la naranja procesada denominados COP y COZ. El primero compuesto por el flavedo y albedo, obtenido después de pelar las naranjas y el segundo resultante de los restos de naranja tras extraer el zumo y compuesto por flavedo, albedo, celdillas y restos de zumo.

Inicialmente, la actividad antimicrobiana se determinó mediante las técnicas rápidas, frente a la microbiota de la carne, no observándose actividad antimicrobiana del COP y si del COZ. Mediante modelos primarios de crecimiento microbiano se analizó el comportamiento de la microbiota de la carne y diferentes microorganismos diana (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp.* y *Listeria innocua*) frente a este segundo co-producto testando diferentes concentraciones, 2 y 5 % (p/v). Los resultados obtenidos indican que el COZ presenta actividad antimicrobiana frente a la microbiota de la carne y frente a *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.* Por lo tanto, podría ser utilizado para alargar la vida útil de los productos cárnicos.

PALABRAS CLAVE: co-productos de la naranja, actividad antimicrobiana

RESUM

La citricultura espanyola produeix prop de 7 milions de tones de cítrics a l'any, de les quals més del 50% corresponen a les escorces i membranes de l'endocarpi que queden fora de la cadena alimentària humana, generant un gran impacte al medi ambient degut a la quantitat de deixalles generades en la producció. La població està cada vegada més sensibilitzada respecte a la sostenibilitat, per la qual cosa es pretén gestionar bé aquestes deixalles mitjançant la seua reutilització.

La biomassa que compon aquests residus és rica en aigua, fibra dietètica, proteïnes, minerals, olis essencials i altres compostos bioactius com a vitamines, flavonoides i carotenoides. Donada la capacitat inhibidora del creixement de microorganismes que s'ha atribuït a alguns dels components abans esmentats, en el present treball es va pretendre caracteritzar l'activitat antimicrobiana de dues co-productes en pols de la taronja processada

denominats COP i COZ. El primer compost pel flavedo i albedo, obtingut després de pelar les taronges i el segon resultant de les restes de taronja després d'extraure el suc i compost per flavedo, albedo, cel·les i restes de suc.

Inicialment, l'activitat antimicrobiana es va determinar mitjançant les tècniques ràpides, enfront de la microbiota de la carn, no observant-se activitat antimicrobiana del COP i sí del COZ. Mitjançant models primaris de creixement microbià es va analitzar el comportament de la microbiota de la carn i diferents microorganismes diana (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp.* i *Listeria innocua*) enfront d'aquest segon co-producte testant diferents concentracions, 2 i 5% (p/v). Els resultats obtinguts indiquen que el COZ presenta activitat antimicrobiana enfront de la microbiota de la carn i enfront de *Staphylococcus sp.* i *Pseudomonas sp.* Per tant, podria ser utilitzat per a allargar la vida útil dels productes carnis.

PARAULES CLAU: co-productes de la taronja, activitat antimicrobiana

ABSTRACT

Spanish citrus cultivation produces about 7 million tons of citrus fruits per year, of which more than 50% correspond to the crusts and membranes of the endocarp that are left out of the human food chain, generating a great impact on the environment due to the amount of waste generated during production. The public is increasingly aware of sustainability and the intention is to manage these wastes well through reuse.

The biomass that makes up these wastes is rich in water, dietary fiber, proteins, minerals, essential oils and other bioactive compounds such as vitamins, flavonoids and carotenoids. Given the growth inhibitory capacity of microorganisms that has been attributed to some of the above mentioned components, the aim of this work was to characterize the antimicrobial activity of two powdered co-products of processed orange called POPs and COZs. The first is made up of flavedo and albedo, obtained after peeling the oranges and the second is made up of flavedo, albedo, cells and leftovers of juice. Initially, antimicrobial activity was determined by rapid techniques, against the microbiota of the meat, with no antimicrobial activity observed by the POP and only by the COZ. Using primary microbial growth models, the behaviour of the meat microbiota and different target microorganisms (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp.* and *Listeria innocua*) against this second co-product was analyzed by testing different concentrations, 2 and 5% (w/v). The results indicate that COZ has antimicrobial activity against meat microbiota and against *Staphylococcus sp.* and *Pseudomonas sp.* It could therefore be used to extend the shelf life of meat products.

KEY WORDS: co-product of orange, antimicrobial activity

1. INTRODUCCIÓN

La citricultura ocupa un destacado papel en el sector agrícola en España debido a la creciente producción, fundamentalmente en la zona sur y mediterránea de la península (Estruch, 2007). Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación de España, en la temporada 2020-2021, la producción de cítricos alcanzó los 7.045 millones de toneladas, lo que supone un incremento del 6% respecto al promedio de las cinco campañas anteriores. Este aumento en el consumo de frutas y verduras parece que va a continuar en el tiempo, lo que supone la generación de una gran cantidad de desechos tras su procesado por la industria alimentaria (González, 2018; Agencia Europea del Medio Ambiente, 2014). Esto conlleva un grave problema de gestión y que debe ser resuelto de acuerdo con las inquietudes de las nuevas generaciones (Galvis, 2016).

En los últimos años se está produciendo un cambio trascendente en la actitud de la población en general, frente a importantes aspectos de nuestra forma de vida. Dos de estos aspectos son la alimentación y el medio ambiente, los cuales a su vez se encuentran íntimamente relacionados (González de Molina, 2011).

La población busca, cada vez más, desechar los productos químicos utilizados en la industria alimentaria y reemplazarlos por productos naturales que nos permitan suplir sus funciones (García, 2020; Overstreet, 2020). Por otra parte, somos cada vez más conscientes de la necesidad de gestionar adecuadamente los desechos que provocan daños ecológicos, y no existe gestión mejor que la máxima reutilización de estos (García et al., 2019).

Por ello, la industria alimentaria debe innovar y desarrollar nuevos productos para satisfacer las necesidades de los consumidores y de la sociedad en general (Rojo et al., 2018; Quiroga-Parra et al., 2014).

Por lo tanto, conseguir el aprovechamiento de estos subproductos, ha orientado las investigaciones en los distintos campos, de modo que se consiga reducir el impacto ambiental combinado, además, con la obtención de una rentabilidad económica (Moncayo et al., 2018).

De toda la producción de cítricos, más del 50% deriva en desechos ya que no están incluidos en la cadena alimentaria para el consumo humano (Fernández, 2015). Si analizamos todos estos subproductos, encontramos elementos interesantes en su composición, como pueden ser las membranas del endocarpio y las cortezas las cuales son ricas en agua, proteínas, minerales, aceites esenciales, fibra, e incluso compuestos bioactivos como vitaminas, carotenoides o flavonoides, los cuales pueden ser aprovechados en la propia industria alimentaria (Londoño et al., 2012), tanto para el consumo humano como animal, debido a sus valiosos componentes. En el caso de la cáscara de la naranja encontramos azúcares, almidón, ligninas, pectinas, aceites esenciales, que debidamente tratados pueden sustituir de una forma natural a los productos sintéticos (Ordoñez-Gómez et al., 2018; Olabinjo et al., 2017).

Como ejemplo de estos aprovechamientos destacan: (i) el uso de la pectina en la industria pastelera (Yuste et al., 2003), (ii) obtención de azúcares sencillos que con la posterior fermentación permiten obtener bioetanol (Ayala

et al., 2016), (iii) fertilizantes orgánicos evitando los productos químicos (Rojas et al., 2015), (iv) alimentación para el ganado o en la fabricación de piensos (Ríos et al., 2012; Cabrera-Núñez et al., 2020), (v) su uso como bioadsorbentes (Sánchez-Silva et al., 2020) y, (vi) alimentos con valor nutricional añadido.

Como podemos observar, existen multitud de posibilidades, que además podrían ser rentables ecológicamente con claros beneficios para el medio ambiente y, muy importante, rentables económicamente, aspecto fundamental para asegurar su éxito. A pesar de todo ello la reutilización sigue siendo insuficiente (Moncayo et al., 2018).

No es extraño, por tanto, que el número de empresas y centros de investigación que intentan conseguir un rendimiento a través de estos subproductos sea cada vez mayor.

Entre los elementos que constituyen estos desechos, resultan de especial interés los polifenoles que son compuestos sintetizados por plantas como metabolitos secundarios, y sobre los que cada vez existen más estudios que demuestran la multitud de efectos beneficiosos que poseen para mejorar nuestra salud (Gimeno, 2004; Quiñones et al., 2012). Estos compuestos fitoquímicos presentes en los vegetales poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antialérgicas, anticancerígenas entre otras (Tenorio, 2016). En el caso de la cáscara de la naranja encontramos una amplia variedad de estos compuestos (Ordoñez-Gómez et al., 2018). El uso de las plantas o alguna de sus partes en medicina ha acompañado al ser humano desde siempre, no obstante, en los últimos años están adquiriendo una gran relevancia debido tanto al ya mencionado interés por incorporar productos naturales ya sea en la medicina, en la cosmética y en la alimentación, como a la investigación para desarrollar nuevos productos con los que hacer frente a la creciente resistencia de las bacterias frente a los antibióticos comúnmente utilizados, impulsando así la búsqueda de nuevos principios activos y en concreto moléculas bioactivas en productos naturales (García, 2020; Overstreet, 2020).

Para este trabajo, es especialmente relevante la capacidad antimicrobiana y bactericida de estos metabolitos y su aplicación en la seguridad alimentaria (Castañeda-Antonio et al., 2018). Las técnicas utilizadas en la industria deben asegurar la eliminación de patógenos, pero sin alterar la calidad organoléptica y nutricional del propio alimento (Heredia et al., 2014). Para ello se usan sustancias naturales que presenten capacidad antimicrobiana, en sustitución de los productos sintéticos y el sometimiento a altas temperaturas que alteran la composición y características de los alimentos afectando a su calidad. Son muchas las bacterias que pueden acabar provocando problemas graves de salud y que son transmitidas por los alimentos (Zúñiga et al., 2017), entre ellas encontramos algunas especies de *Bacillus*, capaces de producir enterotoxinas que ocasionan trastornos intestinales, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Salmonella* y otras muchas como *Escherichia coli* que puede producir diversas toxinas y que encontramos en carnes crudas o no bien cocidas, y en productos frescos (Soto et al., 2015).

Respecto a los co-productos de la naranja, existen estudios que establecen la relación de esta capacidad inhibitoria frente al crecimiento de microorganismos como *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus* y *Candida*, con los componentes bioactivos presentes en la naranja (Condori, 2019). Además, la naranja contiene componentes bioactivos que poseen capacidad antimicrobiana. Entre sus componentes destaca el ácido ascórbico, el cual es una vitamina hidrosoluble que se oxida fácilmente; también la hesperidina y la narirutina que son componentes fenólicos que se encuentran en las frutas y los vegetales aportando sabor y color; los carotenoides ya que al ingerirlos se transforman en vitamina A la cual interviene en funciones principales del organismo destacando la función visual, el desarrollo fetal o mantenimiento de los tejidos blandos; o flavonoides que tienen poderosas funciones antioxidantes, antimicrobianas o antiinflamatorias determinantes en el sistema inmunológico (Galindo et al; 2022).

Para poder evaluar la capacidad antimicrobiana existen diversos métodos de laboratorio. Estos se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: métodos de difusión, métodos de dilución bien en caldo o agar, bioautografía y conductimétrico (Ramírez et al., 2009).

Una herramienta que también puede ser de utilidad es la microbiología predictiva, esta permite analizar el comportamiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones, combinando elementos de la microbiología, matemáticas y estadística. Existen diversas clasificaciones de los modelos que se pueden utilizar con tal fin: primarios, secundarios y terciarios. Los modelos primarios estudian el comportamiento de los microorganismos frente al tiempo y proporcionan datos sobre el incremento y la reducción de la población, producción de una toxina o metabolito (García et al., 2004; Cabeza, 2013). Los modelos secundarios relacionan las respuestas de los modelos primarios frente a variables ambientales (pH, temperatura, aw, etc.) (Baggini, 2015; Hernández 2017). Y finalmente, los modelos terciarios son el resultado de la combinación de los dos anteriores y su implementación en herramientas informáticas (García et al., 2004; Gutiérrez, 2011).

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antimicrobiana de dos coproductos de naranja frente a la microbiota de la carne y a cuatro microorganismos diana: *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas sp.* y *Staphylococcus sp.*

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Plan de trabajo

El plan de trabajo seguido para el desarrollo de este trabajo constó de dos fases, las cuales se muestran en la figura 1 y se detallan a continuación.

Fase 1. Testeo.

En esta primera fase se testeó la posible actividad antimicrobiana frente al microbiota de la carne. Se testaron dos co-productos procedentes de la naranja: el resultante de los restos de naranja tras extraer el zumo COZ (flavedo, albedo, celdillas y restos de zumo) y el compuesto por puré de

naranja COP (flavado y albedo). Se utilizaron dos técnicas: la difusión en agar y la dilución en caldo abreviado. Además, se utilizaron dos concentraciones de coproducto el 2 y 5% (p/v). El objetivo era determinar si estos coproductos podrían utilizarse como antimicrobianos en determinados productos alimentarios y se eligió la carne como modelo.

Fase 2. Microbiología predictiva: modelos primarios

En esta segunda fase se utilizó la herramienta de la microbiología predictiva y concretamente los modelos primarios para predecir el comportamiento de la microbiota de la carne frente al o los coproductos y dosis de estos que presentaron actividad en la primera fase. Posteriormente, se testó mediante la misma herramienta el comportamiento de diferentes cepas diana *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp.* y *Listeria innocua*.

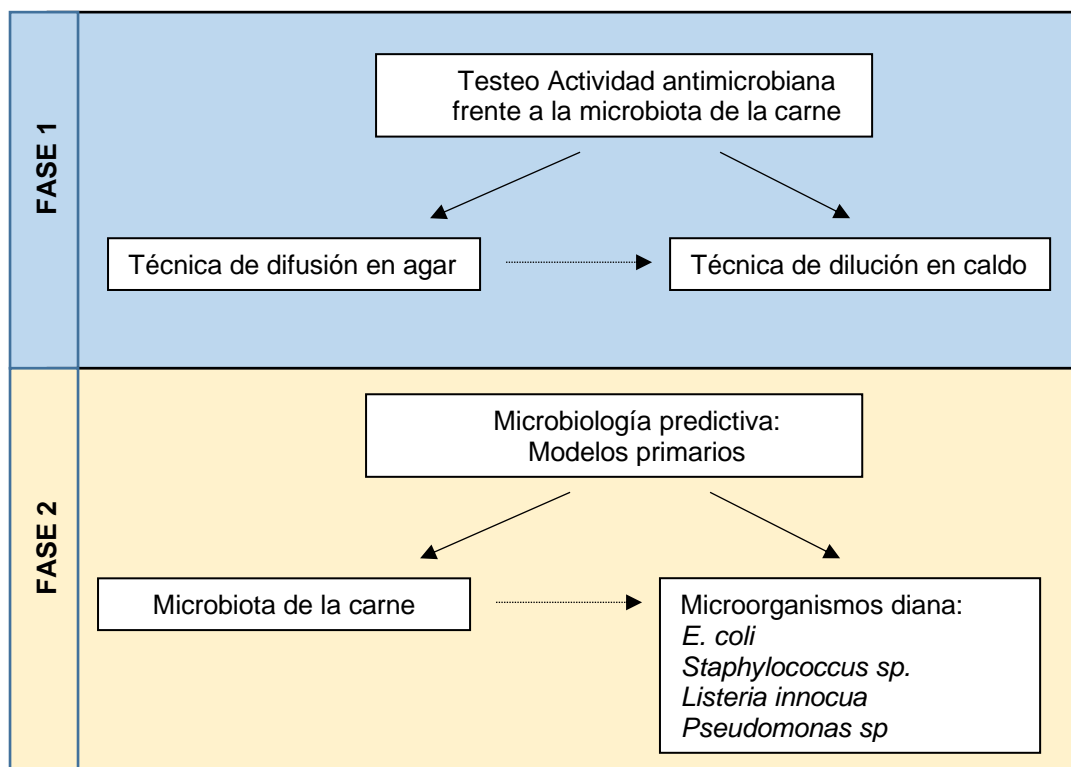


Figura 1. Plan de trabajo

2.2. Materiales

2.2.1 CO-PRODUCTOS

Se testaron dos co-productos procedentes de la naranja obtenidos siguiendo la metodología descrita por Ustero et al. (2021). El primero fue resultante de los restos de naranja tras extraer el zumo con exprimidor (exprimidor Lacor menaje profesional S.L., Guipúzcoa, España) que denominaremos COZ y compuestos por flavado, albedo, celdillas y restos de zumo. Y el segundo

compuesto por el flavedo y albedo, obtenido después de pelar las naranjas (Peladora Pelamatic S.L., Albalat de la Ribera, España) denominado COP. Los co-productos se trituraron y emulsionaron (Eurofred, España) con agua, añadida en la mínima cantidad que permitía una correcta trituración del coproducto. El agua se adicionó únicamente con la intención de facilitar el proceso, puesto que el co-producto de la naranja no contiene la suficiente cantidad de ésta para que al triturar se quede una mezcla suficientemente homogénea. La trituración se llevó a cabo durante 3 min por 1,5 kg de muestra. Posteriormente, las muestras fueron vertidas en bandejas de aluminio de 7 x 10 cm hasta llegar a 1 cm de espesor y se congelaron y almacenaron en un arcón congelador (Liebherr LGT 2325, Alemania) a -45 °C, durante al menos 24h hasta su secado por liofilización. El secado se realizó en un liofilizador (Telstar LYOQUEST-55, España). Las condiciones del proceso fueron de -50 °C en el condensador, una presión de 0,05 mbar y con las bandejas calefactadas a 50 °C durante 21 horas.

2.2.3. MICROORGANISMOS DIANA

Los microorganismos diana fueron adquiridos en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, España) y se adquirieron diferentes cepas de bacterias características de la carne: *Escherichia coli* (CECT516), *Pseudomonas sp.* (CECT 325), *Staphylococcus sp.* (CECT 325) y *Listeria innocua* (CECT 4030) liofilizadas a partir de las cuales se obtuvieron múltiples viales. Se determinó la concentración celular promedio por recuento de los viables en Agar Brain Heart Infusion (Scharlab S.L., España), los valores obtenidos vienen indicados en la tabla 1. Los viales se almacenaron en a una temperatura de -44 °C hasta su utilización.

Tabla 1. Recuento de viales (UFC/ml) de las cepas microbianas estudiadas.

Microorganismo	UFC/ml
<i>Listeria innocua</i> CECT 4030	7.75E+08
<i>Escherichia coli</i> CECT 516	3.30E+09
<i>Staphylococcus sp.</i> CECT 4033	1.05E+07
<i>Pseudomonas sp</i> CECT 325	4.00E+07
Microbiota carne	7.90E+09

La microbiota de la carne fue obtenida a partir de carne adquirida en una carnicería local. Esta se dejó en nevera a una temperatura de 6 °C durante 1 día. A partir de esta se recogieron muestras que tras pasar por el Stomacher (IUL Instruments, Barcelona, España) se inocularon en Brain Heart Infusion caldo (Scharlab S.L., España) durante 24 h a 37 °C, obteniéndose así viales con microorganismos característicos de la carne. Los recuentos obtenidos para los viales de microbiota de la carne se muestran en la tabla 1. Estos se conservaron en las mismas condiciones que el resto de los microorganismos (-44 °C), hasta su utilización.

2.3. Metodología

2.3.1. TÉCNICA DE LA DIFUSIÓN EN AGAR

El método de difusión en agar fue descrito por Bauer y se conoce como método de Kirby-Bauer, la difusión puede realizarse en disco o en pozo y pretende establecer, cuantitativamente, el efecto que produce sobre una cepa de bacterias un conjunto de sustancias; presenta una relación entre el halo de inhibición del crecimiento de una cepa bacteriana en una placa de agar, con un medio adecuado de cultivo y la cantidad necesaria de sustancia para inhibir la cepa bacteriana (Ramírez et al., 2009). Por lo tanto, se basa en la capacidad de difusión de una cierta sustancia o disolución, en un agar o medio de cultivo sólido. Para ello, se analizó el efecto de diferentes extractos a diferentes concentraciones (5 y 2 g/100 mL) frente a la microbiota de la carne. Los extractos con capacidad antimicrobiana que se testaron fueron los co-productos procedentes de la naranja: COZ y COP.

Para comprobar la capacidad antimicrobiana, se partió de un vial de microbiota extraída de la carne, la cual se sembró en un bote con un medio de cultivo, en este caso de Brian Heart Infusion (BHI caldo) (Scharlau, Barcelona, España). Este se incubó a 37 °C durante 24 h obteniéndose una carga microbiana de 10^8 UFC/mL. A continuación, se realizaron las diluciones necesarias para obtener una carga estandarizada de 10^5 UFC/placa.

Para la preparación de las placas Petri, se agregó 1 mL de la dilución de microorganismo estandarizada. Luego se adicionaron 15 mL de agar BHI (Scharlau, Barcelona, España) quedando una concentración de 10^5 UFC en placa. Las placas se dejaron a temperatura ambiente dentro de la campana de flujo laminar hasta que el agar solidificó. A continuación, se realizaron 5 pocillos de 9 mm de diámetro en cada una.

En cada pocillo se inocularon 100 μ L de los distintos extractos antimicrobianos (COZ y COP) a las diferentes concentraciones (2 y 5% p/v), añadiendo en uno de ellos 100 μ L de agua estéril como control negativo. A continuación, en la figura 2 se muestra un ejemplo de cómo se distribuyeron los extractos y la muestra control sobre una placa Petri.

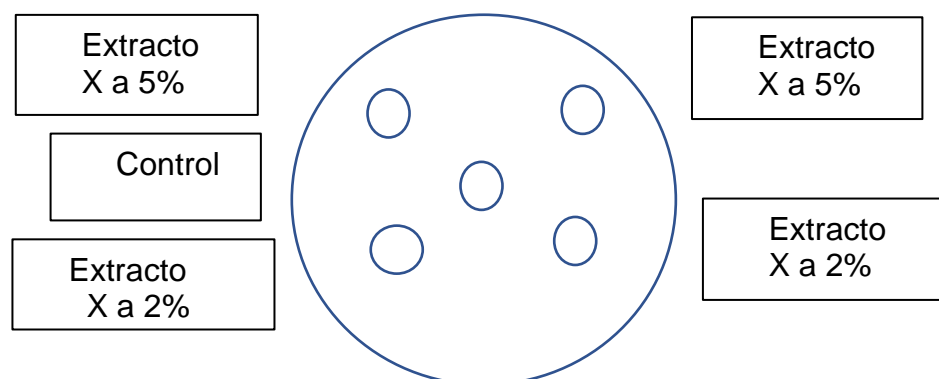


Figura 2. Ejemplo de una placa Petri con la inoculación de los extractos en los pocillos.

Tras asegurarse de que el extracto se había absorbido en el agar, se incubaron las placas a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se examinaron las placas para poder detectar la presencia de zonas de inhibición del crecimiento microbiano alrededor de los pocillos, en forma de halos. En los casos donde se observó inhibición se midió el diámetro con un pie de rey.

2.3.2. TÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO ABREVIADA

El método de dilución en caldo utiliza microplacas o tubos que contienen los extractos a las concentraciones a analizar y los microorganismos diana, microbiota de la carne en este caso. Para llevar a cabo este proceso, se prepararon tubos con medio de BHI a los que se añadió 1 mL de microbiota de la carne, reactivado como viene indicado en el apartado 2.3.1. Como partimos de una concentración de 10^8 UFC/mL, se realizan diluciones hasta conseguir la concentración de 10^5 UFC/mL. A continuación, se añadieron los distintos extractos a las concentraciones (2 y 5 g/100 mL). Se prepararon tres series de tubos. Una de ellas para el patrón sin co-producto y otras cuatro con los co-productos. Todos los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h y se analizó la presencia de turbidez y en caso de que esta fuese menor que la observada en tubo patrón sin co-productos, se realizó una dilución seriada y recuentos de las diluciones 10^{-1} hasta 10^{-3} y la siembra en profundidad en BHI agar (Scharlau, Barcelona, España), inoculándose 1 mL e incubándose a 37 °C durante 24 h.

2.3.3. CURVAS DE CRECIMIENTO

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de la microbiota de carne y de los diferentes microorganismos diana en Brain Heart Infusion (BHI) (Scharlau, Barcelona, España) sin adición de coproducto (control) y con adición de COZ al 2 y 5% (p/v). Para lo cual se procedió a la reactivación de los microorganismos diana y microbiota de la carne tal como se indica en el apartado 2.3.1. Posteriormente, se inocularon a una concentración de 10^5 UFC/mL en botes con 100 mL de BHI con y sin coproducto. Los botes fueron mantenidos en estufa a las temperaturas adecuadas para cada microorganismo (*Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y microbiota de la carne a 37 °C y *Pseudomonas sp.* a 30 °C). Se cogieron muestras cada 2 h, es decir, a los tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 24 h. Para cada tiempo se hicieron diluciones seriadas en agua de peptona y siembra en masa en BHI agar. Estas placas se incubaron a la temperatura indicada para cada microorganismo durante 24 h.

Una vez realizados todos los recuentos se realizó la modelización de los datos experimentales con el software Combase (www.combase.cc). El desarrollo de las cepas en estudio se modelizó en base a los modelos primarios de crecimiento para obtener los parámetros característicos del desarrollo microbiano: μ = velocidad de crecimiento (log UFC/mL·h⁻¹); λ = tiempo de latencia (h); MDP=máxima densidad poblacional (log UFC/mL); N_0 = carga microbiana inicial (log UFC/mL) y R^2 = coeficiente de correlación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Fase 1: Testeo de la actividad antimicrobiana frente a la microbiota de la carne.

Como se mostró en el plan de trabajo (figura 1) la primera fase de este trabajo fue testar si los extractos utilizados COZ y COP tenían actividad antimicrobiana frente a la microbiota de una matriz alimentaria, seleccionándose en este trabajo la carne.

Al utilizar la técnica de difusión en agar se pudo observar que debido a las características que poseían dichos extractos se producía dificultad para difundir, por lo que no apareció halo.

Estos resultados llevaron a evaluar su actividad antimicrobiana mediante la técnica de dilución en caldo, considerándose la reducción o no del crecimiento microbiano entre la concentración inicial 10^5 UFC/mL y la observada en una dilución 10^{-3} . Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados obtenidos a partir de la técnica rápida de dilución.

Co-producto	Concentración (g/100 mL)	Reducción a las 24 h
COZ	2	> 3 log
	5	≥ 3 log
COP	2	Sin efecto
	5	Sin efecto

3.2. Fase 2: Microbiología predictiva: Modelos primarios de crecimiento

En base a los resultados obtenidos en la fase 1 de este estudio y visto que el coproducto COP no ejercía acción antimicrobiana, se decidió analizar el comportamiento del COZ sobre la microbiota de carne y microorganismos diana (*Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Pseudomonas sp.*) a las concentraciones de 2 y 5% (p/v).

3.2.1. MICROBIOTA DE LA CARNE

En la figura 3 se muestran las curvas de crecimiento modelizadas para la muestra control (sin co-producto) y para las muestras adicionadas de COZ al 2 y 5 % (p/v). En la tabla 3 se pueden observar los resultados de los parámetros característicos del crecimiento obtenidos a partir de dicha modelización.

La curva de crecimiento control de la microbiota de la carne muestra tres fases: latencia, crecimiento exponencial y estacionaria. La fase de latencia tuvo una duración de 4 h, la fase exponencial se alargó hasta las 13 h y a partir de ahí se observa una estabilización de los recuentos hasta las 24 h. La velocidad máxima de crecimiento fue de $0,796$ [(log UFC/ml) h^{-1}].

Con una dosis de 2% de antimicrobiano COZ se detectaron cambios en esta curva, puesto que se observó una reducción de la concentración inicial de un logaritmo, además la fase de latencia disminuyó de 4 h a aproximadamente 2 h. Sin embargo, la velocidad de crecimiento de los microorganismos fue

inferior que, en el caso del control, quedando siempre el crecimiento por debajo del crecimiento de la muestra control y llegando a una concentración final también menor, siendo la reducción de 1.234 log UFC/g.

A la dosis de 5% se observó el mismo patrón que a la concentración 2%, pero con esta concentración la máxima densidad poblacional (MDP) fue menor que a la concentración 2%. En este caso la reducción de la MDP fue 2.222 log UFC/mL por lo que se podría decir que tiene un poder antimicrobiano algo superior una vez transcurridas 24 h.

Por lo tanto, el efecto antimicrobiano en la microbiota de la carne ha sido el esperado, ya que a medida que aumenta la concentración de antimicrobiano se reduce el crecimiento.

En conclusión, se puede decir que cuanto mayor es la concentración de COZ, mayor es la reducción de crecimiento de la flora bacteriana consiguiendo reducir hasta en 2.222 log UFC/mL con la dosis de 5% (p/v) de COZ. Estos datos pueden corroborarse con diferentes estudios científicos. El estudio de Campo et al. (2017) demuestra el efecto antimicrobiano de los extractos de la cáscara de naranja con quitosano. Este estudio afirma que la mezcla de estos en diferentes concentraciones presentó una mayor inhibición en el crecimiento de una población bacteriana debido a que el quitosano aumenta la solubilidad. Además, al estar cargados positivamente interfieren en los residuos cargados negativamente alterando la permeabilidad de la membrana. A todo esto, se suma que, la cáscara de la naranja aumenta la solubilidad al acidificar la solución y potencia, por tanto, la actividad antibacteriana del quitosano consiguiéndose la inhibición de la microbiota.

Se comprobó esta reducción de la población bacteriana también en los extractos de aceite esencial de dos variedades de mandarina según el estudio de Martínez (2003). Se veía que ambas variedades inhibían el crecimiento de la población bacteriana, aunque para una de ellas esta inhibición fue mayor. Pero la diferencia entre las diferentes variedades puede radicar en la composición de los aceites, el método de extracción, la variedad, el índice de madurez o las condiciones de almacenamiento.

Al igual que en los estudios anteriores, en nuestro trabajo también se ve el efecto antimicrobiano sobre la microbiota de la carne. Según la tabla 3 y la figura 3 se comprueba que a medida que aumenta la concentración de antimicrobiano se reduce el crecimiento, por lo tanto, el resultado ha sido el esperado y abriría la posibilidad del uso del COZ como antimicrobiano en productos cárnicos. No obstante, es relevante analizar el comportamiento de diferentes microorganismos diana frente al COZ para poder determinar el poder antimicrobiano de este.

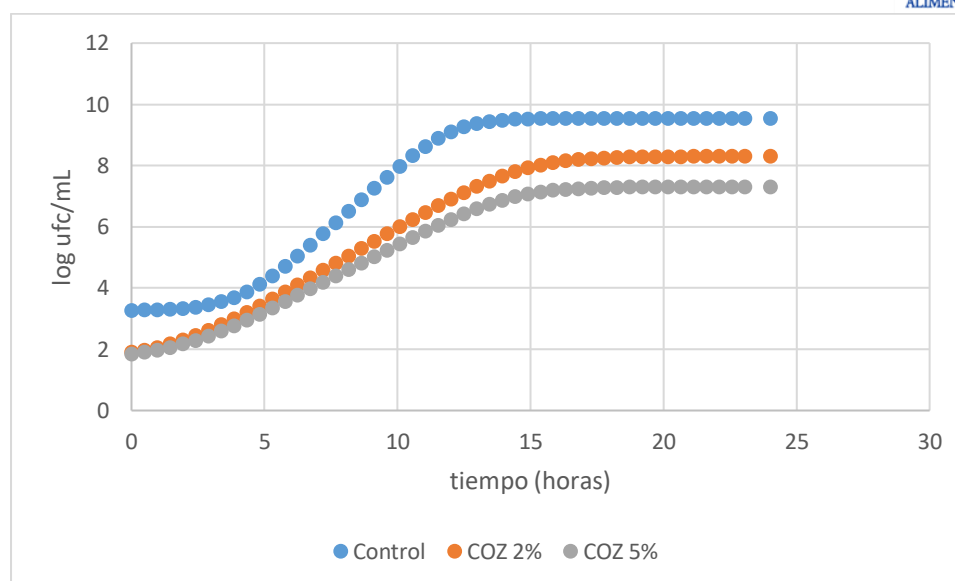


Figura 3. Curvas de crecimiento de la microbiota de la carne modelizadas a partir de los recuentos obtenidos: control (sin co-producto) y con co-producto COZ al 2% y 5% (p/v).

Tabla 3. Parámetros de crecimiento para la microbiota de la carne obtenidos a partir de las modelizaciones.

Muestra	Modelo	R ²	SE	y ₀	μ _{max}	λ	MDP
Control	Baranyi y Roberts completo	0,992	0,239	3,269	0,796	4,0905	9,533
COZ 2%	Baranyi y Roberts completo	0,988	0,275	1,899	0,505	1,925	8,299
COZ 5%	Baranyi y Roberts completo	0,977	0,327	1,848	0,45	2,0993	7,311

μ_{max}: velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log UFC/ml)h⁻¹]

λ: tiempo de latencia (h)

y₀: Numero inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

R²: coeficiente de correlación.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

3.2.2. LISTERIA INNOCUA

En el caso de *Listeria innocua* las curvas de crecimiento modelizadas se muestran en la figura 4 y los parámetros característicos del crecimiento obtenidos a partir de la modelización en la tabla 4, esto tanto para el control sin co-producto, como para las muestras adicionadas de un 2% y un 5 % (p/v) de COZ. El comportamiento del de la muestra control sigue las mismas pautas que en el caso de la microbiota de la carne, con una primera fase de latencia seguida de una fase exponencial de crecimiento que perdura hasta las 15 h y una última de estacionaria hasta las 24 h.

Como se puede ver en la tabla 4, con una dosis de antimicrobiano COZ de 2% (p/v) vemos que se producen cambios puesto que aumentó la fase de latencia de aproximadamente 2.6 h a 6.6 h. El máximo exponencial se produce aproximadamente a las 12 h y después los recuentos no siguen incrementándose hasta el final del experimento.

Con el antimicrobiano COZ al 5% (p/v) se ven también diferencias, ya que no existe esa fase de latencia y se podría decir que toda la curva es exponencial como podemos observar en la figura 4. No obstante, al ser la velocidad de crecimiento inferior a la detectada para el control y muestras con COZ al 2%, los recuentos son inferiores entre las 10 y 24 h.

Por lo tanto, se puede concluir que existe un efecto del COZ al 2% retrasando el desarrollo de *Listeria innocua* y que el COZ al 5% incide sobre la velocidad de crecimiento de esta. No obstante, a las 24 h apenas se detectan diferencias entre las máximas densidades poblacionales alcanzadas, solo puede verse un efecto, aunque pequeño, a la dosis de 2% de antimicrobiano COZ.

Frente a *L. innocua* no se ha observado el efecto deseado en nuestro estudio con las cantidades añadidas de COZ debido a que el efecto conseguido ha sido mínimo, apenas imperceptible. Sin embargo, en el estudio de Baltodano et al. (2020) sí que se observó actividad antimicrobiana mediante la utilización de aceites esenciales de la cáscara de la naranja. Este efecto antimicrobiano se debió a la presencia de compuestos bioactivos como como el limoneno, terpeno, octanal y mirceno (Castañeda-Antonio et al., 2018), además de linalol y timol. Además de todos estos compuestos también puede deberse al contenido en polifenoles como son los flavonoides y flavonas que provocan mayor efecto antimicrobiano (Ordoñez-Gómez et al., 2018; Zampini et al., 2007).

Otro estudio que nos comprueba su efecto antimicrobiano es el de Alavez et al. (2012) donde se determinó la actividad antimicrobiana de extractos de naranja agria y lima dulce sobre dicho microorganismo. La mayor actividad se obtuvo en los extractos etanólicos del flavedo de la lima, pero aún se obtuvieron mayores efectos con las combinaciones binarias de los extractos de la naranja y la lima juntos. La combinación binaria que presentó mayor efecto antimicrobiano fue el flavedo de la lima y la semilla de la lima y los resultados de tal estudio pueden deberse a los compuestos polares presentes en ambos frutos como los polifenoles, los cuales poseen actividad antimicrobiana. Así se determinó, que esta combinación binaria tenía un efecto microbiano elevado ya que inhibía el crecimiento de *L. innocua*.

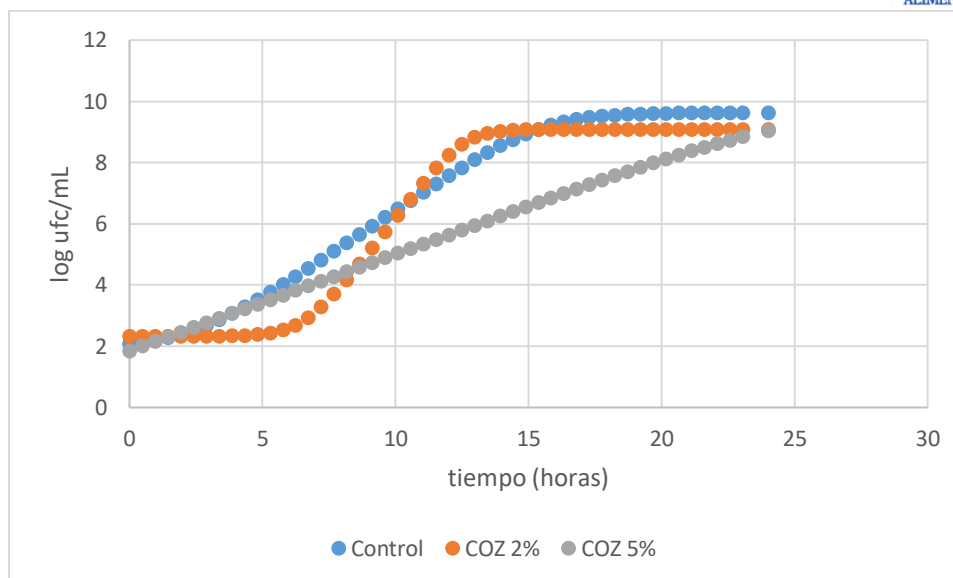


Figura 4. Curvas de crecimiento de *Listeria innocua* modelizadas a partir de los recuentos obtenidos: control (sin co-producto) y con co-producto COZ al 2% y 5%.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento para *Listeria innocua* obtenidos a partir de las modelizaciones.

Muestra	Modelo	R ²	SE	y ₀	μ _{max}	λ	MDP
Control	Baranyi y Roberts completo	0,996	0,194	2,0708	0,589	2,579	9,63
COZ 2%	Baranyi y Roberts completo	0,986	0,347	2,324	1,145	6,621	9,0773
COZ 5%	Baranyi y Roberts sin fase de latencia	0,979	0,343	1,855	0,316	-	9,744

μ_{max}: velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log UFC/ml)h⁻¹]

λ: tiempo de latencia (h)

y₀: Numero inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

R²: coeficiente de correlación.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

3.2.3. STAPHYLOCOCCUS SP.

En la figura 5 se muestran los resultados de la modelización para las muestras control y las adicionadas de COZ. En el caso del control se observa una mínima fase de latencia, seguida de una fase exponencial donde el microorganismo crece muy rápido hasta las 12 h aproximadamente, y ya por último la fase estacionaria.

Si se añade una concentración de 2% de antimicrobiano COZ se observan cambios puesto que se produce la eliminación de la fase de latencia antes existente, y se empieza directamente con la fase exponencial, pero a una

concentración reducida de células iniciales con respecto a la muestra control. Por último, está la fase estacionaria, donde se observa una reducción significativa de la MDP de aproximadamente 2.1 log UFC/mL respecto al control.

En el caso de añadir una dosis de 5%, sigue el mismo patrón que a dosis 2%, sin fase de latencia y con una reducción significativa de la máxima densidad poblacional respecto al control y del orden de aproximadamente 3 log de UFC/mL.

Staphylococcus sp. fue sensible a los extractos de cítricos ya que se reducía el crecimiento notablemente según el estudio de Rodríguez et al. (2017). Estos cítricos contienen metabolitos secundarios, los cuales son sustancias bioactivas con diversas propiedades antimicrobianas. Según estudios realizados, estos compuestos fenólicos son sustancias sintetizadas por plantas que son capaces de formar interacciones proteicas con proteínas intracelulares, además de formar complejos con la pared celular de las bacterias provocando la lisis celular (Sikkema et al., 1994). Otra sustancia también involucrada son los terpenoides cuya capacidad antimicrobiana proviene de provocar la desestabilización en la permeabilidad de la membrana ya que interfieren con los protones (Tsuchiya et al., 1996). Al presentar estos cítricos estos compuestos bioactivos se produce un efecto antimicrobiano sobre la cepa *Staphylococcus Sp.*

A través del estudio de Mercado et al. (2015) también se determinó la inhibición de esta cepa con los extractos de mandarina. Se vio una reducción de la población de *Staphylococcus sp.* a medida que aumentaba la concentración del extracto ya que éste estaba compuesto por sustancias orgánicas como terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que tenían un alto poder antimicrobiano. Además, esta inhibición fue mayor debido a las características y composición de la pared del microorganismo.

El trabajo realizado por Martínez et al. (2014) evidencia que el extracto del limón produce una reducción en los recuentos de la cepa de *Staphylococcus Sp.* Esta inhibición del crecimiento de la bacteria viene dada por la presencia de ácido cítrico ya que posee cualidades que potencian el efecto antibacteriano. Cuanto mayor es la cantidad de ácido cítrico, mayor es la inhibición del microorganismo.

El estudio realizado en este trabajo llega a la misma conclusión y por lo tanto se consiguió el efecto deseado, puesto que cuanto más antimicrobiano se añade, mayor es la reducción del crecimiento microbiano.

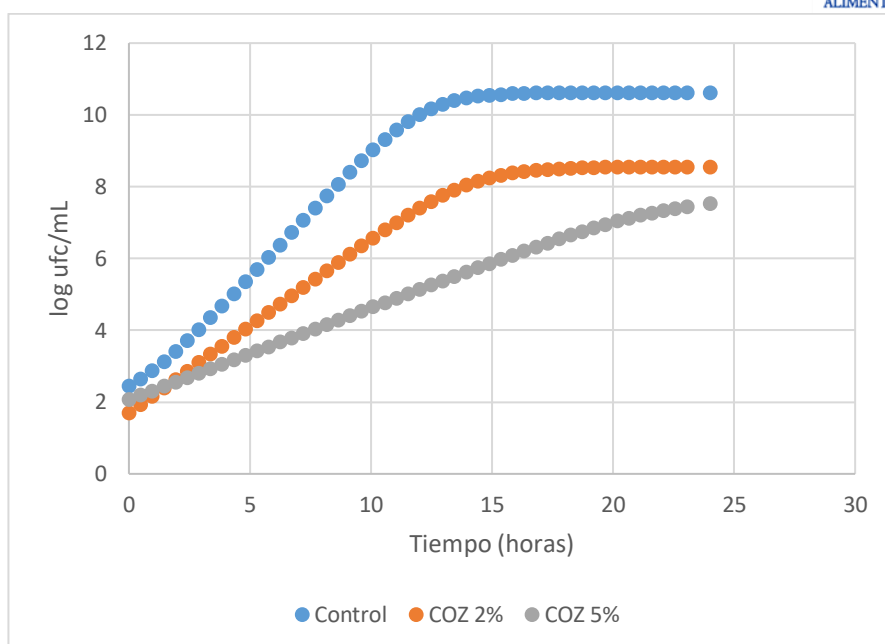


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Staphylococcus sp.* modelizadas a partir de los recuentos obtenidos: control (sin co-producto) y con co-producto COZ al 2% y 5%.

Tabla 5. Parámetros de crecimiento para *Staphylococcus sp.* obtenidos a partir de las modelizaciones

Muestra	Modelo	R ²	SE	y ₀	μ _{max}	λ	MDP
Control	Baranyi y Roberts completo	0,983	0,405	2,437	0,723	0,796	10,619
COZ 2%	Baranyi y Roberts sin fase de latencia	0,976	0,4	1,692	0,488	-	8,548
COZ 5%	Baranyi y Roberts sin fase de latencia	0,913	0,568	2,066	0,256	-	7,725

μ_{max}: velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log UFC/ml)h⁻¹]

λ: tiempo de latencia (h)

y₀: Numero inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

R²: coeficiente de correlación.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

3.2.4. *ESCHERICHIA COLI.*

En el caso de *E.coli*, la figura 6 y tabla 6 muestran su evolución que es la siguiente: empieza con una fase de latencia, a continuación una fase exponencial corta y por ultimo una fase estacionaria muy larga de unas 16 h.

Con el antimicrobiano COZ a dosis de 2%, se reduce la fase de latencia con una concentración inicial de células reducidas a la mitad, al igual que

también se reduce a la mitad la velocidad de crecimiento, luego sigue con la fase exponencial más larga y una fase estacionaria más corta.

Para finalizar, a dosis de 5% de COZ, aumenta la fase de latencia con respecto a dosis de 2% y el número de células iniciales es prácticamente similar. Le sigue una fase exponencial prolongada en el tiempo y se reduce con respecto a la muestra control y a dosis de 2%. La MDP consigue reducirse en 0.2537 log UFC/mL con respecto a la muestra control. Por lo tanto, el efecto antimicrobiano buscado no ha resultado concluyente. A pesar de nuestros resultados se han buscado estudios donde si se ve este efecto microbiano.

Como se muestra en el estudio de Torrenegra (2017) se observó actividad antimicrobiana de los aceites del extracto de la naranja frente a este microorganismo. Esta inhibición se produjo gracias a la composición de su pared ya que *E.coli* está formada solo por un 10% de peptidoglicano, y además tres polímeros, lipoproteína, membrana externa y lipopolisacárido, este último tiene un lípido A que favorece la entrada por disolución de los aceites esenciales por su carácter hidrofóbico.

En otro estudio, Picón (2013) muestra que los subproductos cítricos utilizados de limón, naranja y mandarina han reducido considerablemente el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7, siendo la mandarina el que más efecto antimicrobiano posee debido a su carácter bacteriostático y bactericida. La sensibilidad de un microorganismo en este caso de *E.coli* viene determinada por varios factores como la temperatura, la composición de los subproductos de limón, naranja y mandarina y la propia especie, además del pH que provoca mayor inhibición bacteriostática y bactericida siendo ácido el pH (Gabriel et al., 2010).

Otro estudio que avala el efecto antimicrobiano es el propuesto por Proaño et al. (2017) el cual indica que se produce la inhibición de *Escherichia coli* frente a la vitamina C, vitamina E y aceite esencial de romero. Con la combinación de estos 3 productos se produce una sinergia entre todos los componentes para causar esta inhibición ya que la vitamina C contiene componentes antioxidantes que provocan este poder (Castaño et al., 2010; Silva-Flores et al., 2017).

En el presente estudio *Escherichia coli* no fue sensible al antimicrobiano COZ de la naranja. El efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli* no ha sido muy concluyente puesto que no se han visto inhibiciones significativas.

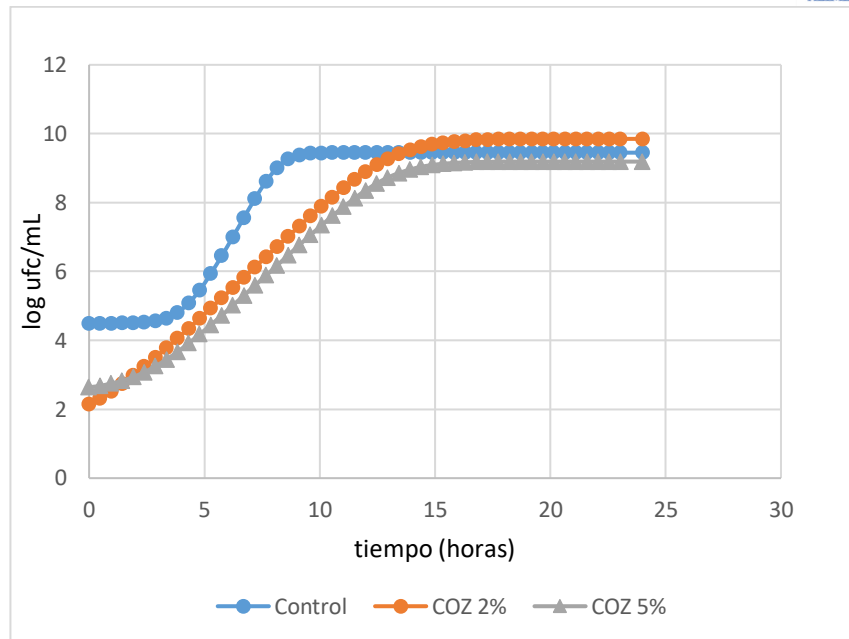


Figura 6. Curvas de crecimiento de *E.coli* modelizadas a partir de los recuento: control (sin co-producto) y con co-producto COZ al 2% y 5%.

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de *E.coli* obtenidos a partir de las modelizaciones.

Muestra	Modelo	R ²	SE	y ₀	μ _{max}	λ	MDP
Control	Baranyi y Roberts completo	0,952	0,534	4,501	1,196	4,149	9,447
COZ 2%	Baranyi y Roberts completo	0,989	0,355	2,151	0,632	0,897	9,852
COZ 5%	Baranyi y Roberts completo	0,987	0,3	2,64	0,622	2,46	9,1933

μ_{max}: velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log UFC/ml)h⁻¹]

λ: tiempo de latencia (h)

y₀: Número inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

R²: coeficiente de correlación.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

3.2.5. *PSEUDOMONAS SP.*

La curva de crecimiento de *Pseudomonas* se caracteriza, como observamos en la figura 7 y tabla 7, por una fase de latencia muy corta seguida de una fase exponencial que se alarga hasta las 15 h y una última estacionaria.

En el caso de añadir una dosis de 2% de antimicrobiano COZ vemos cambios, ya que desaparece la fase de latencia y con un crecimiento menor inicial de células, le sigue la fase exponencial que crece hasta las 16 h, pero con una reducción significativa de su crecimiento, puesto que la velocidad de

crecimiento es de 0,36 (log UFC/ml) h⁻¹ frente a 0,512 (log UFC/ml) h⁻¹ para el control, y ya por último la fase de estacionaria que es muy corta. Respecto a la MDP se aprecia una reducción de 1.523 log UFC/mL respecto al control.

A dosis de 5% de COZ, sí que aparece la fase de latencia, seguida de una última fase exponencial con una reducción del crecimiento (velocidad máxima de crecimiento de 0,27(log UFC/ml) h⁻¹, y en este caso sin fase estacionaria.

Los valores de MDP indican una reducción de aproximadamente 2 log UFC respecto al patrón y 0.5 log UFC respecto a las muestras con 0.2% de COZ.

Al analizar la evolución se detecta por lo tanto que a mayor concentración de co-producto menor es el crecimiento de *Pseudomonas*.

En el estudio de Torrenegra (2017) se observó actividad antimicrobiana de los aceites del extracto de la naranja frente a *Pseudomonas sp.* Esta inhibición se produjo debido a la composición de su pared ya que está formada solo por un 10% de peptidoglicano, y un lípido A que favorece la entrada por disolución de los aceites esenciales por su carácter hidrofóbico. Así se produce el efecto antimicrobiano deseado, ya que cuanto mayor es la cantidad de extracto menos es el crecimiento de la cepa en cuestión.

En el estudio de Sabino et al. (2018) se aprecian efectos antimicrobianos significativos. Los extractos estudiados son aceites esenciales de la lima tahiti y de la pera naranja. Estos aceites contienen d-limoneno el cual provoca la reducción de la población bacteriana de *Pseudomonas sp.* Además, la extracción de estos compuestos con diclorometano premió con una capacidad antimicrobiana mayor.

Nuestros resultados concuerdan con los vistos en los estudios, puesto que, si existe efecto antimicrobiano por parte del COZ de la naranja frente a *Pseudomonas sp.*

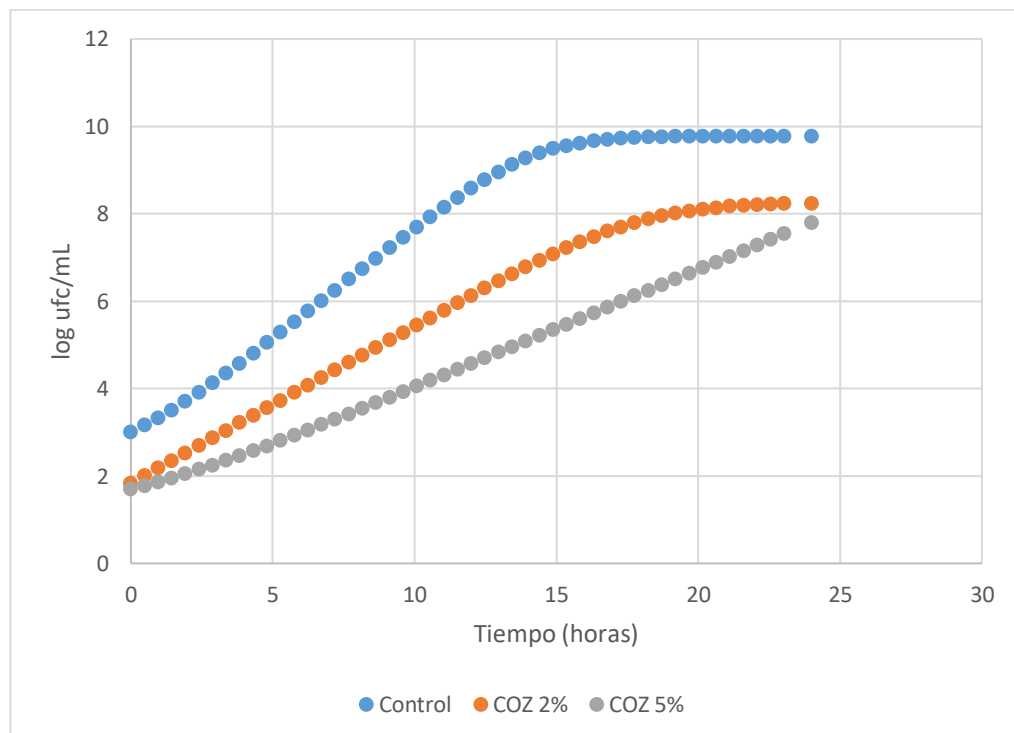


Figura 7. Curvas de crecimiento de *Pseudomonas* modelizadas: control (sin co-producto) y con co-producto COZ al 2% y 5%.

Tabla 7. Parámetros de crecimiento de *Pseudomonas sp.* obtenidos a partir de las modelizaciones.

Muestra	Modelo	R ²	SE	y ₀	μ _{max}	λ	MDP
Control	Baranyi y Roberts completo	0,976	0,426	3,0166	0,512	0,868	9,795
COZ 2%	Baranyi y Roberts sin latencia	0,971	0,397	1,843	0,36	-	8,272
COZ 5%	Baranyi y Roberts completo	0,977	0,311	1,714	0,27	1,385	7,800

μ_{max}: velocidad máxima de crecimiento de crecimiento [(log UFC/ml)h⁻¹]

λ: tiempo de latencia (h)

y₀: Numero inicial de células (unidades logarítmicas)

MDP: Número final de células (unidades logarítmicas)

R²: coeficiente de correlación.

SE: Error estándar del ajuste (desviación estándar estimada de los valores independientes observados, asumidos como constantes).

4. CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo era determinar la capacidad antimicrobiana de dos co-productos de la naranja sobre la microbiota de la carne y diferentes microorganismos diana.

1. El co-producto COP compuesto por flavedo y albedo, testado por técnicas rápidas, no presenta actividad antimicrobiana frente a la microbiota de la carne.
2. El co-producto COZ compuesto por flavedo, albedo, celdillas y restos de zumo, sí que presenta actividad antimicrobiana al utilizar técnicas rápidas de testeo.
3. Mediante el análisis del efecto del COZ sobre el crecimiento de la microbiota de la carne y microorganismos diana, utilizando modelos primarios, se ha podido observar una reducción en la máxima densidad poblacional, al cabo de 24 horas, en el caso de la microbiota de la carne y para los microorganismos diana *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.* siendo este efecto mayor a la concentración 5% de COZ.
4. Por lo contrario, no se observa un claro efecto antimicrobiano frente a *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.
5. Por lo tanto, efecto antimicrobiano del COZ difiere en función del tipo de microorganismo considerado. En este estudio, su eficacia es frente a dos microorganismos alterantes de la carne como son *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.*, y a la microbiota de la carne, por lo que este co-producto podría ser un posible antimicrobiano para alargar la vida útil de la carne y los productos cárnicos.

6. Otro aspecto a considerar es que los resultados de este trabajo indican la necesidad de analizar el comportamiento de los microorganismos tanto alterantes como patógenos, de forma individualizada, frente a estos co-productos para asegurarse de su efectividad.

Este estudio es una primera aproximación para la utilización de estos co-productos procedente de la naranja como antimicrobiano en matrices cárnicas. Se deben realizar más estudios para conocer si son eficaces en las diferentes matrices cárnicas, debiendo estudiar las posibles sinergias con otros ingredientes.

5. REFERENCIAS.

- Agencia Europea del Medio Ambiente. (2014). De la producción a los residuos: el sistema alimentario.
<https://www.eea.europa.eu/downloads/c893805e9fdf4dc08919c147f461ba27/1636108366/de-la-produccion-a-los.pdf>
- Alavez AI., Villanueva SJ., Lugo OY., García MD. 2012. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de extractos de naranja agria (*Citrus aurantium*) y lima dulce (*Citrus limetta* risso) sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19114. Tecnología de Alimentaria; Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
- Ayala JR., Montero G., Campbell HE., Sagaste CA., León JA, Coronado MA., García C., Torres R. 2016. Aprovechamiento de los residuos de cascara de naranja para la obtención de azúcares. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química Memorias del XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Baggini SP. 2015. Seguridad alimentaria, bromatología y microbiología de los alimentos.
- Cabeza EA. 2013. Aplicación de la Microbiología predictiva para la determinación de la vida útil de los alimentos. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona.
- Cabrera-Núñez A., Lammoglia-Villagómez M., Martínez-Sánchez C., Rojas-Ronquillo R., Montero-Solís F. 2020. Utilización de subproductos de naranja (*Citrus sinensis* var. *valencia*) en la alimentación para rumiantes Abanico vet vol.10.
- Campo YV., Delgado MA., Roa Y., Mora G. 2017. Efecto antimicrobiano del quitosano y cascara de naranja en el tratamiento de aguas residuales. Rev. investig. Altoandín. vol.19 no.4 Puno
- Condori DR. 2019. Determinación de capacidad inhibitoria microbiana con aceite esencial de Naranja (*Citrus x sinensis*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por el método antibiograma. Universidad paeruana Union.
- Castañeda-Antonio A., Rivera-Tapari A., Choy-Flores E., Munguía-Pérez R., Portillo-Reyes R., Muñoz J. 2018. Antimicrobial activity evaluation of residual orange oil. Cuadernos de Investigación UNED, vol. 10, núm. 2, pp. 469-474. Universidad Estatal a Distancia de Costa Rica
- Castaño HI., Ciro G., Zapata JE., Jiménez SI. 2010. Actividad Bactericida del extracto etanólico de hoja y del aceite esencial de hoja de *Rosmarinus officinalis* sobre algunas bacterias transmitidas por los alimentos. Vitae vol.17 no.2 Medellín
- Estruch, V. 2007. La citricultura española. Evolución y perspectivas de futuro.
- Fernández A. 2015. Parte del libro: Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina.
- Gabriel A. A., Nakano H. 2010. Responses of *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 cand *Salmonella enteritidis* to pH, aw and temperature stress combinations. Food Control, 21:644-650.



- Galindo RG., Chis MS., Martínez-Navarrete N., Camacho MM. 2022. Dried orange juice waste as a source of bioactive compounds. Emerald Insight.
- Galvis González, JA. 2016. Residuos sólidos: problema, conceptos básicos y algunas estrategias de solución. Revista Gestión y Región N° 22; pp. 7-28.
- García G. 2020. La demanda por productos naturales va en crecimiento. <https://thefoodtech.com/tendencias-de-consumo/la-demanda-por-productos-naturales-va-en-crecimiento/>
- García RM., Socorro AF., Maldonado AV. 2019. Manejo y gestión ambiental de los desechos sólidos, estudio de casos. Universidad y Sociedad vol.11 no.1 Cienfuegos ene.-mar.
- García RM, Zurera G. 2004. Modelización predictiva de desarrollo bacteriano en los alimentos. *Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus Rabanales. Universidad de Córdoba. ANALES - VOL. 17(1) - DIC. 2004 - REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ANDALUCÍA ORIENTAL*
- Gimeno E. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Elsevier. Vol. 23. Núm. 6. páginas 80-84
- González, CG. 2018. Frutas y verduras perdidas y desperdiciadas, una oportunidad para mejorar el consumo. Rev. chil. nutrición vol.45 no.3 Conjunto Santiago.
- González de Molina, M. 2011. La importancia de la agricultura ecológica para el medio ambiente y la salud. Libro Alimentación, salud y medio ambiente. Página 10.
- González-Gómez D., Cardoso V., Bohoyo D., Ayuso MC., Delgado-Adámez. 2014. Aplicación de la metodología de diseño experimental y superficie de respuesta para optimizar el procedimiento de obtención de un extracto acuoso bactericida y altamente antioxidante a partir de la piel de naranja. Volumen 35, Numero 1, Páginas 252-259.
- Gutiérrez ME. 2011. Modelos sugeridos como herramientas para la microbiología predictiva en la industria de los alimentos. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Heredía N., Dávila-Aviña JE., Solís L., García S. 2014. Meat products: main pathogens and non-thermal control strategies. *Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. NACAMEH Vol. 8, Sup. 1, pp. S20-S42.*
- Hernández A. 2017. La Microbiología predictiva en la industria cárnica. Universidad de La Laguna Departamento de Microbiología.
- Londoño J., Sierra J., Álvarez R., Restrepo A., Pássaro C. 2012. Aprovechamiento de los subproductos cítricos. Corporación Universitaria Lasallista, 343-367.
- Martínez J., Sulbarán de Ferrer B., Ojeda de Rodríguez G., Ferrer A., Nava R. 2003. Antibacterial activity of mandarin essential oil. Rev. Fac. Agron. v.20 n.4 Caracas
- Martínez K. Applications of predictive microbiology on food industry. Facultad de Ciencias sección Biología.
- Martínez KP, Lamk LO., Álvarez AC. 2014. Antimicrobial effect of white vinegar and lemon over staphylococcus aureus creole salad restaurants in the school feeding program (EAP) San Jose Cúcuta. @LIMENTECH CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA ISSN 1692-7125. Volumen 12, No. 1, p. 48-54
- Moncayo MR., Reyes A., Carrillo ML. 2018. Aprovechamiento de subproductos agronómicos. *TLATEMOANI. Revista Académica de Investigación.* Editada por Eumed.net. No. 29
- Narváez M. 2018. Aprovechamiento de residuos agroindustriales cítricos. Agencia Informativa Conacyt.
- Olabinjo O., Ogunlowo, AS., Ajayi, O., Olalusi, AP. 2017. Analysis of physical and chemical composition of sweet orange (Citrus sinensis) peels. Agriculture and Biotechnology, 2(4).
- Ordoñez-Gómez ES., Reátegui-Díaz D., Villanueva-Tiburcio JE. 2018. Total polyphenols and antioxidant capacity of peel and leaves in twelve citrus. Scientia Agropecuaria vol.9 no.1
- Overstreet K. 2020. Un panorama de la industria de productos orgánicos y naturales. <https://www.mundopmmi.com/procesamiento/article/21194834/un-panorama-de-la-industria-de-productos-orgnicos-y-naturales>



- Pérez E., Rivas A. 2021. Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos. Universitat Politècnica de València
- Picón E. 2013. Capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos de limón, naranja y mandarina frente a *Escherichia coli* 0157:H7 y *Salmonella thyphimurium*. Universitat Politècnica de València.
- Proaño J., Urresta P., Racines M. 2017. Efecto antimicrobiano de la vitamina c, vitamina e y aceite esencial de romero (*rosmarinus officinalis*) en salchichas de pollo tipo Frankfurt. Revista Datos Industriales 20(2): 27-36.
- Quiñones M., Miguel M., Aleixandre M. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición Hosp. vol.27 no.1
- Quiroga-Parra D., Hernández B., Torrent-Sellens J., Ramírez JF. 2014. La innovación de productos en las empresas. Caso empresa América Latina. Cuadernos del CENDES, vol. 31, núm. 87, pp. 63-85. Universidad Central de Venezuela Caracas, Venezuela.
- Ramírez LS., Marín D. 2009. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. Scientia et Technica Año XV, No 42. Universidad Tecnológica de Pereira
- Ríos M., Ramírez L. 2012. Taking advantage of the ruminal bovine content or fattening of rabbit farms, as strategic to decimate the contamination caused by the slaughterhouse in San Alberto. *Prospect. Vol. 10, No. 2, págs. 56-63*
- Rodríguez CN., Zarate AG., Sanchez LC. 2017. Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical significance in Colombia. Artículo original producto de la investigación.
- Rojas MD., Sánchez JD., Londoño LM. 2015. An Innovation Strategy in Organic Fertilizer by Fuzzy Logic. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 68(1): 7423-7439.
- Rojo MA., Bonilla DM., Masaquiza CS. 2018. El desarrollo de nuevos productos y su impacto en la producción: caso de estudio BH Consultores. Universidad y Sociedad vol.10 no.1
- Sabino A., Aparecida S. 2018. Evaluación de actividad antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales de cítricos. Revista científica multidisciplinaria base de conocimiento. año 03, Ed. 06, vol. 03, pp. 106-118.
- Sánchez-Silva J., González-Estrada R., Blancas-Benítez FJ., Fonseca-Cantabrana A. 2020. Utilización de subproductos agroindustriales para la bioadsorción de metales pesados. TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. Vol. 23
- Sikkema J., De Bont JA., Poolman B. 1994. Interacciones de hidrocarburos cíclicos con membranas biológicas. J Biol Chem 269 (11): 8022-8.
- Silva-Flores PG., Galindo-Rodríguez SA., Pérez-López LA., Álvarez-Román R. 2017. Essential oils free and encapsulated as potential antioxidants in skin. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 48, núm. 2, pp. 7-15.
- Soto Z., Pérez L., Estrada D. 2015. Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at Colombia. Salud Uninorte, vol. 32, núm. 1, pp. 105-122
- Tenorio M. 2016. Flavonoides extraídos de la cáscara de naranja tangelo (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sachá inchi (*Plukenetia volubilis*). Scientia Agropecuaria vol.7 no.4
- Torrenegra ME., Pájaro NP., León G. 2017. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 46(2), 160-175.
- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama., Tanaka., Linuma M. 1996. Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de las flavanonas fitoquímicas frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. J Etnofarmacología 50 (1): 27-34.
- Ustero I. 2021. Diferencia composicional de los coproductos del zumo y el puré de naranja. TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. Universitat Politècnica de València
- Yarce, C. J. (2013). Microbiología predictiva: una ciencia en auge. *INGE@ UAN-Tendencias en la Ingeniería*, 3(6).



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

- Yuste J., Garza S. 2003. Los geles de pectina y su aplicación en la industria alimentaria. ISSN 0300-5755, N° 342, 2003, págs. 93-98
- Zampini IC., Vera NR., Bardon A., Isia MI. 2007. Flavonoides bioactivos (Antioxidantes y antimicrobianos) aislados de *Baccharis incarum*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 6, núm. 5, 2007, p. 292
- Zúñiga IR., Caro J. 2017. Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. ENF INF MICROBIOL 37 (3): 95-104.