

**APLICACIÓN CONJUNTA DE INGREDIENTES NATURALES Y
TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS PARA LA CONSERVACIÓN
DE ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS**

...

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Clara Miracle Belda Galbis

Para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València.

Dirigida por:

Antonio Martínez López

María Dolores Rodrigo Aliaga

València, marzo de 2017

El Dr. D. Antonio Martínez López, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y la Dra. Dña. María Dolores Rodrigo Aliaga, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta Clara Miracle Belda Galbis para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València, con el título *Aplicación conjunta de ingredientes naturales y tecnologías no térmicas para la conservación de alimentos mínimamente procesados*, ha sido realizado bajo nuestra dirección, en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman este certificado en Paterna, a 29 de noviembre de 2016.

Antonio Martínez López

María Dolores Rodrigo Aliaga

La presente tesis doctoral se enmarca en el Programa de Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria de la Universitat Politècnica de València.

El trabajo experimental se llevó a cabo con fondos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y de la Unión Europea a través de una beca predoctoral JAE-Predoc, cofinanciada por el Fondo Social Europeo (FSE); con fondos de la Unión Europea a través del proyecto *Natural antimicrobials for innovative and safe packaging* (NAFISPACK; Referencia: 212544), financiado por el Séptimo Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico (7PM), y con fondos del Gobierno de España y de la Unión Europea a través de los proyectos *Combinación de ingredientes naturales y tecnologías no térmicas en la estabilización de bebidas de origen vegetal. Aspectos microbiológicos, nutricionales y físico-químicos* (Referencia: AGL2010-22206-C02-01ALI) y *Validación de tecnologías no térmicas de conservación de alimentos: Establecimiento de la seguridad microbiológica* (Referencia: AGL2013-48993-C2-2-R), ambos cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

En homenatge al iaio Vicent, a la iaia Mila, al iaio Juan i a la iaia Lola.

Especialment dedicat als meus pares, Albert i Maria Dolors.

A la meua germana, Aina.

I, com no, a Pablo.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin los conocimientos, la colaboración y el apoyo de muchos. Aprovechando este espacio, quisiera dar las gracias a todos aquellos que de una manera u otra han hecho posible, o más llevadero, el inicio, el desarrollo y la culminación del mismo.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis: al Dr. Antonio Martínez López y a la Dra. Loles Rodrigo Aliaga. Gracias por confiar en mí y por brindarme esta oportunidad; por vuestras enseñanzas, consejos, cercanía y dedicación; por ayudarme a crecer, incluso en lo personal, y también por ayudarme materializar un sueño. Porque esta experiencia ha sido positiva y enriquecedora, sin duda, gracias a vosotros.

En segundo lugar me gustaría dejar constancia de lo agradecida que estoy a quienes han sido mis compañeros y amigos de escritorio y bancada, durante más o menos tiempo, en el laboratorio 206. Para empezar, agradezco mucho la cálida acogida que recibí cuando llegué, porque enseguida me sentí cómoda e integrada. Además, en el progreso del trabajo experimental ha sido un placer compartir despacho y pipetas con un montón de compañeros y amigos estupendos, con quienes he pasado momentos muy buenos. Del primero al último, todos formáis parte de este proyecto; por tanto, muchas gracias a todos.

En especial a Cheche Climent, por ser tan alegre y generosa, por tus consejos y apoyo; a Ángela Silva, por acompañarme en mis primeras curvas; a Chelo Pina, por tu ayuda con el análisis de riesgos; a Alejandro Rivas, por explicarme cómo funciona el equipo de pulsos; a Jose Valenciano y a Toni Mayo, por echarme

una mano cuando iba a tope y por lo divertidísima que fue vuestra estancia en el laboratorio; a Josepa Espinosa, a Antonio Jiménez, a Susana Llorens y a Maria Sanz, por vuestra participación en la parte experimental; a Maria Sanz, además, por lo mucho que hemos trabajado y aprendido juntas, y en especial también a Nieves Criado, por tu aportación directa a los resultados del capítulo 5, por lo todo lo que hemos trabajado juntas, por tu apoyo y por todo lo que he aprendido contigo y de ti.

Más allá del 206, gracias al resto de compañeros y amigos del Departamento de Conservación y Calidad de Alimentos. Gracias a mis compañeros y amigos de biblioteca, donde escribí buena parte de la tesis y donde me sentí como en casa. Gracias a mis compañeros y amigos en otros departamentos. Y, en general, a todo el personal del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, porque igualmente han hecho posible este trabajo, y porque todos han sido más o menos responsables de que haya estado tan a gusto durante mi estancia en el centro. Con mucho cariño, en especial, a Cati Segura.

Además, agradezco el haber podido colaborar con miembros del Instituto Nofima AS, en especial con Anders Leufvén, y también con el grupo dirigido por Ana Frígola y María José Esteve del Àrea de Nutrició i Bromatologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València; en concreto, con Francisco Barba y Juana Carbonell.

Y fuera del ámbito profesional, muchísimas gracias a todos los que se han interesado y preocupado por la tesis y por mí, a todos los que me han animado y a todos lo que se han alegrado con cada avance. Entre ells, i fonamentalment, per suposat, gràcies a la meua família.

Als meus pares, Albert i Maria Dolors, a qui els hi dedique molt especialment aquesta tesi. Perquè els meus assoliments són vostres; per tot l'esforç que heu

invertit en el meu desenvolupament personal, acadèmic i professional; per la vostra ajuda i el vostre suport; perquè a vosaltres us ho dec tot. Per això, espere estar a l'altura i que estigueu orgullosos de mi.

A ma germaneta Aina. Gràcies per la teua col·laboració i el teu suport, per la teua complicitat... Per moltíssimes coses, totes imprescindibles per a mi.

I, finalment, a Pablo. Infinites gràcies per tot; temps, ànims, paciència, consells, correccions, correccions, rialles i més, molt més! Sempre i sense condicions. Perquè entre tots dos tot és més fàcil i millor. Perquè junts, ho he aconseguit.

Resumen

La conservación de alimentos tiene como principal objetivo garantizar su estabilidad y seguridad microbiológica, al menos, durante el tiempo de vida útil. Para ello, tradicionalmente se han aplicado tratamientos térmicos intensos. Sin embargo, desde hace algunos años se buscan alternativas porque la aplicación de calor merma las propiedades de cualquier alimento, mientras que el consumidor demanda productos poco procesados, sin aditivos sintéticos. En respuesta a esta demanda, hoy en día se promueve la aplicación de tecnologías de conservación no térmicas y el uso de antimicrobianos de origen natural, que permitan cumplir con la legislación vigente y, a la vez, mantener o mejorar el perfil nutricional, sensorial y funcional de los alimentos frescos. En este sentido se ha desarrollado la tecnología de barreras, que propone la combinación de métodos con efectos sinérgicos, para alcanzar los objetivos de estabilidad y seguridad planteados, minimizando la intensidad y el impacto de los métodos escogidos.

En consecuencia, la presente tesis doctoral plantea el estudio de una estrategia combinada para reducir o controlar la concentración de microorganismos patógenos en alimentos mínimamente procesados, libres de aditivos sintéticos. En concreto, se estudió el efecto obtenido al combinar el uso de antimicrobianos de origen vegetal con el procesado mediante altas presiones hidrostáticas para alargar la vida útil de bebidas vegetales elaboradas a partir de zumos de fruta fresca. En primer lugar se evaluó el potencial antimicrobiano del carvacrol, del citral, del asaí y de la estevia, desde un punto de vista cinético, en medio de referencia, a distintas temperaturas. A continuación se formuló una bebida

vegetal y se cuantificó el potencial antimicrobiano de la estevia, sola y combinada con la aplicación de altas presiones hidrostáticas, desde un punto de vista cinético, a distintas temperaturas. Por último, utilizando la metodología de superficies de respuesta se optimizó la combinación de métodos, valorando también su efecto sobre la inhibición de enzimas implicados en el deterioro de los alimentos, así como sobre el contenido total de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de la bebida formulada.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que carvacrol, citral, asaí y estevia podrían afectar la supervivencia o el crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos mínimamente procesados, y por lo tanto, que los cuatro podrían ser empleados como medidas adicionales para el control microbiológico durante el almacenamiento. Por otro lado, en vista de los resultados obtenidos en la bebida se demuestra que combinar la adición de estevia con la aplicación de altas presiones hidrostáticas podría ser una buena estrategia para cumplir con los estándares microbiológicos exigidos para zumos y bebidas similares. Además, la combinación podría (i) inhibir la acción de enzimas implicados en el pardeamiento (concretamente, las actividades polifenoloxidasas y peroxidasas); (ii) mejorar aspectos relacionados con la calidad funcional de las bebidas vegetales (habiéndose observado un incremento tanto en el contenido total de compuestos fenólicos como en la actividad antioxidante de un extracto obtenido a partir de zumos), y (iii) evitar la adición de azúcares o edulcorantes sintéticos (teniendo en cuenta el poder edulcorante de los esteviol glicósidos que se acumulan en las hojas de estevia).

Resum

La conservació d'aliments té com a principal objectiu garantir la seua estabilitat i seguretat microbiològica, almenys, durant el període de vida útil. Amb aquesta finalitat, tradicionalment s'han aplicat tractaments tèrmics intensos. No obstant això, des de fa alguns anys es busquen alternatives, perquè l'aplicació de calor minva les propietats de qualsevol aliment, mentre que el consumidor demanda productes escassament processats, sense additius sintètics. En resposta a aquesta demanda, actualment es promou l'aplicació de tecnologies de conservació no tèrmiques i l'ús d'antimicrobians d'origen natural, que permeten complir amb la legislació vigent i, alhora, mantenir o millorar el perfil nutricional, sensorial i funcional dels aliments frescos. En aquest sentit s'ha desenvolupat la tecnologia de barreres, que proposa la combinació de mètodes de conservació amb efectes sinèrgics, per a aconseguir els objectius d'estabilitat i seguretat plantejats, minimitzant la intensitat i l'impacte dels mètodes escollits.

En conseqüència, la present tesi doctoral planteja l'estudi d'una estratègia combinada per a reduir o controlar la concentració de microorganismes patògens en aliments mínimament processats, lliures d'additius sintètics. En concret, es va estudiar l'efecte obtingut en combinar l'ús d'antimicrobians d'origen vegetal amb el processament mitjançant altes pressions hidrostàtiques per a allargar la vida útil de begudes vegetals preparades a partir de suc de fruita fresca. Amb aquest objectiu, en primer lloc es va determinar el potencial antimicrobià del carvacrol, el citral, l'*açaí* i l'estèvia, des d'un punt de vista cinètic, en medi de referència, a diferents temperatures. A continuació, es va formular una beguda vegetal i es va quantificar el potencial antimicrobià de

l'estèvia, sola i combinada amb l'aplicació d'altres pressions hidrostàtiques, des d'un punt de vista cinètic, a diferents temperatures. Finalment, emprant la metodologia de superfícies de resposta es va optimitzar la combinació de mètodes, valorant també el seu efecte sobre la inhibició d'enzims implicats en la deterioració dels aliments, així com el seu efecte sobre el contingut total en compostos fenòlics i l'activitat antioxidant de la beguda desenvolupada.

D'acord amb els resultats obtinguts es conclou que carvacrol, citral, *açaí* i estèvia podrien afectar la supervivència o el creixement de microorganismes patògens en aliments mínimament processats, i per tant, que els quatre podrien ser emprats com a mesures addicionals per al control microbiològic durant l'emmagatzematge. D'altra banda, segons els resultats obtinguts en la beguda es demostra que combinar l'addició d'estèvia amb l'aplicació d'altres pressions hidrostàtiques podria ser una bona estratègia per a complir amb els estàndards microbiològics exigits per a sucs i begudes similars. A més, la combinació podria (i) inhibir l'acció d'enzims implicats en l'embruniment (en particular, les activitats polifenoloxidasa i peroxidasa), (ii) millorar aspectes relacionats amb la qualitat funcional de la beguda (havent-se observat un increment tant en el contingut total de compostos fenòlics com en l'activitat antioxidant d'un extracte obtingut a partir de sucs), i (iii) evitar l'addició de sucres o edulcorants sintètics (tenint en compte el poder edulcorant dels esteviol glicòsids que s'acumulen en les fulles d'estèvia).

Summary

The main goal of food preservation is to ensure foods' microbiological stability and safety, at least, during their shelf life. For this purpose, intense heat treatments have been traditionally applied. However, for some years now, there is a need to search for new alternatives because heat penalizes the properties of foods, while consumer demands for minimally processed products, without synthetic additives. In response to this demand, nowadays it is promoted the application of non-thermal preservation technologies and the use of natural antimicrobials, which allow compliance of the current legislation, while maintaining or improving the nutritional, sensory and functional profile of fresh foods. In this sense, the hurdle technology, which proposes the combination of preservation methods with synergistic effects, has been developed to achieve the objectives of stability and security by minimizing the intensity and the impact of the chosen methods.

Accordingly, this doctoral thesis poses the study of a combined strategy to reduce or control the concentration of pathogenic microorganisms in minimally processed foods, free of synthetic additives. Specifically, it was studied the effect of combining the use of plant-based antimicrobials with high pressure processing, to extend the shelf life of plant-based beverages, containing fresh fruit juices. With this aim, the antimicrobial potential of carvacrol, citral, açai and stevia was first evaluated, from a kinetic point of view, in reference medium, at different temperatures. Then, a plant-based beverage was formulated and the antimicrobial potential of stevia alone and in combination with the application of high hydrostatic pressures was quantified from a kinetic

point of view, at different temperatures. Finally, the combination was optimized using the response surface methodology, evaluating also its effect on the inhibition of enzymes involved in food spoilage as well as its effect on the total phenolic content and the antioxidant activity of the food developed.

According to the results, carvacrol, citral, açai and stevia could affect the survival or growth of pathogenic microorganisms in minimally processed foods. Therefore, those antimicrobials could be used as additional measures for microbiological control during storage. On the other hand, according to the results obtained in the beverage, combining the addition of stevia with high pressure processing could be a good strategy to meet the microbiological standards required for juices and similar foods. Furthermore, this combination could (i) inhibit the action of enzymes involved in browning (specifically, polyphenoloxidase and peroxidase activities), (ii) improve the functional quality of plant-based beverages (as an increase both in the total phenolic content and the antioxidant activity was observed in an extract obtained from juices), and (iii) avoid the addition of sugars or synthetic sweeteners (given the sweetening power of the steviol glycosides present in stevia leaves).

Índice de contenidos

| | |
|--|--------------|
| <i>Índice de tablas</i> | <i>xxxi</i> |
| <i>Índice de figuras</i> | <i>xxxv</i> |
| <i>Índice de ecuaciones</i> | <i>xxxix</i> |
| <i>Abreviaturas, siglas y símbolos</i> | <i>xliii</i> |



| | |
|---|----------|
| JUSTIFICACIÓN | 1 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 3 |
| a) Microorganismos patógenos transmitidos por alimentos | 3 |
| a.1) <i>Listeria monocytogenes</i> | 4 |
| a.2) <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | 7 |
| b) Procesado por altas presiones hidrostáticas como tecnología no térmica para la inactivación de microorganismos en alimentos | 9 |
| b.1) Fundamentos de la tecnología | 10 |
| b.2) Sistemas de tratamiento | 11 |
| b.3) Mecanismos implicados en la inactivación | 13 |
| b.4) Factores que influyen en la eficacia de la tecnología | 16 |
| c) Antimicrobianos de origen natural para garantizar la estabilidad microbiológica de los alimentos mínimamente procesados | 19 |
| c.1) Tipos | 21 |

| | |
|---|-----------|
| c.2) Factores que influyen en su eficacia | 23 |
| c.3) Otros aspectos a tener en cuenta para la aplicación de antimicrobianos de origen natural | 25 |
| d) Microbiología predictiva para modelizar y cuantificar el efecto de tecnologías y de conservantes antimicrobianos | 26 |
| d.1) Tipos de modelos | 28 |
| d.2) Etapas para la modelización | 31 |
| OBJETIVOS | 37 |
| PLAN DE TRABAJO | 39 |
| CAPÍTULOS DE LA TESIS | 43 |
| 1 Cuantificación del efecto antimicrobiano de aditivos alimentarios de origen vegetal en medio de referencia | 45 |
| 1.1 <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana del carvacrol ..</i> | 45 |
| 1.1.1 Introducción | 45 |
| 1.1.2 Material y métodos | 46 |
| - Microorganismos | 46 |
| - Procedimiento experimental | 48 |
| - Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos | 49 |
| 1.1.3 Resultados y discusión | 51 |
| - Efecto de la temperatura y de la concentración de carvacrol sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> K12 | 59 |
| - Efecto de la temperatura y de la concentración de carvacrol sobre el crecimiento de <i>Listeria innocua</i> | 60 |
| 1.1.4 Conclusión | 61 |
| 1.2 <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana del citral</i> | 62 |
| 1.2.1 Introducción | 62 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.2.2 | Material y métodos | 63 |
| - | Microorganismos | 63 |
| - | Procedimiento experimental | 64 |
| - | Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos | 64 |
| 1.2.3 | Resultados y discusión | 65 |
| - | Efecto de la temperatura y de la concentración de citral sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> K12 | 71 |
| - | Efecto de la temperatura y de la concentración de citral sobre el crecimiento de <i>Listeria innocua</i> | 72 |
| 1.2.4 | Conclusión | 73 |
| 2 | Cuantificación del efecto antimicrobiano de alimentos de origen vegetal en medio de referencia | 75 |
| 2.1 | <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana del asaí</i> | 75 |
| 2.1.1 | Introducción | 75 |
| 2.1.2 | Material y métodos | 77 |
| - | Preparación del cultivo microbiano | 77 |
| - | Procedimiento experimental | 78 |
| - | Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos | 79 |
| 2.1.3 | Resultados y discusión | 79 |
| - | Determinación del potencial antimicrobiano del asaí a temperatura óptima de crecimiento | 79 |
| - | Evaluación del potencial antimicrobiano del asaí en concentraciones no inhibitorias | 82 |
| 2.1.4 | Conclusión | 85 |
| 2.2 | <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de la estevia</i> ... | 86 |
| 2.2.1 | Introducción | 86 |
| 2.2.2 | Material y métodos | 88 |

| | |
|--|------------|
| - Preparación del cultivo microbiano | 88 |
| - Procedimiento experimental | 88 |
| - Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos | 89 |
| 2.2.3 Resultados y discusión | 90 |
| - Estudio del potencial antimicrobiano de distintos productos de estevia | 90 |
| - Efecto de la temperatura y de la concentración de estevia sobre el crecimiento microbiano | 92 |
| 2.2.4 Conclusión | 96 |
| 3 Evaluación del potencial antimicrobiano de una infusión de hojas secas de estevia en una matriz alimentaria | 97 |
| 3.1 <i>Introducción</i> | 97 |
| 3.2 <i>Material y métodos</i> | 98 |
| 3.2.1 Preparación del cultivo microbiano | 98 |
| 3.2.2 Formulación de la bebida | 98 |
| 3.2.3 Obtención de la bebida | 100 |
| 3.2.4 Estudio de la actividad antimicrobiana de la estevia en la bebida formulada | 100 |
| 3.2.5 Ajuste de los resultados a un modelo | 101 |
| 3.2.6 Estudio del daño subletal generado por la estevia a 37 y 10 °C | 102 |
| 3.3 <i>Resultados y discusión</i> | 103 |
| 3.3.1 Actividad antimicrobiana de la estevia en la bebida formulada | 103 |
| 3.3.2 Daño subletal generado por la estevia a 37 y 10 °C | 106 |
| 3.4 <i>Conclusión</i> | 110 |
| 4 Evaluación del potencial antimicrobiano de las altas presiones hidrostáticas combinadas con la adición de estevia en una matriz alimentaria | 111 |
| 4.1 <i>Introducción</i> | 111 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.2 | <i>Material y métodos</i> | 112 |
| 4.2.1 | Preparación del cultivo microbiano | 112 |
| 4.2.2 | Obtención de la bebida | 113 |
| 4.2.3 | Tratamiento de las muestras por altas presiones hidrostáticas | 113 |
| 4.2.4 | Estudio de la inactivación y el daño producidos con el procesado mediante altas presiones hidrostáticas, en la bebida con y sin estevia | 115 |
| 4.2.5 | Estudio de la actividad antimicrobiana de la estevia en la bebida formulada, tras ser sometida a altas presiones hidrostáticas, durante el almacenamiento posprocesado a distintas temperaturas | 115 |
| 4.3 | <i>Resultados y discusión</i> | 116 |
| 4.3.1 | Cinéticas de inactivación por altas presiones hidrostáticas para <i>Listeria monocytogenes</i> en la bebida formulada con y sin estevia | 116 |
| 4.3.2 | Inactivación y daño subletal producidos mediante altas presiones hidrostáticas en presencia y ausencia de estevia | 118 |
| 4.3.3 | Inactivación y daño subletal durante el almacenamiento posprocesado por altas presiones hidrostáticas, a distintas temperaturas, en la bebida con y sin estevia | 120 |
| 4.4 | <i>Conclusión</i> | 126 |
| 5 | Optimización de los factores implicados en la conservación de alimentos combinando la adición de estevia con la aplicación de altas presiones hidrostáticas | 127 |
| 5.1 | <i>Introducción</i> | 127 |
| 5.2 | <i>Material y métodos</i> | 128 |
| 5.2.1 | Preparación del cultivo microbiano | 128 |
| 5.2.2 | Obtención del extracto enzimático | 129 |
| 5.2.3 | Preparación de muestras de extracto con distintas concentraciones de estevia | 130 |

| | | |
|--------------------------------|--|------------|
| 5.2.4 | Tratamiento de las muestras mediante altas presiones hidrostáticas | 130 |
| 5.2.5 | Estudio de la inactivación microbiana | 131 |
| 5.2.6 | Determinación de las actividades enzimáticas polifenoloxidasas y peroxidasa | 131 |
| 5.2.7 | Determinación del contenido total de compuestos fenólicos | 133 |
| 5.2.8 | Determinación de la actividad antioxidante total ... | 135 |
| 5.2.9 | Diseño experimental, análisis de resultados y optimización empleando la metodología de superficies de respuesta | 139 |
| 5.3 | <i>Resultados y discusión</i> | 142 |
| 5.3.1 | Estudio del efecto de la estevia y de las altas presiones hidrostáticas sobre la inactivación microbiana, la actividad enzimática, el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante total del extracto estudiado | 142 |
| 5.3.2 | Optimización de la concentración de estevia y del procesado por altas presiones hidrostáticas para la obtención de un producto vegetal mínimamente procesado, seguro a nivel microbiológico, estable a nivel enzimático y óptimo a nivel funcional | 146 |
| 5.4 | <i>Conclusión</i> | 148 |
| DISCUSIÓN GENERAL | | 149 |
| ▶ | Actividad antimicrobiana del carvacrol y del citral en medio de referencia | 149 |
| ▶ | Actividad antimicrobiana del asaí y de la estevia en medio de referencia | 155 |
| ▶ | Actividad antimicrobiana de la estevia en una bebida a base de frutas..... | 159 |
| ▶ | Tratamiento por altas presiones hidrostáticas para la estabilización de una bebida vegetal con estevia | 161 |

| | |
|----------------------------|------------|
| CONCLUSIONES | 165 |
| BIBLIOGRAFÍA | 169 |
| PUBLICACIONES | 191 |

Índice de tablas

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabla I.1 | Incremento de la temperatura debido a la compresión adiabática en algunos alimentos y medios de presurización para presiones en el intervalo entre 400 y 1000 MPa, a 25 °C | 17 |
| Tabla 1.1 | Concentraciones ensayadas para el carvacrol en función del microorganismo y de la temperatura | 48 |
| Tabla 1.2 | Concentración mínima inhibitoria de carvacrol ($\mu\text{L}/\text{mL}$) en función del microorganismo y de la temperatura | 52 |
| Tabla 1.3 | Duración del tiempo de latencia (h) para <i>Escherichia coli</i> K12 en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol | 56 |
| Tabla 1.4 | Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para <i>Escherichia coli</i> K12 en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol | 56 |
| Tabla 1.5 | Duración del tiempo de latencia (h) para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol | 58 |
| Tabla 1.6 | Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol | 58 |
| Tabla 1.7 | Concentraciones ensayadas para el citral en función del microorganismo y de la temperatura | 64 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabla 1.8 | Concentración mínima inhibitoria de citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) en función del microorganismo y de la temperatura | 65 |
| Tabla 1.9 | Duración del tiempo de latencia (h) para <i>Escherichia coli</i> K12 en función de la temperatura y de la concentración de citral | 68 |
| Tabla 1.10 | Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para <i>Escherichia coli</i> K12 en función de la temperatura y de la concentración de citral | 68 |
| Tabla 1.11 | Duración del tiempo de latencia (h) para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura y de la concentración de citral | 70 |
| Tabla 1.12 | Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura y de la concentración de citral | 70 |
| Tabla 2.1 | Concentración celular de partida (N_0), concentración celular alcanzada en fase estacionaria (N_f) y duración del tiempo de latencia (λ) para <i>Listeria innocua</i> , a 37 °C, en función de la concentración de asaí | 81 |
| Tabla 2.2 | Duración del tiempo de latencia (λ) y velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) en función de la concentración de asaí, a 37, 22 y 10 °C | 84 |
| Tabla 2.3 | Caracterización del crecimiento de <i>Listeria innocua</i> en presencia y ausencia de distintos productos de estevia, a 37 °C, según la concentración celular de las muestras tras 5 h de incubación (N_5), la duración del tiempo de latencia (λ) y la velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) | 91 |
| Tabla 2.4 | Duración del tiempo de latencia (λ) y velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) en presencia de distintas concentraciones de estevia en infusión, a 37, 22 y 10 °C | 94 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabla 3.1 | Composición de la bebida formulada | 99 |
| Tabla 3.2 | Valor de los parámetros de la distribución de frecuencias de Weibull (b y n) en función de la concentración de estevia y de la temperatura | 105 |
| Tabla 4.1 | Presiones y tiempos de tratamiento considerados para evaluar el efecto antimicrobiano del procesado por altas presiones hidrostáticas en ausencia y en presencia de estevia (2,5 %, p:v) | 114 |
| Tabla 4.2 | Valores para los parámetros de la distribución de frecuencias de Weibull (b y n) en función del nivel de presión y de la concentración de estevia | 118 |
| Tabla 4.3 | Condiciones de tratamiento y almacenamiento consideradas para evaluar el efecto antimicrobiano de la aplicación conjunta de infusión de hojas de estevia y de altas presiones hidrostáticas en la bebida formulada | 121 |
| Tabla 4.4 | Valores para los parámetros de la distribución de frecuencias de Weibull (b y n) en función de la presión y el tiempo de tratamiento por altas presiones hidrostáticas, de la temperatura de almacenamiento posprocesado y de la concentración de estevia, para <i>Listeria monocytogenes</i> , en la bebida formulada | 122 |
| Tabla 5.1 | Diseño experimental | 140 |
| Tabla 5.2 | Efecto combinado de la estevia y de las altas presiones hidrostáticas sobre distintos parámetros de calidad | 145 |
| Tabla D.1 | Comparación de la dosis mínima inhibitoria de carvacrol y citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) para los microorganismos estudiados a las temperaturas ensayadas | 151 |

Índice de figuras

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura I.1 | Esquema simplificado de un equipo para el procesado de alimentos envasados mediante altas presiones hidrostáticas | 12 |
| Figura I.2 | Estado gel y estado fluido de la bicapa fosfolipídica que compone la membrana citoplasmática | 14 |
| Figura I.3 | Esquema de las etapas que componen una curva de crecimiento microbiano típica en un sistema cerrado | 29 |
| Figura I.4 | Esquema de algunas de las curvas de supervivencia e inactivación descritas hasta la fecha | 30 |
| Figura 1.1 | Curvas de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> K12 a distintas temperaturas, en función de la concentración de carvacrol (0-0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$) | 55 |
| Figura 1.2 | Curvas de crecimiento para <i>Listeria innocua</i> a distintas temperaturas, en función de la concentración de carvacrol (0-0,250 $\mu\text{L}/\text{mL}$) | 57 |
| Figura 1.3 | Comparación de la estructura química del carvacrol y de los isómeros que componen el citral | 63 |
| Figura 1.4 | Curvas de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> K12 a distintas temperaturas, en función de la concentración de citral (0-1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) | 67 |
| Figura 1.5 | Curvas de crecimiento para <i>Listeria innocua</i> a distintas temperaturas, en función de la concentración de citral (0-0,500 $\mu\text{L}/\text{mL}$) | 69 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 2.1 | Asaí: Palma (a), racimos (b) y fruto (c) | 76 |
| Figura 2.2 | Crecimiento e inactivación de <i>Listeria innocua</i> en función de la concentración de asaí (0-1 %, p:v), a 37 °C | 80 |
| Figura 2.3 | Crecimiento de <i>Listeria innocua</i> a 37, 22 y 10 °C, en función de la concentración de asaí (0-0,7 %, p:v) | 83 |
| Figura 2.4 | Relación entre la duración del tiempo de latencia (λ) y la concentración de asaí (<i>asaí</i>) a las temperaturas ensayadas . | 85 |
| Figura 2.5 | Estructura química del esteviol, el esteviósido y el rebaudiósido A que se acumulan en las hojas de estevia | 87 |
| Figura 2.6 | Crecimiento de <i>Listeria innocua</i> , a 37 °C, en presencia de distintos productos de estevia | 90 |
| Figura 2.7 | Crecimiento de <i>Listeria innocua</i> a 37, 22 y 10 °C, en función de la concentración de estevia (0-2,5 %, p:v) | 93 |
| Figura 3.1 | Protocolo para la obtención de curvas de supervivencia evaluando tanto la inactivación como el daño subletal en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia | 102 |
| Figura 3.2 | Curvas de supervivencia (<i>S</i>) para <i>Listeria monocytogenes</i> en función de la temperatura y de la concentración de estevia en la bebida formulada (0-2,5 %, p:v) | 104 |
| Figura 3.3 | Concentración de células intactas, dañadas y muertas con el tiempo de incubación, a 37 °C, en la bebida formulada sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta | 108 |
| Figura 3.4 | Concentración de células intactas, dañadas y muertas con el tiempo de incubación, a 10 °C, en la bebida formulada sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta | 109 |
| Figura 4.1 | Efectos posibles al combinar dos métodos de conservación | 111 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 4.2 | Elementos básicos del equipo de altas presiones hidrostáticas disponible en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas | 113 |
| Figura 4.3 | Curvas de supervivencia (<i>S</i>) para <i>Listeria monocytogenes</i> , de acuerdo con el nivel de presión (325, 300, 275 y 250 MPa), en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta | 117 |
| Figura 4.4 | Concentración de células intactas, dañadas y muertas en función de la presión (MPa) y del tiempo (min) de tratamiento, en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta | 119 |
| Figura 4.5 | Células intactas, dañadas y muertas pre- y posprocesado por altas presiones hidrostáticas (300 MPa, 1 min), en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta | 124 |
| Figura 4.6 | Células intactas, dañadas y muertas pre- y posprocesado por altas presiones hidrostáticas (300 MPa, 3 min), en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta | 125 |
| Figura 5.1 | Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la actividad polifenoloxidasasa (PPO) | 132 |
| Figura 5.2 | Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la actividad peroxidasa (POD) | 132 |
| Figura 5.3 | Fundamentos básicos del método empleado para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu (FC), que pasa de amarillo a azul cuando se reduce | 134 |
| Figura 5.4 | Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox, usando una solución con radical monocatiónico | |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| | del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS ^{•+}), que pasa de color verde-azulado a incoloro | 135 |
| Figura 5.5 | Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la capacidad antioxidante en base a la capacidad de absorción de radicales de oxígeno, utilizando fluoresceína (FL), cuya forma oxidada no es fluorescente .. | 137 |
| Figura 5.6 | Diseño central compuesto con centros en las caras | 140 |
| Figura 5.7 | Valor óptimo de los factores “concentración de estevia”, “nivel de presión” y “tiempo de tratamiento” para maximizar la calidad microbiológica, enzimática y funcional del extracto estudiado | 146 |
| Figura D.1 | Estructura química del carvacrol | 152 |
| Figura D.2 | Estructura simplificada de un fosfolípido de membrana | 152 |
| Figura D.3 | Mecanismo de acción del carvacrol como transportador de cationes monovalentes a nivel de la membrana | 153 |
| Figura D.4 | Estructura química de los dos isómeros que componen el citral | 154 |
| Figura D.5 | Estructura química general de los flavan-3-oles y de los flavonoles | 157 |
| Figura D.6 | Ejemplo de la estructura química de un tanino condensado. | 157 |
| Figura D.7 | Efecto del nivel de presión (<i>P</i>), del tiempo de tratamiento por HHP (<i>t</i>) y de la concentración de estevia (<i>estevia</i>) sobre la actividad relativa (<i>RA</i>) polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD), el contenido total de compuestos fenólicos (TPC) y la capacidad antioxidante total del extracto estudiado (TEAC y ORAC) | 164 |

Índice de ecuaciones

| | | |
|---------------------|---|----|
| Ecuación I.1 | Desviación estándar | 33 |
| Ecuación I.2 | Coefficiente de variación | 33 |
| Ecuación I.3 | Promedio | 33 |
| Ecuación I.4 | Coefficiente de determinación corregido | 35 |
| Ecuación I.5 | Error cuadrático medio | 35 |
| Ecuación I.6 | Factor de sesgo | 35 |
| Ecuación I.7 | Factor de precisión | 35 |
| | | |
| Ecuación 1.1 | Coefficiente de correlación de Pearson | 50 |
| Ecuación 1.2 | Ecuación modificada de Gompertz | 50 |
| Ecuación 1.3 | Duración del tiempo de latencia | 51 |
| Ecuación 1.4 | Velocidad de crecimiento máxima | 51 |
| | | |
| Ecuación 2.1 | Duración del tiempo de latencia para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura | 94 |
| Ecuación 2.2 | Velocidad de crecimiento máxima para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura | 94 |
| Ecuación 2.3 | Duración del tiempo de latencia para <i>Listeria innocua</i> en función de la concentración de estevia en infusión, a 37 °C | 95 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Ecuación 2.4 | Velocidad de crecimiento máxima para <i>Listeria innocua</i> en función de la concentración de estevia en infusión, a 37 °C | 95 |
| Ecuación 2.5 | Duración del tiempo de latencia para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura y de la concentración de estevia en infusión | 95 |
| Ecuación 2.6 | Velocidad de crecimiento máxima para <i>Listeria innocua</i> en función de la temperatura y de la concentración de estevia en infusión | 96 |
| Ecuación 3.1 | Distribución de frecuencias de Weibull | 101 |
| Ecuación 3.2 | Concentración de células viables | 103 |
| Ecuación 3.3 | Concentración de células intactas | 103 |
| Ecuación 3.4 | Concentración de células dañadas | 103 |
| Ecuación 3.5 | Concentración de células muertas | 103 |
| Ecuación 5.1 | Actividad relativa | 133 |
| Ecuación 5.2 | Capacidad de absorción de radicales de oxígeno | 138 |
| Ecuación 5.3 | Área bajo la curva | 138 |
| Ecuación 5.4 | Polinomio de segundo orden | 141 |
| Ecuación 5.5 | Actividad relativa polifenoloxidasa en función del nivel de presión | 147 |
| Ecuación 5.6 | Actividad relativa peroxidasa en función de la concentración de estevia y del nivel de presión | 147 |
| Ecuación 5.7 | Contenido total de compuestos fenólicos en función de la concentración de estevia | 147 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Ecuación 5.8 | Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox en función de la concentración de estevia | 147 |
| Ecuación 5.9 | Capacidad de absorción de radicales de oxígeno en función de la concentración de estevia | 147 |

Abreviaturas, siglas y símbolos

El listado que se muestra a continuación recoge las abreviaturas, las siglas y los símbolos destacables en este manuscrito.

| | |
|--------------------|--|
| % (p:p) | Por ciento peso-peso |
| % (p:v) o %, p:v | Por ciento peso-volumen |
| % (v:v) o %, v:v | Por ciento volumen-volumen |
| (log ufc/mL)/h | Logaritmo de unidades formadoras de colonia por mililitro y hora |
| ×g | Veces la fuerza gravitacional terrestre |
| Δabs/min/mL | Incrementos de absorbancia por minuto y mililitro |
| °C | Grados Celsius |
| μL | Microlitros |
| μL/mL | Microlitros por mililitro |
| μm | Micrómetros |
| μM | Micromolar |
| μ _{máx} | Velocidad de crecimiento máxima |
| μmol ET/g | Micromoles equivalentes de Trolox por gramo |
| –OH | Hidroxilo |
| λ | Duración del tiempo de latencia |
| <i>A. sativa</i> | <i>Avena sativa</i> |
| AAPH | 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) diclorhidrato |
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) |
| ABTS ^{*+} | Radical monocatiónico del ABTS |
| A _f | Factor de precisión, del inglés: <i>accuracy factor</i> |
| APPCC | Análisis de peligros y puntos críticos de control |
| a _w | Actividad de agua, del inglés: <i>water activity</i> |
| BPH | Buenas prácticas higiénicas |

| | |
|----------------------------|--|
| BPM | Buenas prácticas de manufactura |
| <i>C. ×sinensis</i> | <i>Citrus ×sinensis</i> |
| CCFH | Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos, del inglés: Codex Committee on Food Hygiene |
| CDC | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, del inglés: Centers for Disease Control and Prevention |
| CE | Comunidad Europea |
| CECT | Colección Española de Cultivos Tipo |
| cm | Centímetros |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CMM | Concentración mínima microbica |
| COI | Oficina de Información Central, del inglés: Central Office of Information |
| CV | Coefficiente de variación |
| d | Días |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E. oleracea</i> | <i>Eutepa oleracea</i> |
| EC | Comisión de enzimas, del inglés: Enzyme Commission |
| ECDC | Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, del inglés: European Centre for Disease Prevention and Control |
| EE. UU. | Estados Unidos |
| EFSA | Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos, del inglés: European Food Safety Authority |
| <i>et al.</i> | y otros, del latín: <i>et alii</i> |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, del inglés: Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FDA | Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés: Food and Drug Administration |
| FL | Fluoresceína |
| FSA | Agencia de Normas Alimentarias, del inglés: Food Standards Agency |
| FSAI | Autoridad Irlandesa de Seguridad Alimentaria, del inglés: Food Safety Authority of Ireland |
| g | Gramos |

| | |
|--------------------------------|--|
| GRAS | Generalmente considerados como seguros, del inglés: <i>generally recognized as safe</i> |
| h | Hora(s) |
| HHP | Altas presiones hidrostáticas, del inglés: <i>high hydrostatic pressures</i> |
| INFOSAN | Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos, del inglés: International Food Safety Authorities Network |
| JECFA | Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios, del inglés: Joint Expert Committee on Food Additives |
| L | Litros |
| <i>L. innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> |
| <i>L. monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| log ufc/mL | Logaritmo de unidades formadoras de colonia por mililitro |
| M | Molar |
| <i>M. indica</i> | <i>Mangifera indica</i> |
| mg GAE/L | Miligramos equivalentes de ácido gálico por litro |
| mg/kg | Miligramos por kilogramo |
| min | Minuto(s) |
| mL | Mililitro(s) |
| mM | Milimolar |
| mmol ET/L | Milimoles equivalentes de Trolox por litro |
| MPa | Megapascales |
| MPa/min | Megapascales por minuto |
| MSE | Error cuadrático medio, del inglés: <i>mean square error</i> |
| N_0 | Concentración celular de partida |
| NA | Agar nutritivo, del inglés: <i>nutrient agar</i> |
| NACMCF | Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos, del inglés: National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods |
| NB | Caldo nutritivo, del inglés: <i>nutrient broth</i> |
| N_f | Concentración celular alcanzada en fase estacionaria |
| nm | Nanómetros |
| nM | Nanomolar |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

| | |
|--|--|
| ORAC | Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, del inglés: <i>oxygen radical antioxidant capacity</i> |
| <i>P. carica</i> | <i>Papaya carica</i> |
| POD | Peroxidasa |
| ppm | Partes por millón |
| PPO | Polifenoloxidasa |
| p:v | Peso-volumen |
| PVPP | Polivinilpolipirrolidona |
| <i>r</i> | Coefficiente de correlación de Pearson |
| <i>r</i>² <i>corregido</i> | Coefficiente de determinación corregido |
| <i>RA</i> | Actividad relativa, del inglés: <i>relative activity</i> |
| RAE | Real Academia Española |
| rev/min | Revoluciones por minuto |
| ROO[•] | Radicales peroxilo |
| RSM | Metodología de superficies de respuesta, del inglés: <i>response surface methodology</i> |
| s | Segundo(s) |
| <i>S. rebaudiana</i> | <i>Stevia rebaudiana</i> |
| TAC | Capacidad antioxidante total, del inglés: <i>total antioxidant capacity</i> |
| TEAC | Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox, del inglés: <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> |
| TNS | Taylor Nelson Sofres |
| TPC | Contenido total de compuestos fenólicos, del inglés: <i>total phenolic content</i> |
| TSA | Agar triptona soja, del inglés: <i>tryptic soy agar</i> |
| TSB | Caldo triptona soja, del inglés: <i>tryptic soy broth</i> |
| UE | Unión Europea |
| ufc/g | Unidades formadoras de colonia por gramo |
| ufc/mL | Unidades formadoras de colonia por mililitro |
| v:v | Volumen-volumen |



Justificación

En los países desarrollados, el consumidor es cada vez más consciente de la influencia de la dieta sobre la salud, en todas las etapas de la vida. Por eso, desde hace algunos años busca alimentos de calidad, frescos o poco procesados, que sean nutritivos, funcionales, seguros, duraderos y apetecibles, en ausencia de aditivos sintéticos. Además, busca productos económicos y novedosos, listos para comer o fáciles y rápidos de preparar.

Para la industria, satisfacer esta demanda supone, entre otras cosas, implementar nuevas estrategias de conservación. Estas estrategias deben ser capaces de garantizar estabilidad y seguridad, afectando lo menos posible a las propiedades del alimento fresco (a diferencia de los métodos tradicionales, entre los que se encuentran el procesado térmico y la aplicación de conservantes sintéticos).

En consecuencia, desde hace algunos años existe un creciente interés (i) en el desarrollo de tecnologías de conservación no térmicas; (ii) en la búsqueda de conservantes naturales (de origen animal, vegetal o microbiano); (iii) en la tecnología de barreras, es decir, en la aplicación conjunta de distintos métodos con efectos sinérgicos, y, además, (iv) en la optimización de los métodos o combinaciones escogidos para un alimento en concreto.

Sin olvidar la importancia de las buenas prácticas higiénicas (BPH) y las buenas prácticas de manufactura (BPM), en las circunstancias actuales la tecnología de barreras y la optimización cobran especial relevancia, porque permiten mejorar la eficacia y, por tanto, reducir la intensidad con la que se aplican las barreras consideradas. Con respecto a la combinación de métodos, una de las opciones

más atractivas es sin duda la aplicación conjunta de tecnologías no térmicas y de conservantes naturales, ya que pueden garantizar estabilidad e inocuidad hasta el momento de consumo.

Entre las tecnologías no térmicas desarrolladas hasta la fecha destaca el procesado por altas presiones hidrostáticas (HHP, por sus siglas en inglés), que ya se aplica comercialmente para productos envasados de todo tipo. Por otro lado, entre los conservantes naturales destacan los de origen vegetal, en parte, porque encajan a la perfección en el marco de una alimentación saludable.

En cualquier caso, para evaluar el potencial antimicrobiano de estas nuevas estrategias resulta muy útil la cuantificación del efecto observado a partir de curvas de crecimiento, supervivencia o inactivación, que permiten, además, describir y predecir el comportamiento microbiano, en base a parámetros cinéticos y según las condiciones de procesado y almacenamiento. En la bibliografía existen pocos estudios de este tipo, que, sin embargo, son necesarios para planificar un sistema adecuado de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) en la industria.

Considerando las necesidades actuales en el contexto de la conservación de alimentos y la importancia de los estudios cinéticos, la presente tesis aborda el estudio de la actividad antimicrobiana de distintos ingredientes de origen vegetal, así como su posible aplicación combinada con las HHP para la conservación de bebidas vegetales mínimamente procesadas.

Introducción general

a) Microorganismos patógenos transmitidos por alimentos

De acuerdo con la Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN, por sus siglas en inglés), las intoxicaciones, infecciones y toxiinfecciones de transmisión alimentaria siguen siendo un problema de salud pública importante, que afecta también a países desarrollados (INFOSAN, 2006). A pesar de los avances logrados en materia de higiene y seguridad alimentaria, la importancia del problema es evidente dado el número de personas que enferman o mueren, cada año, por consumo de alimentos que contienen agentes patógenos (Koopers, 2009). En EE. UU., los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) estiman que anualmente 48 millones de personas sufren alguna enfermedad de origen alimentario (CDC, 2015). Aunque la mayoría de casos son esporádicos, un pequeño porcentaje forma parte de brotes, que afectan a 2 o más personas que sufren la misma enfermedad después de haber consumido el mismo alimento o un alimento del mismo origen, siendo éste el vehículo inequívoco transmisor de aquella (CDC, 2015).

Según la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA, por sus siglas en inglés) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés), durante el año 2013 en la Unión Europea (UE) se registraron 5196 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, afectando a 43 183 personas, con 5946 hospitalizaciones y 11 muertes (EFSA y ECDC, 2015). Según los CDC, ese mismo año en EE. UU. se

registraron 818 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, afectando a 13 360 personas, con 162 hospitalizaciones y 16 muertes (CDC, 2015). Estas cifras no son nada despreciables, aunque los brotes supongan sólo una pequeña parte del número total de casos estimado.

El agente causal en ocasiones es desconocido (Scallan *et al.*, 2011a), pero para aquellos casos en los que se ha identificado, estas patologías suelen atribuirse a agentes químicos y biológicos (Linscott, 2011; Scallan *et al.*, 2011a; Scallan *et al.*, 2011b), entre los que destacan un buen número de bacterias emergentes, como *Listeria monocytogenes* o *Escherichia coli* O157:H7 (Hernández, 2010).

a.1) *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo gram positivo, ubicuo, que puede sobrevivir en el ambiente largos periodos de tiempo y crecer en condiciones muy diversas, incluyendo: temperaturas de refrigeración, poco oxígeno, presencia de sal o un pH ácido (Rocourt y Cossart, 1997). Además, es capaz de adherirse a los materiales comúnmente utilizados en la industria alimentaria y puede formar biopelículas (Mafu *et al.*, 1990; Møretrø y Langsrud, 2004). Todas estas características hacen que *L. monocytogenes* pueda llegar a los alimentos y proliferar en ellos, sobre todo si se trata de productos poco procesados, que se mantienen en refrigeración.

Su entrada al entorno industrial puede ocurrir con la tierra existente en los equipos de transporte, o en los zapatos y en la ropa de los trabajadores, por medio de animales que pueden llevarla en superficie, a través de materias primas contaminadas y, posiblemente, en personas portadoras asintomáticas (Rocourt y Cossart, 1997). Por eso, para evitar o minimizar la ocurrencia, el establecimiento y la proliferación del patógeno, en las plantas de producción o procesado de alimentos se recomienda controlar la humedad, usar equipos de acero inoxidable (sin bordes, grietas o espacios muertos) y desinfectar con

productos que no generen aerosoles, de acuerdo con la Autoridad Irlandesa de Seguridad Alimentaria (FSAI, por sus siglas en inglés) y el Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH, por sus siglas en inglés) (FSAI, 2005; CCFH, 2009).

Desde un punto de vista médico, *L. monocytogenes* es el agente etiológico principal de listeriosis en humanos. La listeriosis es una enfermedad de origen fundamentalmente alimentario, cuya manifestación clínica varía en función del estado inmunológico del individuo afectado. En adultos sanos es una infección autolimitada no invasiva, con los síntomas típicos de una gastroenteritis febril o una gripe que aparecen tras un periodo de incubación corto y que se asocian a la ingesta alimentos con más de 10^5 ufc/g (Salamina *et al.*, 1996; Dalton *et al.*, 1997; Aureli *et al.*, 2000; Sim *et al.*, 2002). En niños, ancianos, personas inmunodeprimidas o mujeres embarazadas, sin embargo, la listeriosis suele ser una toxiinfección grave, invasiva y de carácter no entérico, que se manifiesta como meningitis o septicemias. Además, puede provocar partos prematuros, abortos espontáneos o muerte fetal (Rocourt y Cossart, 1997; Gandhi y Chikindas, 2007), incluso aunque la mujer afectada permanezca asintomática (Larraín *et al.*, 2008). Esta segunda variante, a diferencia de la anterior, presenta un tiempo de incubación largo, tasas de hospitalización altas y consecuencias fatales hasta en un 30 % de los casos (Rocourt y Cossart, 1997; Gandhi y Chikindas, 2007; Mateus *et al.*, 2013), siendo, por tanto, una de las principales causas conocidas de hospitalización y muerte por enfermedades de transmisión alimentaria (Scallan *et al.*, 2011b; CDC, 2015; EFSA y ECDC, 2015).

El primer brote confirmado de listeriosis transmitida por alimentos ocurrió en Canadá, en el año 1981. La patología fue vehiculizada por una ensalada lista para el consumo, que incluía col procedente de cultivos abonados con estiércol de ovejas enfermas (Schlech *et al.*, 1983). Desde entonces, los brotes y casos registrados se han asociado al consumo de leche (Dalton *et al.*, 1997), queso

(Johnsen *et al.*, 2010), productos del mar o derivados (Brett *et al.*, 1998; Miettinen *et al.*, 1999), cereales (Aureli *et al.*, 2000), setas (Junttila y Brander, 1989) y carne o productos cárnicos (Cheftel, 1995; Goulet *et al.*, 1998; Frye *et al.*, 2002; Mead *et al.*, 2006).

Con la información disponible, sin embargo, aún no se ha podido determinar la dosis infecciosa oral para *L. monocytogenes* (Nørrung, 2000); en parte, porque depende de la susceptibilidad del consumidor y de la virulencia de la cepa ingerida. Los datos publicados hasta la fecha indican que son necesarias más de 100 ufc/g de alimento, pero no se descarta que dosis más bajas sean suficientes en individuos vulnerables a la patología. Por eso, y según las recomendaciones del CCFH (2009), los criterios microbiológicos básicos para *L. monocytogenes* en la UE son los siguientes (Comisión Europea, 2005; 2007; 2010):

- 1) En alimentos que sean destinados a lactantes o a usos médicos especiales, durante la vida útil del producto comercializado impera la tolerancia cero, lo que supone la ausencia del patógeno en 25 g de producto, para 10 muestras.
- 2) En alimentos listos para el consumo que puedan favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, siempre que no sean destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, se permiten hasta 100 ufc/g de alimento, si se demuestra que no se rebasará este máximo durante el tiempo de vida útil, para 5 muestras. De lo contrario se exige ausencia en 25 g, para 5 muestras, antes de que el alimento haya dejado el control inmediato de la empresa que lo produce.
- 3) En alimentos listos para el consumo que no puedan favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, siempre que no sean destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, se establece un límite máximo de 100 ufc/g, para 5 muestras, durante el tiempo de vida útil.

a.2) *Escherichia coli* O157:H7

La especie *E. coli* está compuesta por bacilos gram negativos no esporulados, inmóviles o móviles (mediante flagelación peritrica), que son capaces de crecer en presencia y ausencia de oxígeno, haciéndolo de forma óptima a 37 °C (Lim *et al.*, 2010; Croxen *et al.*, 2013). La mayoría de ellos son residentes inocuos del tracto gastrointestinal del hombre y otros animales (Lim *et al.*, 2010), aunque también existen variantes patógenas para unos y otros.

De acuerdo con Croxen *et al.* (2013), hasta la fecha se han descrito un total de 7 patotipos para la especie *E. coli*, según el mecanismo de acción que presentan y el cuadro clínico que provocan. Entre ellos se incluye el patotipo “*E. coli* verotoxigénicas” (o “*E. coli* productoras de toxinas tipo Shiga”), constituido por cepas que producen verotoxinas¹ similares a las toxinas Shiga de *Shigella dysenteriae*. Dentro de este grupo destaca el serotipo O157:H7, porque es altamente infeccioso y porque su principal vía de transmisión son los alimentos (Doyle *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2010).

El primer brote documentado de toxiinfección por *E. coli* O157:H7 ocurrió en 1982. Entonces fue identificado como el agente etiológico de una epidemia de colitis hemorrágica, que tuvo lugar en EE. UU. y que se relacionó con la ingesta de hamburguesas de ternera en distintos restaurantes de una misma cadena (Riley *et al.*, 1983).

Según el registro de casos confirmados, la toxiinfección por *E. coli* O157:H7 suele estar relacionada con el consumo de productos cárnicos crudos o insuficientemente cocinados (Doyle *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2013), aunque también se han descrito brotes asociados al consumo de embutidos fermentados (MacDonald *et al.*, 2004; Sartz *et al.*, 2008), de leche y de productos lácteos

¹ Las verotoxinas son factores tóxicos para las células Vero, un linaje continuo de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus sabaues* L.) originalmente aisladas por Yasumura y Kawakita, en 1962 (Ammerman *et al.*, 2008; Osada *et al.*, 2014).

(Honish *et al.*, 2005; Denny *et al.*, 2008), de frutas y hortalizas frescas (Ackers *et al.*, 1998; Laidler *et al.*, 2013), de brotes germinados (Michino *et al.*, 1999) y de zumos sin pasteurizar (Besser *et al.*, 1993).

El principal reservorio de este patógeno es el ganado vacuno. Sin embargo, también son o pueden serlo, entre otros, cabras, ovejas, aves de corral y algunos rumiantes silvestres (Ferens y Hovde, 2011). Así, la contaminación de la carne se produce normalmente durante el faenado en el matadero, mientras que la contaminación de la leche puede ocurrir durante el ordeñado de vacas, ovejas y cabras. El uso de leche no pasteurizada para la elaboración de productos lácteos podría explicar la contaminación de éstos. Por otro lado, las posibles vías de contaminación para los alimentos vegetales serían, principalmente, el uso de estiércol contaminado y de aguas grises o residuales. Por tanto, para evitar la toxiinfección se recomienda cocinar adecuadamente aquellos alimentos que no se consumen crudos, garantizando una temperatura interna mínima de 68,3 °C (Doyle *et al.*, 1997), y compostar manteniendo el estiércol a más 50 °C, durante 6 d (Lim *et al.*, 2010).

Sea cual sea la fuente de toxiinfección, el espectro clínico de la enfermedad por *E. coli* O157:H7 incluye casos asintomáticos y sintomáticos, con calambres abdominales y diarrea no sanguinolenta, que puede derivar en colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH)². Cuando hay síntomas, éstos aparecen tras un periodo de incubación corto, de unos 3 d (Tarr *et al.*, 2005). Los niños menores de 5 años y los adultos con más de 65 son las personas más vulnerables a la toxiinfección (Doyle, 2006; Croxen *et al.*, 2013).

Como la especie *E. coli* es un indicador de contaminación fecal e higiene deficitaria, la UE establece criterios microbiológicos que limitan su presencia en determinados alimentos, sin fijar límites específicos para ningún grupo o cepa

² El SUH es un trastorno que afecta a la sangre, a los vasos sanguíneos pequeños y a los riñones, pudiendo provocar anemia, insuficiencia renal y alteraciones neurológicas.

en concreto (Comisión Europea 2005; 2007). En el caso de la carne picada, por ejemplo, al final del proceso de fabricación se establece un límite no permitido de 500 ufc/g y un límite umbral de 50 ufc/g; éste último podría rebasarse sin llegar al límite no permitido, como máximo, en 2 de las 5 muestras a analizar, de acuerdo con la legislación vigente (Comisión Europea, 2005; 2007).

b) Procesado por altas presiones hidrostáticas como tecnología no térmica para la inactivación de microorganismos en alimentos

A lo largo de la historia, el ser humano ha implementado distintas estrategias de conservación para alargar la vida útil de los alimentos, según sus necesidades y posibilidades, intentando garantizar la máxima estabilidad y seguridad durante periodos de tiempo prolongados. De forma consciente o no, estas estrategias han sido y son aplicadas, fundamentalmente, para reducir la presencia de microorganismos e impedir o ralentizar su crecimiento.

En vista de que el consumidor demanda alimentos mínimamente procesados, para lograr la inactivación de microorganismos sin alterar las características del producto, en los últimos años se han desarrollado tecnologías de pasteurización no térmicas. En este sentido, de acuerdo con el Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos (NACMCF, por sus siglas en inglés), estas tecnologías deben reducir la población del patógeno más resistente, hasta niveles seguros en condiciones normales de distribución y almacenamiento, provocando cambios mínimos en la calidad del producto (NACMCF, 2006).

Las primeras investigaciones sobre el potencial de las HHP para la conservación de alimentos datan de finales del s. XIX y principios del s. XX. Entonces, evaluando su potencial antimicrobiano se demostró que éstas podrían alargar la vida útil de productos tales como la leche o los zumos de fruta fresca (Hite, 1899; Hite *et al.*, 1914). Sin embargo, el desarrollo científico de la tecnología y

su aplicación han tenido lugar durante los últimos 20 años (Rendueles *et al.*, 2011).

Según Patterson y Linton (2010), la aplicación de HHP se considera como una opción para el procesado de alimentos sólo desde 1980, porque hasta ese momento no se disponía de equipos adecuados para el tratamiento a nivel industrial. En consecuencia, las primeras aplicaciones comerciales surgieron a finales del s. XX; más concretamente, en el año 1990 (San Martín *et al.*, 2002). Ese año una empresa japonesa introdujo en el mercado mermeladas procesadas por HHP, y desde ese momento el uso de la tecnología está en expansión. En 1998, Espuña SA sacó a la venta barquetas de jamón cocido presurizado en lonchas, convirtiéndose en la primera marca española que apostó por las HHP para la conservación de alimentos. Otros productos presurizados que se comercializan actualmente son: guacamole, jaleas, zumos, ostras, pasteles de arroz y platos precocinados (Cheftel, 1995; San Martín *et al.*, 2002; Yaldagard *et al.*, 2008; Patterson y Linton, 2010).

b.1) Fundamentos de la tecnología

Durante el procesado mediante HHP, los alimentos se someten a presiones en el intervalo entre 100 y 900 MPa (San Martín *et al.*, 2002; Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Patterson, 2005). No obstante, la mayoría de aplicaciones comerciales requieren entre 300 y 700 MPa (San Martín *et al.*, 2002; Patterson y Linton, 2010), durante un tiempo máximo de 20 min, para temperaturas incluso inferiores a 0 °C o superiores a 100 °C (Yaldagard *et al.*, 2008).

Con respecto a los fundamentos de la tecnología, la aplicación de HHP se basa en el principio de Le Chatelier, según el cual un incremento de presión favorece aquellos fenómenos que impliquen una reducción de volumen, y al revés (Yaldagard *et al.*, 2008). De este modo la presión puede perturbar la integridad y funcionalidad de ciertas estructuras o el desarrollo de determinados procesos,

porque altera la estructura de moléculas grandes, facilitando la ruptura de enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas (Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011). Además, de acuerdo con este principio, el procesado por HHP resulta ventajoso para mantener la calidad sensorial de los alimentos, porque no favorece la ruptura de los enlaces covalentes (Patterson, 2005; Yaldagard *et al.*, 2008).

Por otro lado, esta tecnología aprovecha también el principio de Pascal. Como los tratamientos ocurren en el seno de un recipiente indeformable conteniendo un fluido incompresible, la presión se transmite de manera uniforme y casi instantánea en todos los puntos del alimento, con independencia de su tamaño y geometría. En consecuencia, los productos sólidos conservan su forma original, y se evitan gradientes que generen zonas desigualmente tratadas, como sí ocurre con el procesado térmico (San Martín *et al.*, 2002; Patterson, 2005; Patterson y Linton, 2010).

b.2) Sistemas de tratamiento

Los componentes básicos de un sistema típico para el procesado de alimentos mediante HHP son: (i) una vasija de tratamiento o cámara de presurización (habitualmente cilíndrica, monolítica y construida en acero de alta resistencia a la tracción) (Yaldagard *et al.*, 2008; Patterson y Linton, 2010); (ii) un sistema de cierre para la vasija; (iii) un depósito para el fluido transmisor de la presión; (iv) un dispositivo generador de presión por compresión indirecta (que bombee fluido desde el depósito hasta la vasija); (v) un módulo programador, y (vi) un equipo para el control de la temperatura (Figura I.1).

En estos sistemas, los tratamientos se aplican de forma discontinua, a productos envasados en sistemas parcialmente flexibles, capaces de resistir la compresión, de recuperar su morfología y de mantener sus propiedades una vez finalizado el tratamiento. En teoría, se estima que estos envases deben tolerar reducciones de

volumen considerables, de hasta un 20 % para niveles de presión en el intervalo entre 400 y 800 MPa (Yaldagard *et al.*, 2008). Por consiguiente, se recomiendan envases de etilvinil alcohol o polivinil alcohol (comúnmente conocidos como EVOH y PVOH) (Téllez-Luis *et al.*, 2001; Yaldagard *et al.*, 2008).

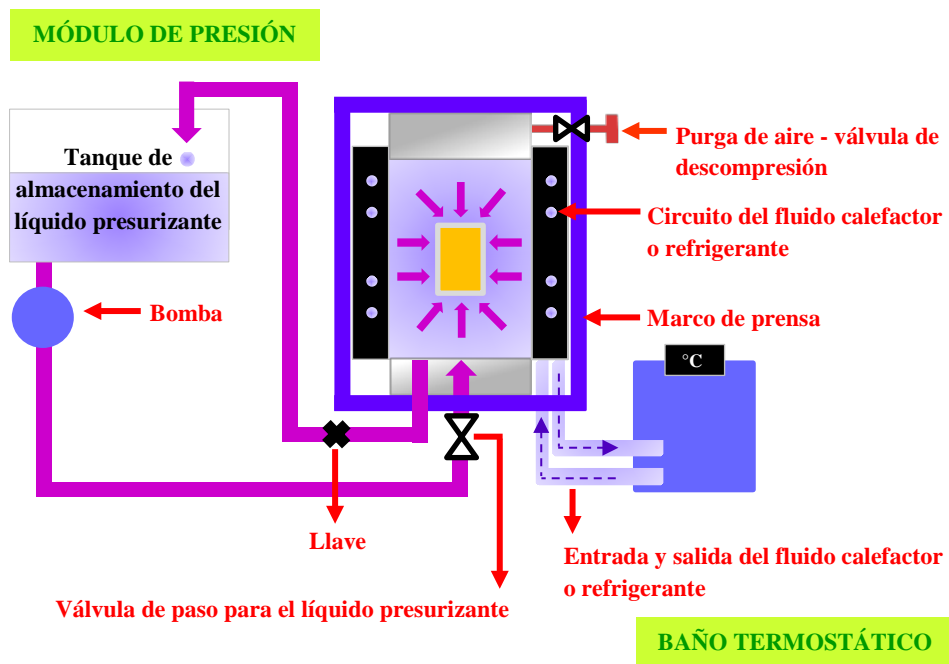


Figura I.1 Esquema simplificado de un equipo para el procesamiento de alimentos envasados mediante altas presiones hidrostáticas.

Para un tratamiento estándar, los alimentos envasados se introducen en la cámara de presurización, ocupando como mucho el 75 % del volumen total (Raventós, 2005). A continuación, la cámara se cierra y se llena con medio presurizante, manteniendo abierta la válvula de descompresión. Una vez evacuado el aire de la cámara, se cierra la válvula de descompresión y se mantiene el bombeo de fluido hasta alcanzarse la presión de trabajo; este nivel se mantendrá durante el tiempo de tratamiento sin que ello suponga un gasto

energético adicional. Ya finalizado el tratamiento, la cámara se despresuriza, se abre y se extraen los envases.

Con independencia del tratamiento, del alimento y del envase, el fluido transmisor de la presión suele ser agua potable (Télez-Luis *et al.*, 2001; San Martín *et al.*, 2002; Patterson, 2005; Patterson y Linton, 2010); no obstante, también se usan mezclas de agua con glicol de grado alimentario, soluciones de etanol y aceite de ricino, entre otros (Yaldagard *et al.*, 2008).

b.3) Mecanismos implicados en la inactivación

Los mecanismos concretos para la inactivación de microorganismos mediante HHP aún no están del todo claros (Patterson y Linton, 2010). Sin embargo, la mayoría de autores considera que su efecto letal es debido a varios procesos que ocurren de forma simultánea (Patterson y Linton, 2010). Por otro lado, para las bacterias existe un consenso general con respecto a la importancia de las alteraciones provocadas en la membrana celular, considerada como el elemento primera y principalmente afectado por la presión (Patterson, 2005; Rivalain *et al.*, 2010; Rendueles *et al.*, 2011). En la bibliografía, diversas investigaciones demuestran que las HHP pueden permeabilizar y despolarizar la membrana, anulando la capacidad de osmorregulación, provocando la liberación de componentes intracelulares, favoreciendo la captación de colorantes que en condiciones normales no acceden al citoplasma, reduciendo el potencial de membrana y disipando el gradiente de pH a ambos lados de la misma (Smelt *et al.*, 1994; Benito *et al.*, 1999; Pagán y Mackey, 2000; Tholozan *et al.*, 2000; Mañas y Mackey, 2004). Además, también se ha demostrado que las HHP pueden inhibir la actividad de proteínas de membrana, como, por ejemplo, la adenosina trifosfato sintasa (ATP sintasa; EC 3.6.3.14) (Wouters *et al.*, 1998). Todas estas alteraciones estarían interrelacionadas y podrían explicarse en base al efecto de la presión sobre la bicapa fosfolipídica. Cuando las membranas se someten a presiones elevadas, las colas insaturadas de los fosfolípidos se

enderezan adquiriendo una configuración más compacta y organizada, pero menos fluida, que recibe el nombre de estado gel (Figura I.2) (Rivalain *et al.*, 2010; Rendueles *et al.*, 2011). Así, la membrana es más rígida y susceptible a daños estructurales, quedando comprometida tanto su función como la de las proteínas asociadas, que podrían llegar a desprenderse, ya que la compactación y reorganización de fosfolípidos conlleva cambios en el espesor de la bicapa (Figura I.2).

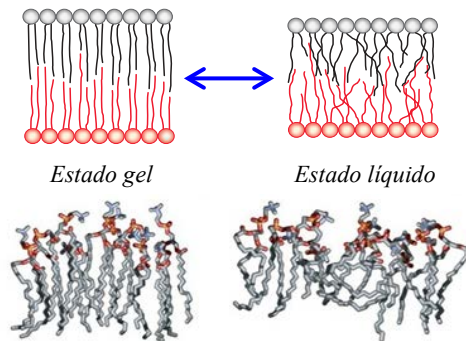


Figura I.2 Estado gel y estado fluido de la bicapa fosfolipídica que compone la membrana citoplasmática (Modificado de: Lodish *et al.*, 2008).

Aunque los efectos de las HHP se han investigado sobre todo en bacterias, cabe destacar que el daño a nivel de membrana también ocurre o se espera en el resto de microorganismos. De hecho, hay autores que consideran que el daño a nivel de membrana también es fundamental para la inactivación de levaduras. En este sentido se ha demostrado que la aplicación de HHP induce la liberación de componentes intracelulares en *Saccharomyces cerevisiae* (Perrier-Cornet *et al.*, 1999). Sin embargo, existe cierta controversia al respecto; en la bibliografía, otros autores defienden que para la inactivación de levaduras es más importante el daño en las membranas intracelulares, siendo éstas, en teoría, el elemento inicialmente afectado por la presión (Brul *et al.*, 2000). Diversos estudios evidencian que la aplicación de HHP puede provocar cambios en la morfología

de los orgánulos, inducir la formación de poros en sus membranas e, incluso, que éstas se rompan (Shimada *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 2001). Según Brul *et al.* (2000), el efecto de la presión sobre las mitocondrias podría causar la disociación del citocromo C y, con ello, desencadenar la muerte celular programada.

Por otro lado, el efecto de la presión sobre la estructura de las proteínas también se considera muy importante para la inactivación de cualquier microorganismo. Esto se debe a que el daño en la membrana no siempre se correlaciona con el grado de inactivación, ni tan siquiera en bacterias (Brul *et al.*, 2000; Ananta y Knorr, 2009). Induciendo la ruptura de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, el procesado mediante HHP puede causar la desnaturalización de este tipo de moléculas. Así, las HHP podrían ser responsables también de la alteración de proteínas a nivel de membrana y, además, provocarían la inactivación de enzimas intracelulares implicados en procesos esenciales para la supervivencia y la reproducción.

Según diversos trabajos de revisión, las HHP pueden llegar a inhibir la replicación, la transcripción y la traducción (Téllez-Luis *et al.*, 2001; Patterson, 2005; Considine *et al.*, 2008; Patterson y Linton, 2010). Sin embargo, cabe destacar que la inhibición de éstos y otros procesos no sólo estaría asociada al efecto directo de la presión sobre las proteínas, sino también a su efecto sobre la membrana; al aumentar la permeabilidad de membrana podría ocurrir la liberación de iones divalentes que son necesarios, por un lado, para la estabilización de algunos de los enzimas que participan en la replicación o en la transcripción, y por otro, para la estabilización de los ribosomas, donde tiene lugar el proceso de traducción (Moussa *et al.*, 2007).

Otros efectos observados en bacterias y levaduras son: (i) cambios de volumen; (ii) protuberancias, depresiones, invaginaciones u ondulaciones en la pared o en

la membrana; (iii) puntos de desunión entre la pared y la membrana; (iv) alteraciones en el citoesqueleto; (v) agregación de proteínas en el citoplasma (posiblemente inducida por la desnaturalización que media la aplicación de HHP); (vi) cambios en la distribución del ARN, y (vii) condensación del nucleoide (Shimada *et al.*, 1993; Wouters *et al.*, 1998; Perrier-Cornet *et al.*, 1999; Tholozan *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Mañas y Mackey, 2004; Moussa *et al.*, 2007).

b.4) Factores que influyen en la eficacia de la tecnología

La efectividad del procesado por HHP para la inactivación de microorganismos en alimentos depende de las condiciones de tratamiento, del microorganismo y de las características específicas del producto procesado. Todos estos factores interactúan y contribuyen al efecto final de la tecnología, de modo que todos deben considerarse para garantizar la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos que se someten a los mismos (Patterson, 2005).

b.4.1 - Factores relativos al tratamiento

Los parámetros críticos relativos al tratamiento son la presión, el tiempo y la temperatura. El tiempo de procesado incluye el tiempo necesario para alcanzar la presión de trabajo y el tiempo invertido en la descompresión. Para el caso de la temperatura, cabe destacar que el valor determinante es el máximo alcanzado en el seno de la cámara de presurización, más allá del valor teóricamente fijado para el tratamiento. Esto se debe a que la compresión es adiabática; debido a que el sistema no intercambia calor con el entorno, la aplicación de HHP supone un calentamiento uniforme del medio presurizante y de los alimentos, en general, a razón de entre 3 y 9 °C por cada 100 MPa (Tabla I.1) (Ting *et al.*, 2002). La magnitud exacta del incremento depende de la temperatura, de la compresibilidad y del calor específico del elemento que se somete a presión. En consecuencia, teniendo en cuenta que el agua es el ingrediente principal de muchos alimentos, su uso como fluido transmisor de la presión conviene, entre

otros motivos, porque así se evita un calentamiento diferencial (Ting *et al.*, 2002).

Tabla I.1 Incremento de la temperatura debido a la compresión adiabática en algunos alimentos y medios de presurización para presiones en el intervalo entre 400 y 1000 MPa, a 25 °C (Tomado de: Ting *et al.*, 2002).

| Alimento o medio de presurización | Incremento de la temperatura por cada 100 MPa (°C) |
|---|--|
| Agua | 3,0 |
| Puré de patata | 3,0 |
| Zumo de naranja | 3,0 |
| Salsa de tomate | 3,0 |
| Leche con un 2 % (p:p) de materia grasa | 3,0 |
| Salmón | 3,2 |
| Grasa de pollo | 4,5 |
| Mezcla de agua y glicol (50:50, v:v) | De 4,8 a < 3,7 ^a |
| Grasa de ternera | 6,3 |
| Aceite de oliva | De 8,7 a 6,3 ^a |
| Aceite de soja | De 9,1 a 6,2 ^a |

^a Según Ting *et al.* (2002), la mezcla de agua y glicol en proporción 50:50 (v:v), así como los aceites de oliva y soja muestran un incremento variable de la temperatura, que disminuye al aumentar la presión.

En lo referente a la influencia de los parámetros de proceso sobre la eficacia de las HHP, a más presión o tiempo se espera un mayor grado de inactivación. Sin embargo, no hay que descartar que exista un intervalo efectivo de presión y tiempo, por debajo del cual no haya efecto y por encima del cual un aumento en estos factores no suponga un resultado mejor. Asimismo, tampoco hay que descartar que dentro del intervalo efectivo sea necesario un incremento específico de presión o tiempo para lograr más inactivación, bajo determinadas circunstancias. Con respecto a la temperatura de tratamiento se ha observado que la inactivación suele aumentar a temperaturas superiores e inferiores al

valor ambiente (Considine *et al.*, 2008; Rendueles *et al.*, 2011); de este modo, variando la temperatura podría llegar a reducirse la presión y el tiempo de procesado. Diversas investigaciones demuestran que la inactivación que se consigue con determinados tratamientos aumenta de forma significativa si se éstos aplican a temperaturas moderadamente elevadas, en el intervalo entre 40 y 50 °C (Carlez *et al.*, 1993; Gervilla *et al.*, 1997; Patterson y Kilpatrick, 1998; Alpas *et al.*, 1999; Ponce *et al.*, 1999; Chen y Hoover, 2003). El efecto de temperaturas por debajo de la ambiente puede ser menos acusado, equivalente o superior; en cualquier caso, también pueden potenciar la inactivación por HHP, al menos, bajo determinadas condiciones, de acuerdo con los trabajos de Carlez *et al.* (1993), Hashizume *et al.* (1995), Gervilla *et al.* (1997), Perrier-Cornet *et al.* (2005) y Moussa *et al.* (2007).

b.4.2 - Factores relativos al microorganismo

En cuanto a los factores relativos al microorganismo, destacan los siguientes: el tipo, la especie (o incluso la cepa) y la fase de crecimiento.

Las HHP suelen tener un efecto más destructivo frente a microorganismos con un mayor grado de organización y una mayor complejidad estructural (Rendueles *et al.*, 2011). En consecuencia, los procariotas resultan normalmente más resistentes que los eucariotas. Para el caso de las bacterias, las gram positivas son más resistentes que las gram negativas, y los cocos más resistentes que los bacilos (Patterson, 2005); aunque existen excepciones. Por ejemplo, bajo ciertas condiciones de tratamiento *E. coli*, siendo un bacilo gram negativo, puede ser significativamente más resistente a la presión que *L. monocytogenes*, siendo un cocobacilo gram positivo (Alpas *et al.*, 1999). Por otro lado, se han detectado diferencias entre especies de un mismo género (Metrick *et al.*, 1989; Alpas *et al.*, 1999) e, incluso, entre cepas de una misma especie (Simpson y Gilmour, 1997; Alpas *et al.*, 1999; Benito *et al.*, 1999). Además, la fase de crecimiento también resulta determinante. Las bacterias en fase estacionaria son

más resistentes a la presión que las bacterias en fase de crecimiento exponencial (Rendueles *et al.*, 2011). Esto ocurre porque las características de la célula cambian. Según Mañas y Mackey (2004), respecto a las células en fase de crecimiento, las células en fase estacionaria son más pequeñas y redondas, modifican la composición de su membrana y podrían tener mecanismos para revertir los daños producidos por la presión a ese nivel.

b.4.3 - Factores relativos al producto procesado

Finalmente, la efectividad de las HHP para la inactivación de microorganismos en alimentos depende de la composición del producto y de características relacionadas con la composición, destacando el pH y la actividad de agua (a_w). Por consiguiente, los resultados obtenidos en disoluciones tampón (o de otro tipo), en medios de cultivo o en sistemas modelo no son extrapolables a los alimentos; al menos, no de forma directa (Patterson, 2005; Rendueles *et al.*, 2011). De acuerdo con otros autores, en los alimentos normalmente se necesitan tratamientos más intensos para conseguir la misma inactivación (Patterson, 2005; Considine *et al.*, 2008). Muchos estudios demuestran que la presencia de proteínas, glúcidos, lípidos y otros nutrientes puede tener un efecto protector en los microorganismos (Oxen y Knorr, 1993; Hashizume *et al.*, 1995; Simpson y Gilmour, 1997; Hauben *et al.*, 1998; Black *et al.*, 2007).

En referencia al pH se ha observado que cuanto menor es éste mayor es la susceptibilidad de los microorganismos a la presión (Alpas *et al.*, 2000).

c) Antimicrobianos de origen natural para garantizar la estabilidad microbiológica de los alimentos mínimamente procesados

En el ámbito de la alimentación el término “antimicrobiano” básicamente hace referencia a compuestos químicos, enzimas o sistemas enzimáticos, que de

forma directa o indirecta pueden afectar a la viabilidad o el crecimiento de los microorganismos en los alimentos.

Presentándose de forma natural o siendo deliberadamente añadidos incluso en los envases (Ramos-Villarroel *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2015), los antimicrobianos son muy útiles para garantizar la seguridad y la estabilidad microbiológica de los alimentos mínimamente procesados, aunque se mantengan en refrigeración, controlando de forma efectiva la supervivencia o el crecimiento de aquellos microorganismos que hayan resistido el tratamiento aplicado o que puedan colonizar el producto después, sobre todo si ocurre un fallo en la cadena de frío.

Lo ideal sería que los alimentos *per se* tuvieran propiedades antimicrobianas y por eso conviene evaluar el potencial de los mismos, incluso para aprovecharlos como ingredientes en la formulación de otros productos. En este sentido son especialmente interesantes los alimentos que además de ser antimicrobianos aporten otras ventajas, como, por ejemplo, efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor. Aun así, en ocasiones puede ser necesario, interesante o provechoso el uso de aditivos antimicrobianos (frente al uso de alimentos con propiedades antimicrobianas), teniendo en cuenta que éstos pueden ser efectivos a concentraciones mínimas (incluso, por debajo de la concentración mínima microbicida –CMM– y de la concentración mínima inhibitoria –CMI–), y, por otro lado, que pueden ir incorporados en el envase, asegurando una liberación controlada y prolongada en el tiempo. En esas circunstancias, para obtener alimentos que satisfagan las exigencias del mercado, hoy en día deben emplearse antimicrobianos naturales en lugar de antimicrobianos sintéticos (como venía haciéndose hasta ahora), aunque muchos de estos últimos se encuentran también en la naturaleza (Ramos-Villarroel *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2015). Este es el caso de los ácidos orgánicos, como el ácido acético (presente en el vinagre) o el ácido láctico (producido por bacterias ácido-

lácticas en una gran variedad de alimentos fermentados). Pese a ello, en la actualidad se potencia la obtención de antimicrobianos a partir de fuentes naturales, porque existe un creciente interés en productos no sólo mínimamente procesados, sino también libres de aditivos obtenidos en el laboratorio, que, en general, se perciben como artificiales y potencialmente dañinos. Además, fomentando la aplicación de antimicrobianos de origen natural se busca encontrar nuevas alternativas para evitar problemas de resistencia adquirida (Brul y Coote, 1999).

c.1) Tipos

Los antimicrobianos de origen natural pueden ser de origen animal, vegetal o microbiano (Tiwari *et al.*, 2009; Ramos-Villarroel *et al.*, 2011; Davidson *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2015).

c.1.1 - Antimicrobianos de origen animal

La mayoría de los antimicrobianos de origen animal son polipéptidos, proteínas no enzimáticas o enzimas, producidos por vertebrados de sangre caliente, algunos peces, anfibios e invertebrados, como los insectos (Tiwari *et al.*, 2009; Ramos-Villarroel *et al.*, 2011). Además existen lípidos antimicrobianos de origen animal, y, por otro lado, está el quitosano, que es un polisacárido (Ramos-Villarroel *et al.*, 2011). El quitosano se obtiene básicamente a partir del exoesqueleto de los mariscos y puede inhibir el crecimiento de patógenos, tales como: *Aspergillus flavus*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes* (Davidson *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2015).

c.1.2 - Antimicrobianos de origen vegetal

En referencia a los antimicrobianos de origen vegetal, cabe destacar que éstos puede que sean los más atractivos para los productores de alimentos; entre otros motivos, porque el consumidor percibe que los vegetales encajan a la perfección en el contexto de una alimentación sana y natural en lo que respecta al origen de

los productos que se ingieren. Por otro lado, muchos de ellos son aromatizantes o saborizantes permitidos para el uso en alimentos, bien porque ostentan la condición de “generalmente considerados como seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés) otorgada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), o bien porque han sido autorizados para tal fin (Burt, 2004). Además, muchos, si no todos, pueden tener efectos positivos sobre la salud (Davidson *et al.*, 2015). Todo ello facilita su aplicación y aceptación para la conservación de alimentos mínimamente procesados, como medidas de control adicionales, y por eso son una buena alternativa.

Los antimicrobianos de origen vegetal suelen encontrarse en los aceites esenciales de las plantas (Tiwari *et al.*, 2009), destacando los que se obtienen a partir de especias. Estos aceites, cuyo uso como aromatizantes o saborizantes en los alimentos está permitido (porque la mayoría son GRAS), se obtienen a partir de flores, semillas, frutos, yemas, hojas, ramas, cortezas, maderas, bulbos, rizomas o raíces (Burt, 2004; Tiwari *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2013), y se definen como mezclas aromáticas de metabolitos secundarios implicados en la defensa de las plantas frente a fitopatógenos, herbívoros e insectos (Burt, 2004).

c.1.3 - Antimicrobianos de origen microbiano

Finalmente, los antimicrobianos de origen microbiano son aquellos producidos por bacterias capaces de sintetizar compuestos que les proporcionan una ventaja competitiva para imponerse en el nicho ecológico que ocupan, acaparando el espacio y los nutrientes que ofrece el entorno (Davidson *et al.*, 2013). En este grupo se incluyen las bacteriocinas, muy convenientes por su estabilidad térmica, porque no cambian el sabor de los alimentos y porque se degradan en el tracto digestivo humano (Simha *et al.*, 2012).

Las bacteriocinas son péptidos ribosomales sintetizados por bacterias gram positivas y negativas (Tiwari *et al.*, 2009; Ramos-Villarroel *et al.*, 2011). Entre

ellas destacan las producidas por bacterias ácido-lácticas implicadas en la obtención de alimentos fermentados (como el yogur o la mantequilla), porque son producidas por microorganismos que se consideran seguros. En este subgrupo se incluye la nisina (producida por *Lactococcus lactis*); siendo, hasta la fecha, la única bacteriocina autorizada como aditivo alimentario (Espitia *et al.*, 2016).

c.2) Factores que influyen en su eficacia

La eficacia de cualquier antimicrobiano depende de muchos factores, que están relacionados con el propio antimicrobiano, pero también con el microorganismo al que se enfrentan y con el alimento al que se añadan.

c.2.1 - Factores relativos al antimicrobiano

De acuerdo con Davidson *et al.* (2015), la actividad de los antimicrobianos de origen natural depende de sus características fisicoquímicas, incluyendo: la polaridad, la carga neta, la solubilidad, la volatilidad y las propiedades ácido-base. Además, su actividad puede depender de la configuración molecular, puesto que se han descrito diferencias entre algunos enantiómeros (Lis-Balcnin *et al.*, 1999; Al-Baarri *et al.*, 2011). Otro aspecto relevante es la concentración; en principio, a más concentración más efecto, aunque esto no tiene porqué ser siempre así. De forma más indirecta también es importante la técnica empleada para la incorporación de los antimicrobianos en los alimentos o en los envases; sobre todo en el caso de los compuestos volátiles y de las mezclas que los contengan. Diversos estudios demuestran que el uso de nanoemulsiones y la nanoencapsulación puede aumentar la dispersión, la estabilidad y, por lo tanto, la eficacia de los aceites esenciales y la de sus componentes activos (Donsì *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2012).

Si se trabaja con aceites esenciales o con otras mezclas de antimicrobianos, la eficacia antimicrobiana puede depender también de la composición exacta que

tengan las mezclas, y para el caso concreto de los aceites esenciales, de cualquier aspecto que pueda modificar la composición, como las condiciones en las que se hayan desarrollado las plantas, el momento en el que éstas se recolecten o la parte destinada a la obtención del aceite (Burt, 2004; Tiwari *et al.*, 2009).

c.2.2 - Factores relativos al microorganismo

En cuanto a los factores relativos al microorganismo es imposible establecer generalidades. Aun así, se han descrito diferencias entre especies de distintos géneros, entre especies del mismo género e, incluso, entre cepas de la misma especie (Lis-Balcnin *et al.*, 1999; Periago *et al.*, 2001; Devlieghere *et al.*, 2004; Al-Nabulsi y Holley, 2006; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

Además, existen trabajos que demuestran que aumentar la concentración celular de partida (N_0) puede reducir la eficacia antimicrobiana de los antimicrobianos de origen natural (Ultee *et al.*, 2000; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

c.2.3 - Factores relativos al producto procesado

Finalmente, en referencia a los factores relativos al alimento resulta clave la composición del producto. Los antimicrobianos de origen natural muchas veces exhiben una actividad prometedora en medios de laboratorio, pero poca o ninguna en los alimentos, bajo condiciones similares (Davidson *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2015). Esto implica que en los alimentos pueden necesitarse concentraciones mayores para lograr el mismo resultado.

Algunos trabajos confirman que la actividad de los antimicrobianos de origen natural puede disminuir en presencia de proteínas, lípidos, glúcidos, aniones y cationes (Ultee *et al.*, 2000; Devlieghere *et al.*, 2004; Veldhuizen *et al.*, 2007; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Al-Baarri *et al.*, 2011). En base a éstos, Davidson *et al.* (2013) concluyen que la aplicación de antimicrobianos de

origen natural en bebidas a base de glúcidos (como es el caso de los zumos) sería mucho más sencilla y efectiva que la aplicación en productos horneados (como el pan), seguidos por frutas y vegetales, lácteos, productos cárnicos y productos del mar. Según estos autores, las bebidas a base de glúcidos serían los alimentos más adecuados para la adición de antimicrobianos de origen natural porque son productos homogéneos, ácidos, con pocas proteínas y pocas grasas (justo al contrario que los productos cárnicos y los del mar). No obstante, el efecto opuesto, es decir, que la presencia de nutrientes promueva la actividad antimicrobiana, también se ha descrito (Ultee *et al.*, 2000; Al-Nabulsi y Holley, 2006). Además, en relación al producto es importante su fracción no nutritiva, las características del procesado al que se someta y las condiciones en las que mantenga después.

La presencia de componentes no nutritivos (mostrando actividad antimicrobiana o no) y la combinación con otros métodos de conservación puede disminuir o aumentar la eficacia de los antimicrobianos de origen natural (Ultee *et al.*, 2000; Karatzas *et al.*, 2001; Periago *et al.*, 2001; Al-Nabulsi y Holley, 2006; Galvagno *et al.*, 2007; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Techathuvanan *et al.*, 2014). Por otro lado, durante el almacenamiento la actividad puede variar en función de la temperatura (Karatzas *et al.*, 2001; Al-Nabulsi y Holley, 2006; Veldhuizen *et al.*, 2007; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010), y para algunos aceites esenciales se ha demostrado que su eficacia antimicrobiana aumenta en muestras envasadas al vacío o en atmósferas modificadas (Tsigarida *et al.*, 2000).

c.3) Otros aspectos a tener en cuenta para la aplicación de antimicrobianos de origen natural

A la hora de seleccionar e incorporar en un alimento o en un envase cualquier antimicrobiano de origen natural no sólo deben considerarse los factores que puedan influir en su eficacia. Sean de origen animal, vegetal o microbiano,

interesa que sean efectivos a bajas concentraciones y en su forma original (sin necesidad de ninguna transformación); que sean económicos (considerando todos los costes asociados a su uso); que no alteren las características sensoriales de los alimentos (al menos, no negativamente); que tengan un amplio espectro de acción, o que resulten efectivos para la resolución de un problema concreto (lo cual es muy útil en alimentos fermentados, para que el uso de antimicrobianos no afecte al proceso de fermentación), y que no generen resistencias.

Adicionalmente, si los antimicrobianos se incorporan a los alimentos o en los envases antes de procesar, es fundamental que los escogidos sean estables durante el procesado en cuestión; y, en cualquier caso, que estén permitidos según la legislación vigente, puesto que natural no necesariamente significa seguro (Davidson *et al.*, 2015). En la actualidad, para demostrar que un antimicrobiano es seguro tienen que evaluarse las características toxicológicas de éste y de sus metabolitos, la toxicidad que pueda derivarse de la interacción con el resto de componentes del alimento y su alergenicidad en los individuos sensibles; todo, bajo las condiciones en las que se pretende emplear (Davidson *et al.*, 2015).

d) Microbiología predictiva para modelizar y cuantificar el efecto de tecnologías y de conservantes antimicrobianos

En el primer libro sobre microbiología predictiva, McMeekin *et al.* (1993) la definieron como una ciencia cuantitativa para evaluar objetivamente el efecto de las operaciones de procesado, distribución y almacenamiento sobre la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos (Fakruddin *et al.*, 2011; Arroyo-López *et al.*, 2012). Con este objetivo se desarrollan modelos matemáticos que describen y predicen el comportamiento de los microorganismos (de acuerdo con los datos experimentales y bajo condiciones específicas), en términos de crecimiento, supervivencia o inactivación. Para ello, la microbiología predictiva

asume que las respuestas de las poblaciones microbianas a los factores ambientales son reproducibles (Ross y McMeekin, 1994; Fakruddin *et al.*, 2011), de manera que puede llegar a predecirse la respuesta en condiciones no ensayadas, por interpolación entre puntos que sí que se han estudiado (Ross y McMeekin, 1994; Fakruddin *et al.*, 2011).

Los modelos matemáticos desarrollados y empleados para la descripción y la predicción de la respuesta microbiana, en cualquier caso, son ecuaciones o conjuntos de éstas, que representan la realidad a estudio de forma simplificada, explicando la relación que hay entre las observaciones del sistema escogido y los factores que se cree que las causan; o lo que es lo mismo, entre las variables dependientes que describen el comportamiento microbiano y las variables independientes que definen las condiciones ambientales del sistema en cuestión (Arroyo-López *et al.*, 2012). Las condiciones ambientales incluyen los factores asociados a la presencia de otros microorganismos, además de los factores del entorno más allá del alimento (como, por ejemplo, la temperatura) y de los factores relacionados con el alimento en sí (como, por ejemplo, el pH o la a_w) (Fakruddin *et al.*, 2011; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

Con independencia del sistema estudiado, todos los modelos deberían ser suficientemente complejos para aportar información útil, pero lo bastante simples como para ser fáciles de manejar, incorporando, por tanto, el menor número de factores posible (García y Zurera, 2004). Este equilibrio entre complejidad y simplicidad, sin embargo, hace que no exista un modelo óptimo para todas las situaciones (García y Zurera, 2004). Por tanto, modelizar se define como la acción de construir un modelo que se ajusta sólo a condiciones concretas, aunque se construya a partir de una ecuación general conocida.

La microbiología predictiva actualmente tiene aplicaciones dentro y fuera del ámbito de la microbiología de los alimentos (Membré y Lambert, 2008; Mendes

et al., 2011; Esser *et al.*, 2015). Dentro de este ámbito, no obstante, resulta especialmente conveniente para evaluar la calidad y la seguridad microbiológica de los alimentos. En este sentido, los modelos matemáticos predictivos sirven para realizar estudios de vida útil (García y Zurera, 2004; Fakruddin *et al.*, 2011; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). De hecho, el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 sobre los criterios microbiológicos aplicables a los alimentos en la UE (Comisión Europea, 2005) reconoce el uso de modelos predictivos como una herramienta complementaria útil para demostrar que los alimentos cumplen con los requerimientos exigidos.

Por otro lado, los modelos matemáticos predictivos permiten el desarrollo o la reformulación de productos microbiológicamente estables y seguros, valorando, entre otros aspectos, el efecto y la eficacia de los tratamientos y conservantes aplicados para reducir o controlar la presencia de microorganismos (Fakruddin *et al.*, 2011; Arroyo-López *et al.*, 2012; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). Otras aplicaciones incluyen determinar los criterios de proceso y los límites de control que son importantes en el marco de programas para el APPCC (García y Zurera, 2004; Fakruddin *et al.*, 2011; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). Además, los modelos matemáticos predictivos pueden ser herramientas educativas muy útiles para ilustrar la influencia y los efectos de los factores ambientales sobre los microorganismos en los alimentos (Fakruddin *et al.*, 2011; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

d.1) Tipos de modelos

Los modelos matemáticos utilizados tanto para la descripción como para la predicción del comportamiento microbiano pueden clasificarse atendiendo a distintos criterios.

Según el nivel de complejidad, los modelos pueden ser primarios, secundarios o terciarios. Los modelos primarios evalúan cómo cambia la concentración de

microorganismos con el tiempo para un conjunto de condiciones específicas, de acuerdo con el valor de parámetros que caracterizan la respuesta observada, sea crecimiento, supervivencia o inactivación (Whiting y Buchanan, 1993). Para la modelización del crecimiento suelen utilizarse funciones sigmoideas que describen las 3 primeras fases de una curva típica en un sistema cerrado (con recursos finitos), que consta realmente de al menos 4 fases: la fase de latencia o de adaptación al entorno; la fase logarítmica o de crecimiento exponencial; la fase estacionaria, y la fase de declive, inactivación o muerte, con un descenso progresivo de la población, debido, en parte, a la falta de nutrientes y a la acumulación de metabolitos tóxicos (Figura I.3) (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

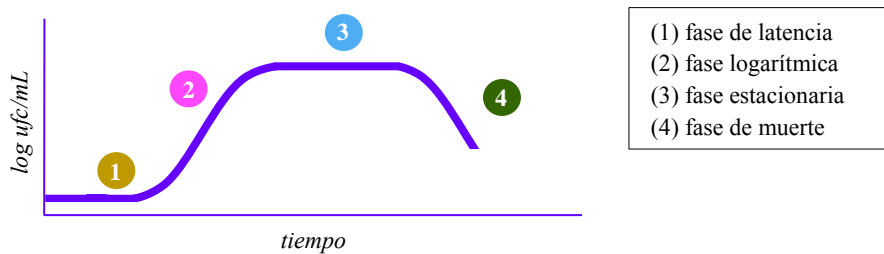


Figura I.3 Esquema de las etapas que componen una curva de crecimiento microbiano típica en un sistema cerrado (Basado en: Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

En relación a esta curva, los parámetros que normalmente describen el crecimiento son los siguientes: “duración del tiempo de latencia” (λ), “velocidad de crecimiento máxima” ($\mu_{m\acute{a}x}$) y “concentración celular alcanzada en fase estacionaria” (N_f) (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

Para la supervivencia o la inactivación, en cambio, existe un abanico variado de pautas posibles (Geeraerd *et al.*, 2005; Coroller *et al.*, 2006); algunas de ellas se muestran en la Figura I.4.

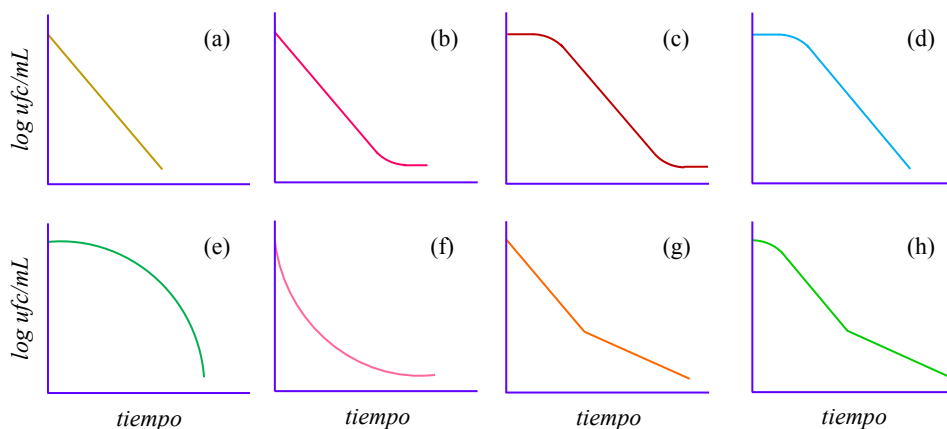


Figura I.4 Esquema de algunas de las curvas de supervivencia e inactivación descritas hasta la fecha: (a) lineal, (b) lineal con cola, (c) sigmoidea, (d) lineal con hombro, (e) cóncava, (f) convexa, (g) bifásica y (h) bifásica con hombro (Basado en: Xiong *et al.*, 1999; Geeraerd *et al.*, 2005; Coroller *et al.*, 2006).

Por otro lado, los modelos secundarios permiten conocer cómo cambian los parámetros de los modelos primarios con respecto a una o varias condiciones ambientales (Whiting y Buchanan, 1993). Y finalmente, los modelos terciarios combinan uno o más modelos primarios y secundarios para ofrecer al usuario, a través de una aplicación informática sencilla, diferentes predicciones en relación al crecimiento, la supervivencia o la muerte de los microorganismos en los alimentos. De este modo, los modelos terciarios permiten comparar los efectos de diferentes condiciones ambientales, determinar la respuesta en condiciones cambiantes y evaluar el comportamiento de varios microorganismos a la vez (Whiting y Buchanan, 1993).

Adicionalmente, los modelos pueden ser deterministas o probabilísticos, según su finalidad, y empíricos o mecanicistas, según la información que se emplee para construirlos. Los modelos deterministas (también conocidos como modelos cinéticos) son aquellos que explican el tiempo necesario para una determinada

respuesta, de acuerdo con las condiciones ambientales. Frente a éstos, los modelos probabilísticos (o estocásticos) predicen la probabilidad de que ocurra (o no) un evento específico, sin importar la tasa a la que pueda ocurrir (Fakruddin *et al.*, 2011). Por último, con independencia de la complejidad y la finalidad, los modelos empíricos se construyen a partir de datos experimentales, con fines puramente descriptivos, mientras que los modelos mecanicistas se construyen sobre una base teórica, permitiendo no sólo predecir, sino también interpretar los resultados a partir de una hipótesis de partida (Fakruddin *et al.*, 2011).

d.2) Etapas para la modelización

El proceso de modelización consta de 4 etapas: (i) definición del problema y diseño experimental, (ii) obtención y análisis de los datos, (iii) ajuste de los datos a un modelo y (iv) validación del modelo ajustado.

d.2.1 - Definición del problema y diseño experimental

En el planteamiento de un modelo es muy importante definir cuál es problema que motiva su desarrollo y cuál es el objetivo para el que se desarrolla (Davies, 1993). Esto es importante no sólo porque justifica la tarea, sino también porque facilita una planificación adecuada y precisa de los experimentos, aprovechando al máximo los recursos, el tiempo y el esfuerzo invertidos.

En cualquier circunstancia, para organizar el trabajo experimental es muy útil considerar como mínimo las siguientes cuestiones (Devlieghere, 2000 - según Pérez-Rodríguez y Valero, 2013): (i) cuáles son los factores que tienen una influencia significativa sobre el problema y el objetivo; (ii) cuál es el intervalo de fluctuación para esas variables (considerando los niveles típicos, posibles o permitidos en la práctica); (iii) cuáles son las características del inóculo que se va a estudiar (incluyendo la concentración, el estado fisiológico, la forma de inoculación y si se trata de un microorganismo o una mezcla); (iv) cuál es la

matriz más adecuada para el estudio (pudiendo escoger entre un medio de laboratorio estándar, un medio modelo o un alimento), y (v) cómo se efectuará el registro de datos experimentales.

Además, se recomienda realizar ensayos preliminares de cribado (Davies, 1993; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013) para minimizar de forma coherente el número de variables independientes que se incorporarán finalmente al modelo. Reducir el número de variables es muy importante porque tradicionalmente se escogen diseños experimentales completos, ensayando todas las combinaciones posibles de los valores escogidos para los factores considerados (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

d.2.2 - Obtención y análisis de los datos

Una vez definido el diseño experimental, el siguiente paso consiste en obtener y analizar las observaciones experimentales.

Actualmente existe un abanico variado de metodologías para obtener datos relacionados con la proliferación, la supervivencia o la inactivación microbiana, que permiten construir curvas de crecimiento, supervivencia o muerte, y, en definitiva, que permiten modelizar la respuesta de los microorganismos según las condiciones ambientales. Entre ellas destaca el recuento en placa, porque permite hacer un seguimiento directo del crecimiento, la supervivencia o la inactivación en cualquier matriz (sea líquida o sólida; se trate de un medio de laboratorio, de un medio modelo o de un alimento real) (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

Además, también puede estimarse el crecimiento, la supervivencia o la muerte, de forma directa y a nivel de célula, empleando colorantes fluorescentes, por citometría de flujo; y estimar el crecimiento de forma indirecta, por ejemplo, por turbidimetría, de acuerdo con la absorbancia de los cultivos celulares (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). Para esta última alternativa existen equipos

automatizados que permiten llevar a cabo muchos ensayos a la vez (iguales o distintos), usando placas multipocillo e invirtiendo muy poco volumen de muestra.

Con independencia de la metodología escogida, siempre se recomienda acumular el mayor número de datos posible para desarrollar modelos robustos, respaldados por una gran cantidad de evidencias. En este sentido es importante disponer de muchos datos por réplica, de varias réplicas por repetición y de varias repeticiones. Al respecto, no habiéndose determinado un número óptimo en ninguno de los 3 casos, se recomienda un mínimo de 10 puntos por curva (Walker y Jones, 1993). Otro aspecto importante es la distribución de los puntos (Walker y Jones, 1993; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013); lo apropiado es que estén repartidos de forma que todas las etapas de la curva estudiada queden bien descritas, haciendo especial hincapié en los puntos de inflexión y en las zonas adyacentes (Walker y Jones, 1993).

En cualquier caso los datos experimentales deben analizarse para garantizar que la variabilidad observada es aceptable. Este análisis puede efectuarse mediante parámetros estadísticos tales como la desviación estándar (*SD*, por sus siglas en inglés; Ecuación I.1) o el coeficiente de variación (*CV*; Ecuación I.2),

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (\text{Ecuación I.1})$$

$$CV = \frac{SD}{|\bar{y}|} \times 100 \quad (\text{Ecuación I.2})$$

donde y_i representa los valores observados; \bar{y} , el promedio de y_i (Ecuación I.3), y n , el número total de observaciones.

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} \quad (\text{Ecuación I.3})$$

d.2.3 - Ajuste de los datos a un modelo para la modelización

Habiendo obtenido un conjunto de datos experimentales, para la modelización éstos se ajustan a un modelo primario (que puede ser conocido o desarrollado ex profeso). De este modo se obtiene un modelo ajustado que permite cuantificar el valor de los parámetros que describen el comportamiento observado en las condiciones ensayadas. En base a éstos pueden desarrollarse también modelos secundarios ajustados.

En ambos casos, para ajustar los datos experimentales a una ecuación se utilizan métodos de regresión, optimizando el valor de los coeficientes, y, por lo tanto, minimizando las diferencias observadas entre los datos obtenidos y los valores predichos por el modelo ajustado (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

d.2.4 - Validación de los resultados

Finalmente, los modelos ajustados deben validarse para evaluar la fiabilidad y precisión de las descripciones y las predicciones hechas a partir de éstos. El proceso de validación consiste en analizar la bondad de los ajustes y confirmar las predicciones del modelo.

Idealmente la validación debería ser externa, generando datos experimentales nuevos en un alimento, para el microorganismo o la mezcla estudiados. Sin embargo, también se acepta la validación externa en matrices artificiales o a partir de datos publicados en la literatura científica e, incluso, la validación interna, aprovechando los datos obtenidos para construir el modelo (García y Zurera, 2004; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). En cualquier caso, la validación puede efectuarse gráficamente, o bien en base a índices estadísticos que pueden ser generales o específicos para esta tarea en el contexto de la microbiología de los alimentos (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

Entre los estadísticos generales que se utilizan para la validación de modelos matemáticos predictivos se incluyen el coeficiente de determinación corregido

(r^2 corregido; Ecuación I.4) y el error cuadrático medio (MSE , por sus siglas en inglés; Ecuación I.5),

$$r^2_{\text{corregido}} = 1 - \frac{SCR/g_{SCR}}{SCT/g_{SCT}} = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2/n - p}{\sum (y_i - \bar{y})^2/n - 1} \quad (\text{Ecuación I.4})$$

$$MSE = \frac{SCR}{g_{SCR}} = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - p} \quad (\text{Ecuación I.5})$$

donde SCR representa la suma de cuadrados residual; g_{SCR} , los grados de libertad correspondientes a la SCR ; SCT , la suma de cuadrados total; g_{SCT} , los grados de libertad correspondientes a la SCT ; y_i , los valores observados; \hat{y}_i , los valores estimados por el modelo ajustado; \bar{y} , el promedio de y_i (Ecuación I.3); n , el número total de observaciones, y p , el número de parámetros del modelo.

Por otro lado, entre los estadísticos específicos utilizados para la validación destacan el factor de sesgo (B_f , por sus siglas en inglés; Ecuación I.6) y el factor de precisión (A_f , por sus siglas en inglés; Ecuación I.7) (Ross, 1996),

$$B_f = 10^{\sum \frac{\log(\hat{y}_i/y_i)}{n}} \quad (\text{Ecuación I.6})$$

$$A_f = 10^{\sum \frac{|\log(\hat{y}_i/y_i)|}{n}} \quad (\text{Ecuación I.7})$$

donde \hat{y}_i representa los valores estimados por el modelo ajustado; y_i , los valores observados, y n , el número total de observaciones.

Objetivos

El objetivo fundamental de esta tesis fue **evaluar el potencial conservante de antimicrobianos de origen vegetal para alargar la vida útil de alimentos mínimamente procesados por HHP**. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar el potencial antimicrobiano de carvacrol, citral, asaí (*Euterpe oleracea* Mart.) y estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) frente a microorganismos no patógenos sustitutos de patógenos de transmisión alimentaria, cuantificando el efecto logrado con dosis no inhibitorias del crecimiento, en medio de referencia, a distintas temperaturas.
- Desarrollar una bebida a base de zumos y cuantificar el efecto antimicrobiano de la estevia frente a un patógeno de transmisión alimentaria, a distintas temperaturas.
- Estudiar el efecto antimicrobiano obtenido al combinar el uso de estevia con el procesado por HHP para garantizar la seguridad y la estabilidad microbiológica de la bebida formulada, frente a un patógeno de transmisión alimentaria, a distintas temperaturas.
- Optimizar el procesado por HHP en presencia de estevia para obtener una bebida vegetal mínimamente procesada, microbiológicamente segura, enzimáticamente estable y rica en compuestos antioxidantes.

Plan de trabajo

Para el desarrollo de los objetivos planteados se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión bibliográfica de aspectos teórico-prácticos relacionados con el desarrollo de la presente tesis doctoral.
2. Estudio del potencial antimicrobiano de **carvacrol** y **citral**, frente a *E. coli* K12 y *L. innocua*, en medio de referencia, a 37, 30, 15 y 8 °C.
 - 2.1. Determinación de la CMI para las bacterias y las temperaturas ensayadas.
 - 2.2. Obtención de curvas de crecimiento en presencia de dosis sub-CMI para el rango de temperaturas considerado.
 - 2.3. Ajuste de las curvas obtenidas a la ecuación modificada de Gompertz.
 - 2.4. Cuantificación y discusión del efecto antimicrobiano observado de acuerdo con la concentración de antimicrobiano y la temperatura de incubación, según el valor de los parámetros cinéticos λ y $\mu_{m\acute{a}x}$.
3. Estudio del potencial antimicrobiano de un extracto de bayas de **asaí**, frente a *L. innocua*, en medio de referencia, a 37, 22 y 10 °C.
 - 3.1. Determinación de la CMI a 37 °C.

- 3.2. Obtención de curvas de crecimiento en presencia de dosis sub-CMI para el rango de temperaturas considerado.
 - 3.3. Ajuste de las curvas obtenidas a la ecuación modificada de Gompertz.
 - 3.4. Cuantificación y discusión del efecto antimicrobiano observado de acuerdo con la concentración de asaí y la temperatura de incubación, según el valor de los parámetros cinéticos λ y $\mu_{m\acute{a}x}$.
4. Estudio del potencial antimicrobiano de distintos productos de **estevia**, frente a *L. innocua*, en medio de referencia, a 37, 22 y 10 °C.
- 4.1. Obtención de curvas de crecimiento en presencia de dosis sub-CMI para el rango de temperaturas considerado.
 - 4.2. Ajuste de las curvas obtenidas a la ecuación modificada de Gompertz.
 - 4.3. Cuantificación y discusión del efecto antimicrobiano observado de acuerdo con la concentración de estevia y la temperatura de incubación, según el valor de los parámetros cinéticos λ y $\mu_{m\acute{a}x}$.
5. Estudio del potencial antimicrobiano de una infusión de estevia frente a *L. monocytogenes*, en una **bebida a base de zumos**, a 37 y 10 °C.
- 5.1. Formulación de la bebida.
 - 5.2. Obtención de curvas de supervivencia en presencia de distintas concentraciones de estevia a las temperaturas consideradas.
 - 5.3. Ajuste de las curvas obtenidas a la distribución de frecuencias de Weibull.
 - 5.4. Cuantificación y discusión del efecto antimicrobiano observado de acuerdo con la concentración de estevia y con la temperatura de

incubación, según el valor de los parámetros b y n de la distribución de frecuencias de Weibull.

- 5.5. Cuantificación del daño subletal producido durante el almacenamiento en presencia de estevia.

6. Estudio del potencial antimicrobiano del procesado por **HHP**, en presencia de estevia, frente a *L. monocytogenes*, en una bebida a base de zumos, a 37 y 10 °C.
 - 6.1. Estudio cinético de la supervivencia posprocesado mediante HHP, en presencia y ausencia de estevia.
 - 6.2. Ajuste de las curvas obtenidas a la distribución de frecuencias de Weibull.
 - 6.3. Cuantificación y discusión de la inactivación y el daño subletal producidos mediante HHP, de acuerdo con el nivel de presión, el tiempo de tratamiento y la concentración de estevia, según los recuentos celulares obtenidos y el valor de los parámetros b y n de la distribución de frecuencias de Weibull.
 - 6.4. Obtención de curvas de supervivencia posprocesado por HHP, durante el almacenamiento en presencia y ausencia de estevia, a las temperaturas consideradas.
 - 6.5. Ajuste de las curvas obtenidas a la distribución de frecuencias de Weibull.
 - 6.6. Cuantificación y discusión de la inactivación y el daño subletal producidos de acuerdo con las condiciones el tratamiento mediante HHP, la concentración de estevia, la temperatura y el tiempo de almacenamiento posprocesado, según los recuentos celulares obtenidos y el valor de los parámetros b y n de la distribución de frecuencias de Weibull.

7. **Optimización** de los factores implicados en la conservación de la bebida desarrollada, combinando la adición de estevia con el procesado por HHP y evaluando parámetros de calidad microbiológica, enzimática y funcional.
 - 7.1. Desarrollo de un diseño central compuesto para los factores “concentración de estevia”, “nivel de presión” y “tiempo de tratamiento”.
 - 7.2. Procesado de las muestras de acuerdo con el diseño experimental desarrollado.
 - 7.3. Determinación cuantitativa de la inactivación microbiana frente a *L. monocytogenes*.
 - 7.4. Determinación cuantitativa de la inhibición de las actividades polifenoloxidasas (PPO; EC 1.10.3.1, EC 1.14.18.1) y peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7).
 - 7.5. Determinación cuantitativa de los cambios producidos en el contenido total de compuestos fenólicos (TPC, por sus siglas en inglés) y en la capacidad antioxidante total (TAC, por sus siglas en inglés).
 - 7.6. Optimización del proceso combinado mediante la metodología de superficies de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés).

Capítulos de la tesis

De acuerdo con los objetivos y el plan de trabajo, la parte experimental se organizó en 5 capítulos:

Capítulo 1. Cuantificación del efecto antimicrobiano de aditivos alimentarios de origen vegetal en medio de referencia.

1.1 *Evaluación de la actividad antimicrobiana del carvacrol.*

1.2 *Evaluación de la actividad antimicrobiana del citral.*

Capítulo 2. Cuantificación del efecto antimicrobiano de alimentos de origen vegetal en medio de referencia.

2.1 *Evaluación de la actividad antimicrobiana del asái.*

2.2 *Evaluación de la actividad antimicrobiana de la estevia.*

Capítulo 3. Evaluación del potencial antimicrobiano de una infusión de hojas secas de estevia en una matriz alimentaria.

Capítulo 4. Evaluación del potencial antimicrobiano de las altas presiones hidrostáticas combinadas con la adición de estevia en una matriz alimentaria.

Capítulo 5. Optimización de los factores implicados en la conservación de alimentos combinando la adición de estevia con la aplicación de altas presiones hidrostáticas.

1

Cuantificación del efecto antimicrobiano de aditivos alimentarios de origen vegetal en medio de referencia

1.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana del carvacrol

1.1.1 Introducción

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se atribuye sobre todo a compuestos fenólicos (Cosentino *et al.*, 1999; Kalemba y Kunicka, 2003), como el carvacrol, cuya presencia se ha detectado en los aceites esenciales de un buen número de plantas, incluyendo especias como el orégano (*Origanum vulgare* L.), el tomillo (*Thymus vulgaris* L.) o la ajedrea silvestre (*Satureja montana* L.) (Burdock, 2009; Hyldgaard *et al.*, 2012).

El carvacrol es un aditivo alimentario GRAS (Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012), que se emplea como aromatizante o saborizante en productos horneados, en lácteos, chicles, caramelos, gelatinas, púdines, salsas y bebidas (Burdock, 2009), en los que también podría funcionar como agente conservante, dada su capacidad antimicrobiana de amplio espectro (Kiskó y Roller, 2005; Knowles *et al.*, 2005).

Estudios basados en la determinación de la CMM y la CMI evidencian que el carvacrol es un agente biostático y biocida efectivo frente a hongos y bacterias de todo tipo (Kim *et al.*, 1995; Ultee *et al.*, 1998; Chami *et al.*, 2004; Kiskó y Roller, 2005; Ait-Ouazzou *et al.*, 2011). No obstante, existe poca información referente a sus efectos sobre la cinética de crecimiento microbiano a dosis no inhibitorias, más fácilmente asimilables por el consumidor, considerando que el carvacrol tiene un aroma picante y un sabor intenso (Burdock, 2009).

A nivel práctico, los estudios cinéticos resultan interesantes teniendo en cuenta (i) que la CMM y la CMI varían en función de muchos factores (entre ellos, la temperatura); (ii) que los alimentos nunca se mantienen bajo condiciones perfectamente definidas y controladas; (iii) que la eficacia de los aceites esenciales y la de sus constituyentes es menor en los alimentos, y (iv) que los estudios cinéticos permiten, por un lado, construir una matriz de respuestas en función de las condiciones ambientales, y por otro, optimizar el uso de dosis efectivas mínimas (convenientes no sólo desde un punto de vista sensorial, sino también desde un punto de vista económico).

En consecuencia, se cuantificó y modelizó el efecto de la concentración de carvacrol, en medio de referencia, a distintas temperaturas (37, 30, 15 y 8 °C), sobre la cinética de crecimiento de *E. coli* K12 y *L. innocua*, como sustitutos no patógenos de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Char *et al.*, 2010; Jadhav *et al.*, 2013).

1.1.2 Material y métodos

Microorganismos

A partir de un líofilo proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), se prepararon 100 viales con *E. coli* K12 CECT 433, originalmente aislada de heces humanas.

Con este objetivo, el líofilo se rehidrató empleando 10 mL de caldo nutritivo (NB, por sus siglas en inglés; Scharlab SL, Barcelona, España). Cuando se dispuso de una disolución homogénea, 5 mL de muestra se transfirieron a un matraz con 100 mL de NB. El matraz se mantuvo a 37 °C, en agitación continua de vaivén (70 rev/min), durante 6 h. Pasado ese tiempo, el cultivo se dividió en 2 porciones de 50 mL. Cada porción se dispuso en un matraz con 500 mL de NB. Para obtener células en fase estacionaria, ambos matraces se mantuvieron a 37 °C, en agitación continua de vaivén (70 rev/min), 10 h. A continuación, los

cultivos se centrifugaron por duplicado ($3836 \times g$, 15 min, a 4°C). El sedimento de cada matraz se resuspendió en 100 y 50 mL de NB, tras la primera y la segunda centrifugación, respectivamente. El volumen final (50×2 mL) se mezcló, se homogeneizó y se almacenó a -80°C , repartido en 100 crioviales de 2 mL, con 1 mL de cultivo y 1 mL de glicerol (Scharlab SL, Barcelona, España) al 20 % (v:v) en NB.

La concentración celular promedio de los viales se determinó por recuento en placa, empleando agua de peptona tamponada al 0,1 % (p:v) (Scharlab SL, Barcelona, España) y agar nutritivo (NA, por sus siglas en inglés; Scharlab SL, Barcelona, España). El recuento se realizó tras 24 h de incubación a 37°C , partiendo de 4 viales descongelados a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta el factor de dilución requerido para un recuento fiable de entre 30 y 300 colonias por placa (Sutton, 2011), el valor obtenido fue: $6,81 \times 10^9 \pm 1,21 \times 10^9$ ufc/mL.

Siguiendo el mismo procedimiento, se obtuvo un conjunto de 100 viales con *L. innocua* CECT 910, originalmente aislada de cerebro de vaca. Con este objetivo se consideraron algunas modificaciones:

- ✓ Para recuperar el liófilo y obtener y conservar el cultivo se utilizó caldo triptona soja (TSB, por sus siglas en inglés; Scharlab SL, Barcelona, España).
- ✓ Para obtener células en fase estacionaria los inóculos se mantuvieron en agitación durante 21 h.
- ✓ Para determinar la concentración celular de los viales se utilizó agar triptona soja (TSA, por sus siglas en inglés; Scharlab SL, Barcelona, España), y el recuento se efectuó tras 48 h de incubación.

La concentración promedio de estos viales fue: $4,02 \times 10^9 \pm 5,49 \times 10^8$ ufc/mL.

Procedimiento experimental

Se prepararon frascos con 10 mL de NB o TSB, para *E. coli* K12 y *L. innocua*, respectivamente. Al caldo estéril se le añadió carvacrol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) diluido en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) (İşcan *et al.*, 2002; Botelho *et al.*, 2007; Muriel-Galet *et al.*, 2012). De este modo se obtuvieron frascos con distintas concentraciones de carvacrol (0,02-2,00 µL/mL; Tabla 1.1).

Las concentraciones ensayadas se fijaron tras determinar la CMI, definida en este caso como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de *E. coli* K12 o *L. innocua*, durante 300 h (12,5 d) de incubación, a las temperaturas consideradas (37, 30, 15 y 8 °C).

Tabla 1.1 Concentraciones ensayadas para el carvacrol en función del microorganismo y de la temperatura.

| Microorganismo | °C | Concentraciones ensayadas (µL/mL) |
|-----------------------------|----|--|
| <i>Escherichia coli</i> K12 | 37 | 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,15; 0,16 |
| | 30 | 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,15; 0,16 |
| | 15 | 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,15; 0,20; 0,40; 0,80; 1,60; 2,00 |
| | 8 | 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,15; 0,20; 0,40; 0,80; 1,60; 2,00 |
| <i>Listeria innocua</i> | 37 | 0,050; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250 |
| | 30 | 0,050; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250 |
| | 15 | 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250; 0,500; 1,000; 1,250; 1,500; 1,750; 2,000 |
| | 8 | 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250; 0,500; 1,000; 1,250; 1,500; 1,750; 2,000 |

Los frascos conteniendo caldo y carvacrol se inocularon con aproximadamente 1×10^7 ufc/mL, diluyendo los cultivos de partida en agua de peptona tamponada al 0,1 % (p:v). Los pocillos de placas multipocillo de poliestireno estériles

(Deltalab SL, Barcelona, España) se rellenaron con 250 μL de caldo de cultivo inoculado, con distintas concentraciones de carvacrol.

En cada experiencia se incluyeron, además, controles negativos y controles positivos; es decir, pocillos conteniendo medio de cultivo, con y sin carvacrol diluido en DMSO, y pocillos conteniendo caldo inoculado, en ausencia de carvacrol. Independientemente de la temperatura, las placas se incubaron en agitación doble orbital (500 rev/min) y la absorbancia de los cultivos se midió a 600 nm. Las lecturas se tomaron a intervalos de tiempo regulares, tras 20 s de agitación vigorosa y hasta alcanzarse la fase estacionaria, durante un periodo máximo de 300 h (12,5 d). A 37 y 30 $^{\circ}\text{C}$, la absorbancia de los cultivos se midió cada 30 min. A 15 y 8 $^{\circ}\text{C}$ se registró cada 10 y 24 h, respectivamente. Para ello se utilizó un lector automático de microplacas (POLARstar Omega plate reader, BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania).

La reproducibilidad de los resultados se garantizó efectuando, al menos, 3 repeticiones de cada combinación ensayada, con un mínimo de 4 réplicas por repetición. Además se evaluó el *CV* (Ecuación I.2) de las réplicas por punto, teniendo en cuenta que un 20 % es, en principio, el valor máximo aceptable (Granato y Calado, 2014).

Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos

Cuando se observó crecimiento, a cada dato de densidad óptica se le sustrajo la absorbancia promedio de los controles negativos (Valero *et al.*, 2006; Sampath *et al.*, 2011), con carvacrol y DMSO. Los resultados obtenidos se transformaron en recuentos celulares (log ufc/mL) mediante curvas de calibración previamente definidas, para concentraciones celulares entre 6 y 10 log ufc/mL, en función del microorganismo y de la temperatura (Valero *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2012). Las curvas de calibración se validaron en base al coeficiente de correlación de *Pearson* (*r*; Ecuación 1.1),

$$r = \sqrt{1 - \frac{SCR}{SCT}} = \sqrt{1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

donde SCR representa la suma de cuadrados residual; SCT , la suma de cuadrados total; y_i , los valores observados; \hat{y}_i , los valores estimados por el modelo, e \bar{y} , el promedio de y_i , calculado según la Ecuación I.3.

La concordancia entre los recuentos obtenidos y los predichos por las curvas de calibración se evaluó también mediante el estadístico A_f (Ecuación I.7).

Una vez hecha la transformación, los recuentos se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz (Gibson *et al.*, 1988) (Ecuación 1.2),

$$\log N_t = A + C \times e^{-B \times (t - M)} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

donde N_t (ufc/mL) representa la concentración celular a tiempo t (h); A (log ufc/mL), el valor estimado para la asíntota inferior de la curva de crecimiento; C (log ufc/mL), el valor estimado para la diferencia entre las dos asíntotas de la curva; B (1/h), la velocidad de crecimiento relativo a M ; M (h), el tiempo transcurrido hasta que se alcanza la $\mu_{m\acute{a}x}$, y e , la constante matemática e ($\approx 2,7183$).

La ecuación modificada de Gompertz ha sido extensamente utilizada para la descripción matemática del crecimiento microbiano en medios de cultivo y en alimentos, en parte, porque todos sus parámetros tienen un significado biológico (Corbo *et al.*, 2009).

El ajuste se efectuó por regresión no lineal, usando el algoritmo de Marquadt para minimizar la suma residual de cuadrados (Zwietering *et al.*, 1990). Además, los coeficientes de la ecuación modificada de Gompertz se emplearon

para calcular el valor de los parámetros λ (h) y $\mu_{m\acute{a}x}$ ((log ufc/mL)/h), para los microorganismos considerados, en funci3n de la concentraci3n de carvacrol y de la temperatura. Para ello se emplearon las Ecuaciones 1.3 y 1.4 (McMeekin *et al.*, 1993 - seg3n McKellar y Lu, 2003),

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B}\right) + \left(\frac{\log N_0 - A}{\mu_{m\acute{a}x}}\right) \quad (\text{Ecuaci3n 1.3})$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{B \times C}{e} \quad (\text{Ecuaci3n 1.4})$$

donde A , B , C , M y e mantienen el significado que tienen en la Ecuaci3n 1.2, y donde N_0 (ufc/mL) representa la concentraci3n celular de partida.

La bondad de los ajustes se evalu3 mediante el r^2 *corregido* y el *MSE* asociado a cada uno (Ecuaciones I.4 e I.5).

Los ajustes y la validaci3n de resultados se realizaron con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II, versi3n 11 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, EE. UU.).

1.1.3 Resultados y discusi3n

La actividad antibacteriana de distintas concentraciones de carvacrol se evalu3 en medio l3quido (TSB o NB), a temperatura 3ptima de crecimiento (37 3C), a temperatura sub3ptima de crecimiento (30 3C), a temperatura de abuso en caso de rotura de la cadena de fr3o (15 3C) y a temperatura m3xima de refrigeraci3n (8 3C).

En la Tabla 1.2 se muestra la CMI de carvacrol en funci3n del microorganismo y de la temperatura, para un tiempo de incubaci3n m3ximo de 300 h (12,5 d).

Los valores de CMI obtenidos est3n en concordancia con los valores publicados por otros autores para *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Pol y Smid, 1999;

Burt *et al.*, 2005; Veldhuizen *et al.*, 2007; Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2012). La diferencia observada entre unos y otros es inferior a 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para una temperatura de incubación igual o superior a 30 °C, e inferior a 0,11 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para una temperatura de incubación igual o inferior a 20 °C.

De acuerdo con lo dicho, Gutiérrez-Larraínzar *et al.* (2012) observaron que el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en caldo Mueller-Hinton se inhibe en presencia de 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol, a 35 °C, mientras que los resultados obtenidos demuestran que el crecimiento visible de *E. coli* K12 se inhibió en presencia de 0,14 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol, a 37 y 30 °C (Tabla 1.2). Asimismo, Veldhuizen *et al.* (2007) demostraron que el crecimiento visible de *L. monocytogenes* en TSB, a 37 °C, se inhibe en presencia de unos 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol; este valor es muy similar al valor obtenido para *L. innocua*, bajo las mismas condiciones de ensayo (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Concentración mínima inhibitoria de carvacrol ($\mu\text{L}/\text{mL}$) en función del microorganismo y de la temperatura.

| Temperatura (°C) | <i>Escherichia coli</i> K12 | <i>Listeria innocua</i> |
|------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 37 | 0,14 | 0,20 |
| 30 | 0,14 | 0,20 |
| 15 | 0,20 | 0,50 |
| 8 | * | 0,50 |

* A 8 °C no se detectó crecimiento de *E. coli* K12, ni siquiera en ausencia de carvacrol.

La concordancia observada entre los resultados mostrados en la Tabla 1.2 y los obtenidos por otros autores apoyaría el uso de *E. coli* K12 y *L. innocua* para evaluar la actividad antimicrobiana del carvacrol frente a *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, respectivamente, porque su respuesta a la exposición en determinadas condiciones es parecida. Esta similitud es muy importante puesto que en plantas piloto e industrias se realizan pruebas de desafío microbiano con

microorganismos sustitutos de bajo riesgo (Gurtler *et al.*, 2010), tal como recomienda el NACMCF (2010).

Por otro lado, en términos generales se observó que el valor de CMI aumentó al bajar la temperatura (Tabla 1.2). Eso implica que al disminuir la temperatura aumentó la resistencia de los microorganismos al antimicrobiano o que éste perdió efectividad.

La resistencia microbiana aparentemente observada a temperaturas bajas podría estar relacionada con la activación de mecanismos de respuesta a estrés, puesto que ésta sólo ocurre en ambientes realmente hostiles, en los que sólo sobreviven las bacterias más resistentes. Hay que tener en cuenta que los microorganismos que sobreviven o se adaptan a un estrés pueden ganar resistencia a otros factores o condiciones estresantes (Wesche *et al.*, 2009). Cuando las bacterias crecen a temperaturas bajas modifican la composición de sus membranas para incrementar la tolerancia al frío; estos cambios podrían incrementar también la resistencia al carvacrol (Veldhuizen *et al.*, 2007; Rattanachaiakunsopon y Phumkhachorn, 2010). Aunque el mecanismo de acción del carvacrol aún no está del todo claro, parece que este compuesto es capaz de desestabilizar y dañar las envueltas celulares, alterando la fuerza protón-motriz, aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y, por ende, facilitando la pérdida de componentes intracelulares (Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 1999). Para ello el carvacrol debe interactuar con la célula y la interacción podría depender del estado fisiológico de la membrana.

No obstante, también es posible que el carvacrol pierda efectividad a temperaturas bajas. De hecho, la mayoría de reacciones químicas y bioquímicas se ralentizan al disminuir la temperatura. Además, estudios previos demuestran que el potencial antimicrobiano de los compuestos aromáticos disminuye al bajar la temperatura porque disminuye la presión de vapor y la solubilidad de

los mismos (Lanciotti *et al.*, 2004). En cualquier caso, el aumento de la CMI a bajas temperaturas también ha sido observado por otros investigadores (Veldhuizen *et al.*, 2007; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

En vista de los valores de CMI obtenidos (Tabla 1.2), el carvacrol resultó más efectivo frente a *E. coli* K12 que frente a *L. innocua*. En la bibliografía existe cierta controversia acerca de si los aceites esenciales son más efectivos frente a bacterias gram positivas o gram negativas. En vista de los resultados publicados hasta la fecha, algunos parecen más efectivos frente a bacterias gram positivas, mientras que los aceites esenciales de orégano son más efectivos frente a bacterias gram negativas, en principio, porque contienen compuestos capaces de dañar la membrana externa que las envuelve (Burt, 2004); esto explicaría los resultados obtenidos.

A dosis por debajo de la CMI se obtuvieron curvas de crecimiento sigmoides (Figuras 1.1 y 1.2), excepto para *E. coli* K12, a 8 °C. Tras 300 h (12,5 d) de incubación a esa temperatura, no se detectó crecimiento de *E. coli* K12, ni siquiera en ausencia de carvacrol. Valero *et al.* (2010) describieron “8 °C” como una temperatura inhibitoria del crecimiento de *E. coli* O157:H7. Por tanto, la combinación “*E. coli* K12 - 8 °C” se descartó para el subsiguiente estudio del efecto antimicrobiano del carvacrol sobre el crecimiento de *E. coli* K12 a distintas temperaturas.

De acuerdo con lo dicho en el subapartado *Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos* del apartado 1.1.2, las curvas de crecimiento obtenidas se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz, con un r^2 corregido mínimo de 0,9913 y un *MSE* máximo de 0,0143.

En las Tablas 1.3-1.6 se muestran los valores de λ y $\mu_{m\acute{a}x}$ obtenidos para los microorganismos estudiados, en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol.

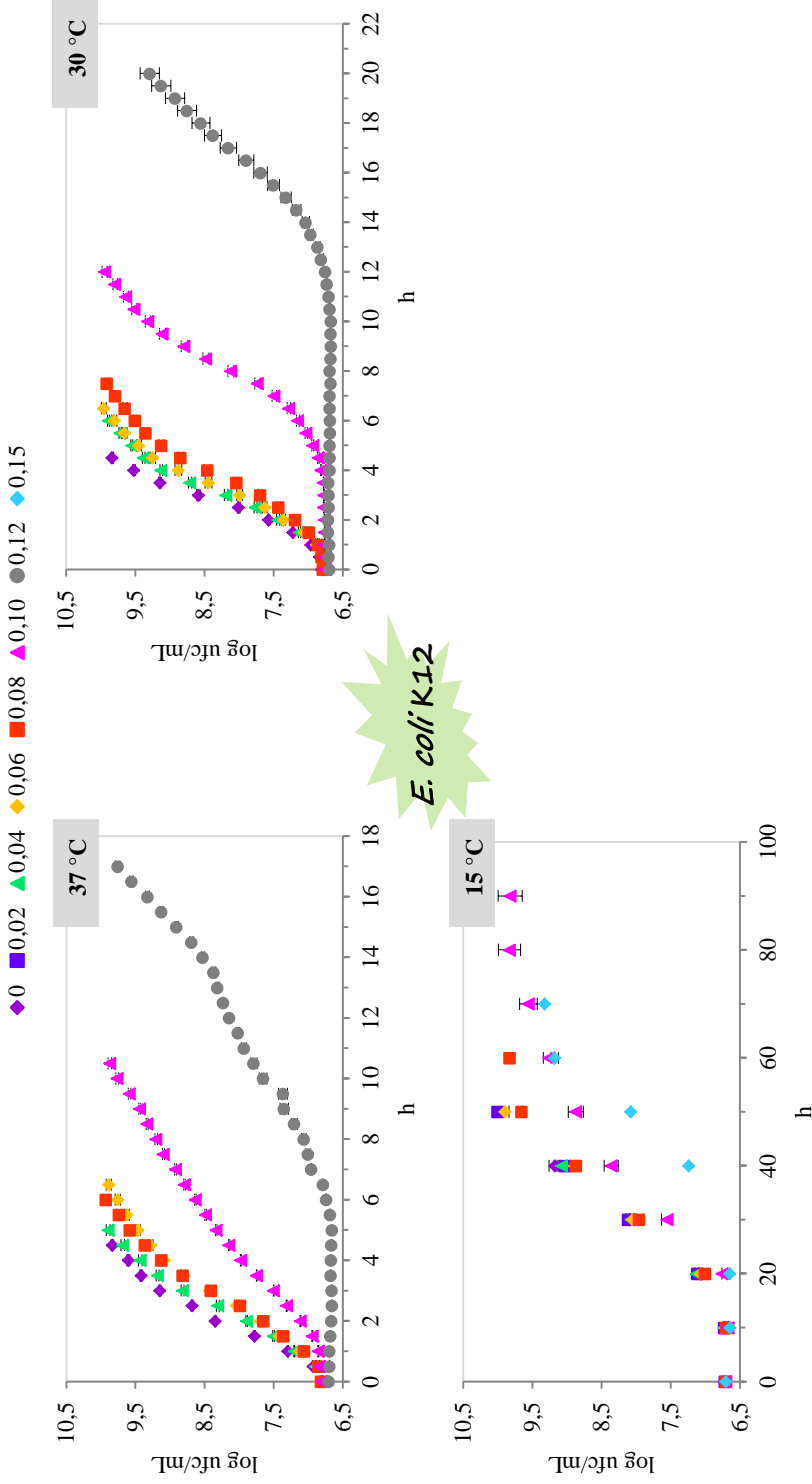


Figura 1.1 Curvas de crecimiento para *Escherichia coli* K12 a distintas temperaturas, en función de la concentración de carvacrol (0-0,15 µL/mL). Las barras de error representan el coeficiente de variación asociado a cada promedio.

Tabla 1.3 Duración del tiempo de latencia (h) para *Escherichia coli* K12 en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol.

| Carvacrol ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 37 °C | 30 °C | 15 °C |
|---------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 0 | 0,47 \pm 0,09 | 1,31 \pm 0,11 | 17,63 \pm 4,49 |
| 0,02 | – | – | 17,70 \pm 1,39 |
| 0,04 | 0,67 \pm 0,07 | 1,33 \pm 0,16 | 18,73 \pm 0,40 |
| 0,06 | 0,81 \pm 0,15 | 1,49 \pm 0,26 | 19,24 \pm 0,97 |
| 0,08 | 0,82 \pm 0,11 | 1,79 \pm 0,32 | 20,68 \pm 3,01 |
| 0,10 | 1,34 \pm 0,02 | 5,93 \pm 0,46 | 24,00 \pm 0,13 |
| 0,12 | 7,95 \pm 1,62 | 14,74 \pm 2,39 | – |
| 0,14 | CMI | CMI | – |
| 0,15 | | | 35,82 \pm 7,12 |
| 0,20 | | | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

Tabla 1.4 Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para *Escherichia coli* K12 en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol.

| Carvacrol ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 37 °C | 30 °C | 15 °C |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 0,954 \pm 0,065 | 1,058 \pm 0,091 | 0,138 \pm 0,024 |
| 0,02 | – | – | 0,131 \pm 0,018 |
| 0,04 | 0,861 \pm 0,103 | 0,911 \pm 0,078 | 0,124 \pm 0,024 |
| 0,06 | 0,762 \pm 0,115 | 0,844 \pm 0,079 | 0,120 \pm 0,024 |
| 0,08 | 0,739 \pm 0,125 | 0,760 \pm 0,086 | 0,113 \pm 0,016 |
| 0,10 | 0,416 \pm 0,021 | 0,619 \pm 0,100 | 0,101 \pm 0,003 |
| 0,12 | 0,467 \pm 0,021 | 0,522 \pm 0,120 | – |
| 0,14 | CMI | CMI | – |
| 0,15 | | | 0,086 \pm 0,004 |
| 0,20 | | | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

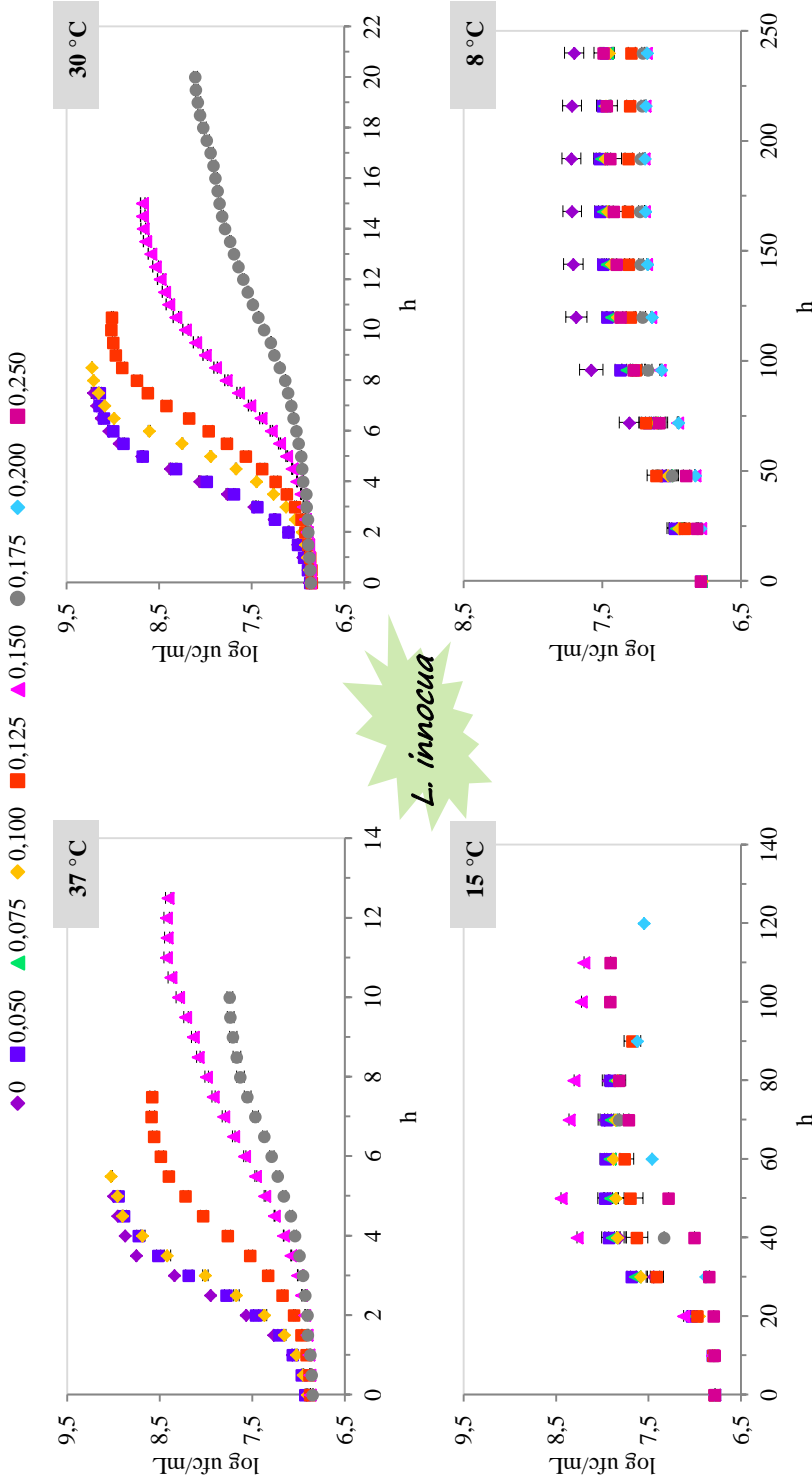


Figura 1.2 Curvas de crecimiento para *Listeria innocua* a distintas temperaturas, en función de la concentración de carvacrol (0-0,250 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Las barras de error representan el coeficiente de variación asociado a cada promedio.

Tabla 1.5 Duración del tiempo de latencia (h) para *Listeria innocua* en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol.

| Carvacrol (μL/mL) | 37 °C | 30 °C | 15 °C | 8 °C |
|-------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 0 | 1,22 ± 0,21 | 2,05 ± 0,21 | 15,31 ± 1,46 | 44,26 ± 1,86 |
| 0,050 | 1,33 ± 0,20 | 2,11 ± 0,23 | 15,85 ± 1,42 | 44,26 ± 5,67 |
| 0,075 | – | – | 16,33 ± 1,94 | 44,03 ± 1,17 |
| 0,100 | 1,86 ± 0,24 | 3,18 ± 0,32 | 17,09 ± 2,17 | 46,39 ± 1,80 |
| 0,125 | 2,22 ± 0,38 | 3,48 ± 0,51 | 17,31 ± 1,62 | 43,63 ± 1,12 |
| 0,150 | 2,95 ± 0,30 | 4,23 ± 0,29 | 19,42 ± 2,96 | 43,69 ± 2,23 |
| 0,175 | 2,98 ± 0,15 | 5,39 ± 0,53 | 20,94 ± 3,16 | 45,98 ± 1,24 |
| 0,200 | CMI | CMI | 30,09 ± 1,30 | 43,92 ± 2,23 |
| 0,250 | | | 33,78 ± 2,81 | 42,95 ± 4,56 |
| 0,500 | | | CMI | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

Tabla 1.6 Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para *Listeria innocua* en función de la temperatura y de la concentración de carvacrol.

| Carvacrol (μL/mL) | 37 °C | 30 °C | 15 °C | 8 °C |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0 | 0,879 ± 0,056 | 0,635 ± 0,012 | 0,077 ± 0,005 | 0,020 ± 0,001 |
| 0,050 | 0,781 ± 0,069 | 0,635 ± 0,056 | 0,068 ± 0,004 | 0,017 ± 0,002 |
| 0,075 | – | – | 0,068 ± 0,004 | 0,016 ± 0,002 |
| 0,100 | 0,727 ± 0,021 | 0,621 ± 0,038 | 0,064 ± 0,002 | 0,013 ± 0,002 |
| 0,125 | 0,541 ± 0,087 | 0,448 ± 0,079 | 0,054 ± 0,009 | 0,007 ± 0,001 |
| 0,150 | 0,241 ± 0,041 | 0,242 ± 0,044 | 0,044 ± 0,003 | 0,006 ± 0,000 |
| 0,175 | 0,161 ± 0,071 | 0,111 ± 0,018 | 0,042 ± 0,008 | 0,006 ± 0,001 |
| 0,200 | CMI | CMI | 0,025 ± 0,001 | 0,006 ± 0,000 |
| 0,250 | | | 0,006 ± 0,001 | 0,006 ± 0,000 |
| 0,500 | | | CMI | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

Efecto de la temperatura y de la concentración de carvacrol sobre el crecimiento de Escherichia coli K12

En general, con independencia de la concentración de carvacrol, un descenso de la temperatura produjo un aumento de λ y un descenso de $\mu_{m\acute{a}x}$ (Tablas 1.3 y 1.4). A 37 °C, en ausencia de carvacrol, tras un periodo de adaptación que duró unos 30 min ($0,47 \pm 0,09$ h), *E. coli* K12 creció a razón de $0,954 \pm 0,065$ (log ufc/mL)/h. A 15 °C se obtuvo un valor de λ casi 40 veces mayor ($17,63 \pm 4,49$ h) y un valor $\mu_{m\acute{a}x}$ casi 7 veces menor ($0,138 \pm 0,024$ (log ufc/mL)/h). El incremento de λ que se asoció al descenso de temperatura fue notable en todo el intervalo de temperaturas ensayado (37-15 °C). Sin embargo, el descenso de $\mu_{m\acute{a}x}$ sólo se apreció a 15 °C, puesto que el valor obtenido a 30 °C fue muy similar al obtenido a 37 °C. En consecuencia, $\mu_{m\acute{a}x}$ resultó menos dependiente de la temperatura que λ ; según los resultados, para una misma concentración de carvacrol, disminuir la temperatura incrementó el tiempo requerido por *E. coli* K12 para adaptarse al entorno, pero luego el crecimiento ocurrió siempre como en condiciones óptimas (37 °C), a menos que la temperatura fuera igual o inferior a 15 °C.

Por otro lado, con independencia de la temperatura, aumentar la concentración de carvacrol produjo un aumento de λ y un descenso de $\mu_{m\acute{a}x}$ (Tablas 1.3 y 1.4). A 15 °C, en presencia de carvacrol (0,15 μ L/mL) se obtuvo un valor de λ máximo de $35,82 \pm 7,12$ h. Además, se observó que la presencia de carvacrol redujo $\mu_{m\acute{a}x}$ hasta valores mínimos, muy cercanos a 0 ($0,086 \pm 0,004$ (log ufc/mL)/h). Estos resultados demuestran que la adición de carvacrol en dosis por debajo de la CMI podría llegar a controlar el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en productos refrigerados, si se produce una rotura en la cadena de frío o si la refrigeración es deficiente.

Controlar y mantener la temperatura a la que se mantienen los alimentos desde el momento de producción hasta el momento de consumo es un desafío, puesto

que existen muchos puntos en los que pueden producirse fallos o deficiencias (Laguerre *et al.*, 2013).

En la bibliografía, diversas encuestas han demostrado que un alto porcentaje de refrigeradores comerciales y domésticos operan a temperaturas por encima de la recomendada (4 °C) (Garrido *et al.*, 2010). En muchos casos, la temperatura de almacenamiento es igual o superior a 9 °C (Sergelidis *et al.*, 1997; Laguerre *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2007), bien por desconocimiento o bien porque se excede la capacidad frigorífica del equipo (Sergelidis *et al.*, 1997). En cualquier caso, de ahí la importancia del uso de conservantes capaces de inhibir o ralentizar el crecimiento microbiano durante el almacenamiento, sin olvidar la importancia de las BPH y las BPM.

Efecto de la temperatura y de la concentración de carvacrol sobre el crecimiento de Listeria innocua

Independientemente de la concentración de carvacrol, a menor temperatura, mayor valor de λ y menor valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ (Tabla 1.4). El valor de λ obtenido a 37 °C, en ausencia de carvacrol, fue $1,22 \pm 0,21$ h. Eso significa que, bajo condiciones de crecimiento óptimas, *L. innocua* necesitó alrededor de 1 h y 15 min para adaptarse al entorno. Reducir la temperatura en sólo 7 °C multiplicó este valor por 1,68 ($1,22 \pm 0,21$ frente a $2,05 \pm 0,21$ h). Además, la incubación a temperaturas más bajas hizo que la fase de latencia fuera aún más larga; los valores de λ obtenidos a 15 y 8 °C fueron unas 15 y 44 veces mayores que el obtenido a 37 °C, respectivamente ($15,31 \pm 1,46$ y $44,26 \pm 1,86$ frente a $1,22 \pm 0,21$ h). Una vez lograda la adaptación al ambiente, el valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ alcanzado a 30, 15 y 8 °C fue casi 1,4; 11,5 y 44 veces más pequeño que el valor alcanzado a 37 °C.

A diferencia de *E. coli* K12, *L. innocua* fue capaz de crecer a temperatura de refrigeración porque es una bacteria psicrótrófa, como *L. monocytogenes*. En

estos casos, el uso de carvacrol como medida adicional para el control del crecimiento podría ser interesante aunque no se produzcan fallos en la cadena de frío. A 8 °C, la $\mu_{m\acute{a}x}$ de *L. innocua* disminuyó a medida que la concentración de carvacrol aumentó, alcanzándose un valor mínimo en presencia de 0,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carvacrol. Bajo esas condiciones, el valor de este parámetro fue 3 veces menor que el alcanzado por el microorganismo en ausencia de carvacrol ($0,006 \pm 0,000$ frente a $0,020 \pm 0,001$ (log ufc/mL)/h). Por otro lado, a 15 °C una mayor concentración de carvacrol se asoció a un valor de λ mayor y a un valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ menor. Por consiguiente, el uso de dosis no inhibitorias de carvacrol podría ser una medida efectiva para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* si se produce un fallo en la cadena de frío o si los alimentos no se mantienen a la temperatura recomendada.

1.1.4 Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que la adición de carvacrol podría inhibir el crecimiento visible de *E. coli* K12 y *L. innocua* en alimentos almacenados a 15 °C, siempre que se utilicen concentraciones superiores a 0,20 y 0,50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. A esa temperatura (15 °C), dosis más bajas (de 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *E. coli* K12 y de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *L. innocua*) doblaron el tiempo requerido por ambos microorganismos para empezar a crecer y disminuyeron la tasa máxima de multiplicación.

En consecuencia, el carvacrol administrado en concentraciones por debajo de la CMI podría ser una buena alternativa como medida extra de control del crecimiento, ayudando a la conservación de los alimentos en caso de que se produzca una rotura en la cadena de frío o de que se mantengan en refrigeración a temperaturas por encima de la establecida como adecuada. Adicionalmente, a concentraciones por debajo de la CMI los alimentos podrían ser sensorialmente aceptables, aunque para confirmarlo serían necesarios estudios adicionales en alimentos.

1.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del citral

1.2.1 Introducción

De acuerdo con el apartado 1.1.1, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se atribuye sobre todo a compuestos fenólicos. No obstante, su potencial antibacteriano y antifúngico también se ha asociado a aldehídos, cetonas, alcoholes, éteres e hidrocarburos (Cosentino *et al.*, 1999; Kalemba y Kunicka, 2003). Dentro este conjunto se incluye el citral, cuya presencia se ha detectado (i) en los aceites esenciales de mirto limón (*Backhousia citriodora* F.Muell.), con un contenido mínimo del 80 % y un contenido máximo del 98 % (Hayes y Markovic, 2002; Wilkinson *et al.*, 2003); (ii) en los aceites esenciales de hierba de limón (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), suponiendo entre un 65 y un 85 % de aquellos que se obtienen a partir de las hojas (Saddiq y Khayyat, 2010), y (iii) en los aceites esenciales de cítricos tales como el naranjo (*Citrus ×sinensis* (L.) Osbeck), el mandarino (*Citrus reticulata* Blanco) o el limonero (*Citrus ×limon* (L.) Burm.f.), en los que no supone más de un 32 %, en el mejor de los casos (Blanco *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, muchos trabajos han demostrado que el citral tiene actividad antimicrobiana, y que es efectivo frente a hongos y bacterias de todo tipo (Onawunmi, 1989; Kim *et al.*, 1995; Hayes y Markovic, 2002; Wilkinson *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2008; Somolinos *et al.*, 2009; Saddiq y Khayyat, 2010).

Al igual que el carvacrol, el citral es un compuesto volátil de naturaleza lipófila, capaz de alterar la organización e integridad de las envueltas celulares (Garcia *et al.*, 2008; Somolinos *et al.*, 2009), aunque su acción parece implicar además la granulación del citoplasma y la inactivación o la no síntesis de enzimas intracelulares y extracelulares (Garcia *et al.*, 2008).

Por otro lado, al igual que el carvacrol, el citral también es un aromatizante-saborizante alimentario GRAS (Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012).

A diferencia del carvacrol, sin embargo, el citral es una mezcla de dos aldehídos monoterpénicos acíclicos isómeros (Saddiq y Khayyat, 2010), α - β insaturados, que reciben el nombre de: (i) neral, *trans*-citral, citral A, (Z)-citral o isómero Z, y (ii) geranial, *cis*-citral, citral B, (E)-citral o isómero E (Figura 1.3).

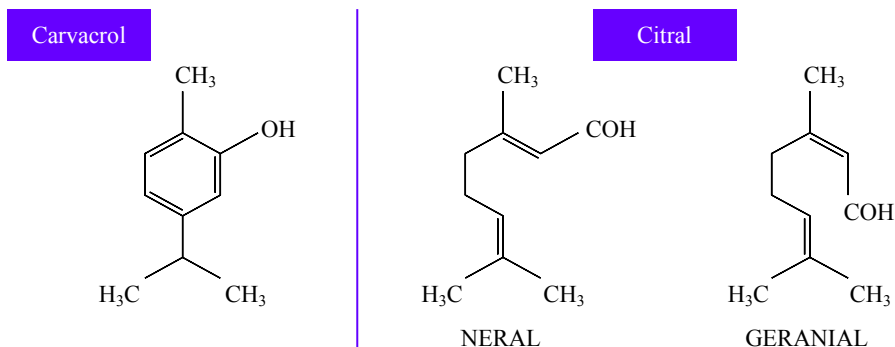


Figura 1.3 Comparación de la estructura química del carvacrol y de los isómeros que componen el citral.

Considerando que la actividad antimicrobiana del citral prácticamente no se ha evaluado a concentraciones por debajo de la CMI desde un punto de vista cinético (en base al valor de parámetros como λ y $\mu_{máx}$), se cuantificó y modelizó el efecto de la concentración de citral sobre el crecimiento de *E. coli* K12 y *L. innocua*, en medio de referencia, a distintas temperaturas (37, 30, 15 y 8 °C), teniendo en cuenta, además, la importancia de los estudios cinéticos para planificar un sistema de APPCC en base a datos objetivos como los que pueden obtenerse mediante una evaluación de riesgos a nivel industrial.

1.2.2 Material y métodos

Microorganismos

Para evaluar el efecto antimicrobiano del citral se utilizaron viales conteniendo *E. coli* K12 CECT 433 ($6,81 \times 10^9 \pm 1,21 \times 10^9$ ufc/mL) y viales conteniendo

L. innocua CECT 910 ($4,02 \times 10^9 \pm 5,49 \times 10^8$ ufc/mL); en concreto, se utilizaron viales de los conjuntos obtenidos para cuantificar la actividad antimicrobiana del carvacrol (subapartado *Microorganismos* del apartado 1.1.2).

Procedimiento experimental

Para determinar el potencial antimicrobiano de distintas concentraciones de citral (0,1-3,0 $\mu\text{L/mL}$; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), diluido en DMSO, frente a *E. coli* K12 y *L. innocua*, a distintas temperaturas (37, 30, 15 y 8 °C), se empleó el protocolo descrito para evaluar el potencial antimicrobiano del carvacrol (subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 1.1.2). Las concentraciones ensayadas en este caso se muestran en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7 Concentraciones ensayadas para el citral en función del microorganismo y de la temperatura.

| Microorganismo | °C | Concentraciones ensayadas ($\mu\text{L/mL}$) |
|-----------------------------|----|--|
| <i>Escherichia coli</i> K12 | 37 | 0,100; 0,200; 0,250; 0,275; 0,300; 0,325; 0,350 |
| | 30 | 0,100; 0,200; 0,250; 0,275; 0,300; 0,325; 0,350 |
| | 15 | 0,100; 0,200; 0,300; 0,500; 0,750; 1,000; 1,500; 3,000 |
| | 8 | 0,100; 0,200; 0,300; 0,500; 0,750; 1,000; 1,500; 3,000 |
| <i>Listeria innocua</i> | 37 | 0,100; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250; 0,300 |
| | 30 | 0,100; 0,150; 0,175; 0,200; 0,250; 0,300 |
| | 15 | 0,100; 0,150; 0,200; 0,250; 0,300; 0,500; 1,000 |
| | 8 | 0,100; 0,150; 0,200; 0,300; 0,500; 1,000; 1,500 |

Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos

De acuerdo con lo dicho en el subapartado *Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos* del apartado 1.1.2, el registro de densidad óptica se transformó en recuentos (log ufc/mL) mediante curvas de calibración validadas mediante los estadísticos r y A_f (Ecuaciones 1.1 e I.7).

Una vez hecha la transformación, los recuentos obtenidos se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 1.2) y se calculó el valor de los parámetros λ (h) y $\mu_{m\acute{a}x}$ (log ufc/mL), en función de las condiciones de ensayo, según las Ecuaciones 1.3 y 1.4. La bondad de los ajustes se evaluó mediante el r^2 corregido y el MSE asociado a cada uno (Ecuaciones I.4 e I.5).

1.2.3 Resultados y discusión

Tras determinarse la CMI de citral para los microorganismos estudiados, a las temperaturas de ensayo (37-8 °C), se cuantificó la actividad antibacteriana de concentraciones inferiores a la CMI sobre el crecimiento de *E. coli* K12 y *L. innocua* a distintas temperaturas.

De acuerdo con los valores de CMI obtenidos (Tabla 1.8), el citral resultó más efectivo frente a *E. coli* K12 que frente a *L. innocua*, a 15 y 8 °C, detectándose menor efectividad a menor temperatura, al igual que en el caso del carvacrol, bien porque aumentó la resistencia de ambos microorganismos o bien porque la efectividad del compuesto disminuyó a medida que disminuyó la temperatura (apartado 1.1.3).

Tabla 1.8 Concentración mínima inhibitoria de citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) en función del microorganismo y de la temperatura.

| Temperatura (°C) | <i>Escherichia coli</i> K12 | <i>Listeria innocua</i> |
|------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 37 | 0,325 | 0,300 |
| 30 | 0,325 | 0,300 |
| 15 | 0,300 | 0,500 |
| 8 | * | 1 |

* A 8 °C no se detectó crecimiento de *E. coli* K12, ni siquiera en ausencia de citral.

En cualquier caso, los valores de CMI obtenidos concuerdan con los obtenidos por Kim *et al.* (1995) para *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, en medio de

referencia. En consecuencia, *E. coli* K12 y *L. innocua* podrían ser también sustitutos no patógenos de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* para validar la efectividad del citral y efectuar pruebas de desafío microbiano en la industria usando microorganismos de bajo riesgo, de acuerdo con lo dicho en el apartado 1.1.3.

Además, el valor obtenido para *E. coli* K12 a 37 °C concuerda con el obtenido por Hayes y Markovic (2002), a misma esa temperatura, para una cepa de *E. coli* perteneciente al serogrupo O103. En este grupo, de alta prevalencia a nivel mundial, se incluyen serotipos patógenos productores de toxina tipo Shiga no O157, de transmisión alimentaria, para los que se están desarrollando sistemas rápidos y precisos de identificación en alimentos (Blais *et al.*, 2014; Mussio *et al.*, 2014). De acuerdo con esta observación, por tanto, *E. coli* K12 podría ser sustituto no patógeno válido para varios serotipos patógenos de la especie *E. coli*.

Por otro lado, a dosis por debajo de la CMI se obtuvieron curvas de crecimiento sigmoides (Figuras 1.4 y 1.5), excepto para *E. coli* K12, a 8 °C, temperatura a la que no se detectó crecimiento durante un periodo de máximo de 300 h (12,5 d). En consecuencia, de acuerdo con lo dicho en el apartado 1.1.3, la combinación “*E. coli* K12 - 8 °C” se descartó para el subsiguiente estudio del efecto antimicrobiano del citral sobre el crecimiento de *E. coli* K12 a distintas temperaturas.

Como en el caso del carvacrol, las curvas obtenidas a dosis sub-CMI de citral se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz, con un r^2 corregido mínimo de 0,9729 y un *MSE* máximo de 0,0345.

En las Tablas 1.9-1.12 se muestran los valores de λ y μ_{\max} obtenidos para los microorganismos considerados en función de la temperatura y de la concentración de citral.

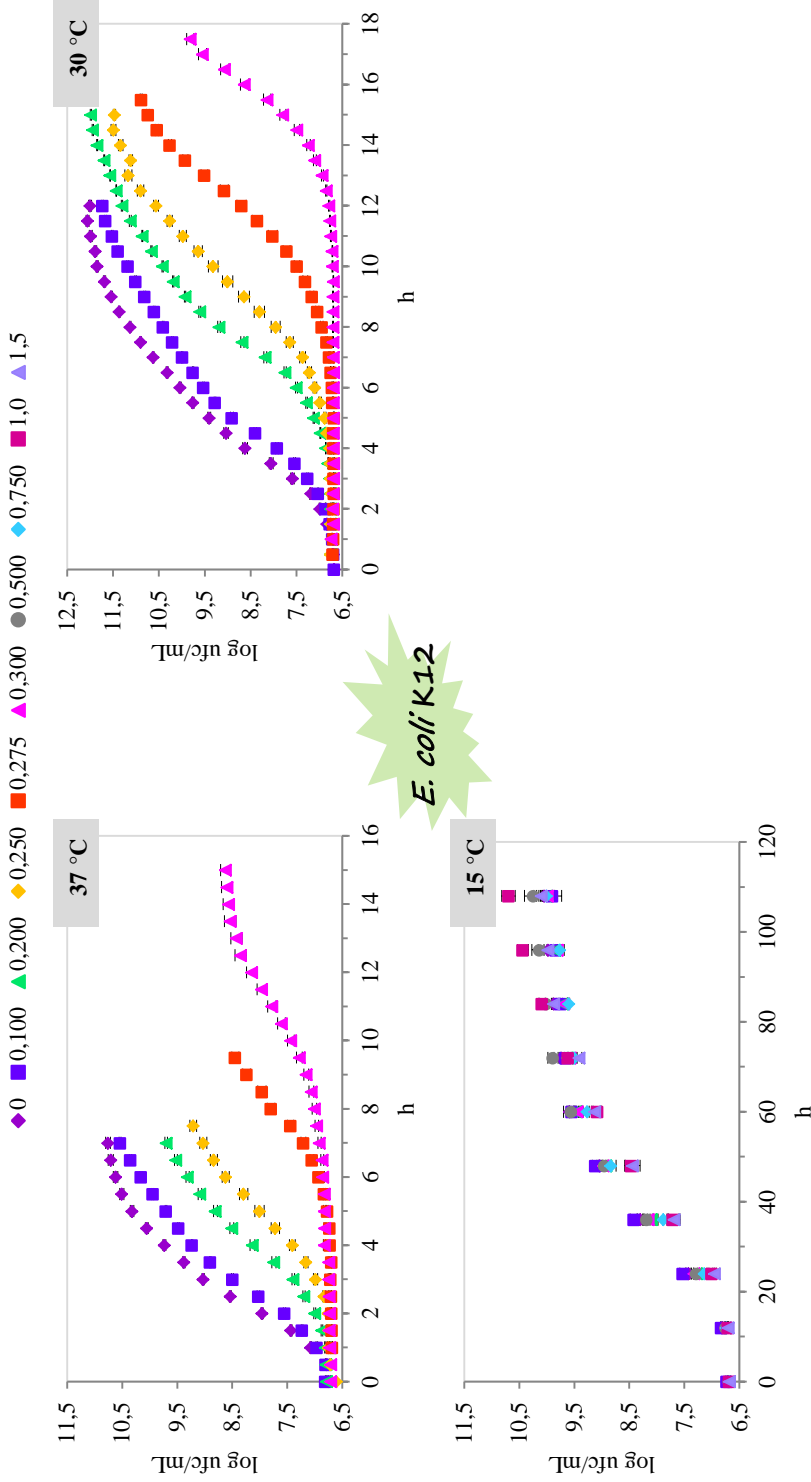


Figura 1.4 Curvas de crecimiento para *Escherichia coli* K12 a distintas temperaturas, en función de la concentración de citral (0-1,5 μL/mL). Las barras de error representan el coeficiente de variación asociado a cada promedio.

Tabla 1.9 Duración del tiempo de latencia (h) para *Escherichia coli* K12 en función de la temperatura y de la concentración de citral.

| Citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 37 °C | 30 °C | 15 °C |
|------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 0 | 0,88 \pm 0,18 | 2,15 \pm 0,36 | 18,57 \pm 0,52 |
| 0,100 | 1,21 \pm 0,17 | 2,51 \pm 0,29 | 18,86 \pm 2,10 |
| 0,200 | 2,23 \pm 0,33 | 5,21 \pm 0,33 | 20,44 \pm 2,56 |
| 0,250 | 3,07 \pm 0,61 | 6,75 \pm 1,44 | – |
| 0,275 | 6,22 \pm 1,32 | 9,40 \pm 1,28 | – |
| 0,300 | – | 13,76 \pm 0,60 | 21,70 \pm 3,54 |
| 0,325 | CMI | CMI | – |
| 0,500 | | | 24,03 \pm 0,07 |
| 0,750 | | | 31,16 \pm 2,82 |
| 1,0 | | | 40,08 \pm 1,10 |
| 1,5 | | | 49,52 \pm 3,31 |
| 3,0 | | | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

Tabla 1.10 Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para *Escherichia coli* K12 en función de la temperatura y de la concentración de citral.

| Citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 37 °C | 30 °C | 15 °C |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 1,070 \pm 0,028 | 1,018 \pm 0,049 | 0,105 \pm 0,004 |
| 0,100 | 0,916 \pm 0,062 | 0,873 \pm 0,018 | 0,099 \pm 0,010 |
| 0,200 | 0,736 \pm 0,088 | 0,851 \pm 0,024 | 0,099 \pm 0,013 |
| 0,250 | 0,649 \pm 0,134 | 0,822 \pm 0,043 | – |
| 0,275 | 0,727 \pm 0,095 | 0,804 \pm 0,026 | – |
| 0,300 | – | 0,787 \pm 0,059 | 0,091 \pm 0,016 |
| 0,325 | CMI | CMI | – |
| 0,500 | | | 0,095 \pm 0,002 |
| 0,750 | | | 0,103 \pm 0,006 |
| 1,0 | | | 0,099 \pm 0,009 |
| 1,5 | | | 0,108 \pm 0,001 |
| 3,0 | | | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

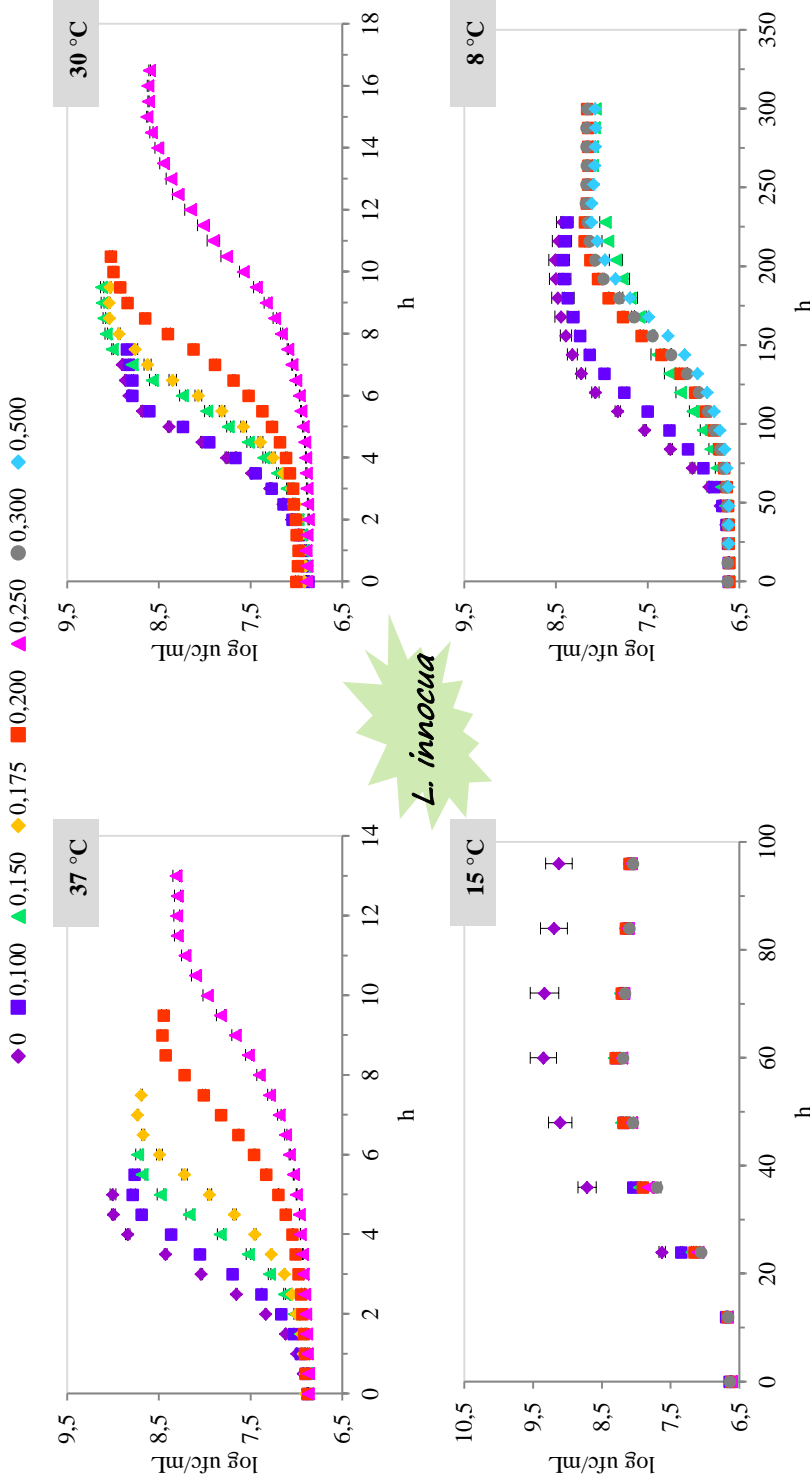


Figura 1.5 Curvas de crecimiento para *Listeria innocua* a distintas temperaturas, en función de la concentración de citral (0-0,500 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Las barras de error representan el coeficiente de variación asociado a cada promedio.

Tabla 1.11 Duración del tiempo de latencia (h) para *Listeria innocua* en función de la temperatura y de la concentración de citral.

| Citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 37 °C | 30 °C | 15 °C | 8 °C |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|
| 0 | 1,54 \pm 0,08 | 2,46 \pm 0,16 | 14,71 \pm 2,10 | 46,99 \pm 7,47 |
| 0,100 | 1,77 \pm 0,12 | 2,54 \pm 0,10 | 15,89 \pm 1,96 | 67,24 \pm 11,61 |
| 0,150 | 2,43 \pm 0,14 | 3,39 \pm 0,36 | 17,05 \pm 0,53 | 80,44 \pm 3,54 |
| 0,175 | 3,03 \pm 0,20 | 3,72 \pm 0,53 | – | – |
| 0,200 | 4,33 \pm 0,14 | 4,81 \pm 0,58 | 18,17 \pm 0,57 | 92,21 \pm 15,46 |
| 0,250 | 6,53 \pm 1,33 | 8,71 \pm 1,32 | 18,92 \pm 2,81 | – |
| 0,300 | CMI | CMI | 18,94 \pm 1,81 | 99,47 \pm 8,48 |
| 0,500 | | | CMI | 111,87 \pm 4,93 |
| 1,0 | | | | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

Tabla 1.12 Velocidad de crecimiento ((log ufc/mL)/h) para *Listeria innocua* en función de la temperatura y de la concentración de citral.

| Citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 37 °C | 30 °C | 15 °C | 8 °C |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 0,821 \pm 0,093 | 0,611 \pm 0,015 | 0,078 \pm 0,015 | 0,024 \pm 0,004 |
| 0,100 | 0,692 \pm 0,097 | 0,607 \pm 0,045 | 0,078 \pm 0,015 | 0,022 \pm 0,004 |
| 0,150 | 0,645 \pm 0,138 | 0,555 \pm 0,042 | 0,079 \pm 0,015 | 0,020 \pm 0,004 |
| 0,175 | 0,527 \pm 0,070 | 0,531 \pm 0,047 | – | – |
| 0,200 | 0,359 \pm 0,049 | 0,443 \pm 0,015 | 0,058 \pm 0,006 | 0,019 \pm 0,002 |
| 0,250 | 0,302 \pm 0,034 | 0,416 \pm 0,052 | 0,052 \pm 0,003 | – |
| 0,300 | CMI | CMI | 0,046 \pm 0,005 | 0,020 \pm 0,000 |
| 0,500 | | | CMI | 0,018 \pm 0,001 |
| 1,5 | | | | CMI |

CMI: concentración mínima inhibitoria; –: combinación no ensayada.

Efecto de la temperatura y de la concentración de citral sobre el crecimiento de Escherichia coli K12

En términos generales, al disminuir la temperatura aumentó λ y disminuyó $\mu_{m\acute{a}x}$, con independencia de la concentración de citral (Tablas 1.9 y 1.10). A 37 °C, en ausencia de citral, *E. coli* K12 creció a razón de $1,070 \pm 0,028$ (log ufc/mL)/h, tras menos de 1 h de latencia ($0,89 \pm 0,18$ h). A 15 °C, en cambio, se obtuvo un valor λ casi 21 veces mayor ($18,57 \pm 0,52$ h) y un valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ algo más de 10 veces menor ($0,105 \pm 0,004$ (log ufc/mL)/h). De acuerdo con lo dicho en el subapartado *Efecto de la temperatura y de la concentración de carvacrol sobre el crecimiento de Escherichia coli K12* del apartado 1.1.3, el incremento de λ que se asoció al descenso de temperatura fue notable en todo el intervalo ensayado (37-15 °C), mientras que el descenso de $\mu_{m\acute{a}x}$ sólo se apreció a 15 °C. Por tanto, para una misma concentración de citral, disminuir la temperatura incrementó el tiempo para adaptarse al entorno pero, tras ello, *E. coli* K12 creció siempre como si lo hiciera en condiciones óptimas (37 °C), salvo que la temperatura de incubación fuera igual o inferior a 15 °C.

Con independencia de la temperatura, al aumentar la concentración de citral se observó un incremento de λ . A 37 °C, la adición de 0,275 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de citral supuso que λ se multiplicara por 7,07. A 15 °C, en presencia de citral (1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), λ alcanzó un valor máximo de $49,52 \pm 3,31$ h. Por tanto, si se rompiera la cadena de frío la adición citral podría suponer que el crecimiento de *E. coli* O157:H7 (y posiblemente el de otros serotipos patógenos pertenecientes al serogrupo O103, de acuerdo con lo dicho en el apartado 1.2.3), empezara tras 2 d en lugar de tras 18 h de almacenamiento en esas condiciones (15 °C). De este modo, la adición de citral podría ser una medida adicional para el control del crecimiento de serotipos patógenos de *E. coli*, suponiendo un tiempo extra de latencia en caso de rotura de la cadena de frío. Este tiempo es crucial porque

podría suponer que ciertas poblaciones no rebasaran niveles seguros y, en cualquier caso, que se retrase la etapa de crecimiento activo.

Efecto de la temperatura y de la concentración de citral sobre el crecimiento de Listeria innocua

De acuerdo con los resultados obtenidos para *L. innocua* (Tablas 1.9 y 1.10) se observó que una disminución de la temperatura generalmente produjo un aumento de λ y una reducción de $\mu_{m\acute{a}x}$, de acuerdo con lo dicho en el subapartado *Efecto de la temperatura y de la concentración de carvacrol sobre el crecimiento de Listeria innocua* del apartado 1.1.3. El valor de λ obtenido a 37 °C en ausencia de citral fue $1,54 \pm 0,08$ h. Eso implica que, bajo condiciones óptimas, *L. innocua* necesitó 1 h y 30 min para adaptarse al ambiente e iniciar el crecimiento exponencial. La incubación a 30, 15 y 8 °C multiplicó este valor por 1,60; 9,55 y 30,51, respectivamente ($1,54 \pm 0,08$ frente a $2,46 \pm 0,16$; $14,71 \pm 2,10$ y $46,99 \pm 7,47$ h). Además, la $\mu_{m\acute{a}x}$ alcanzada a 30, 15 y 8 °C fue aproximadamente 1,3; 10,5 y 34 veces menor, respectivamente, que la $\mu_{m\acute{a}x}$ alcanzada a 37 °C ($0,611 \pm 0,015$; $0,078 \pm 0,015$ y $0,024 \pm 0,004$ frente a $0,821 \pm 0,093$ (log ufc/mL)/h).

Por otro lado, a 8 °C se observó que λ aumentó al aumentar la concentración de citral, alcanzándose un valor máximo de $111,87 \pm 4,93$ h en presencia de 0,500 $\mu\text{L/mL}$ de citral. Este valor es 2,38 veces mayor que el valor obtenido a esa misma temperatura, en ausencia de antimicrobiano ($46,99 \pm 7,47$ h). A temperaturas más altas (37, 30 y 15 °C), un incremento en la concentración de citral supuso no sólo un incremento de λ , sino también un descenso de $\mu_{m\acute{a}x}$. De este modo, la aplicación de dosis no inhibitorias de citral podría ser una opción eficaz para controlar temporalmente el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos mínimamente procesados, si se produce un fallo en la cadena de frío o si los alimentos no se almacenan de forma correcta, con la ventaja de que estas

concentraciones transfieran menos olor y sabor al alimento que la CMI, y por lo tanto, con la ventaja de que sean más fácilmente asimilables por el consumidor.

1.2.4 Conclusión

De acuerdo con los resultados obtenidos, en presencia de 0,3 y 0,5 $\mu\text{L/mL}$ de citral puede inhibirse el crecimiento visible de *E. coli* K12 y *L. innocua* en alimentos mantenidos a 15 °C (temperatura que puede darse si se produce un fallo en la cadena de frío o si los alimentos se almacenan de forma inadecuada). En esas condiciones (15 °C), dosis más bajas de citral podrían modificar la pauta de crecimiento bacteriano, (i) incrementando el tiempo de latencia (como se observó tanto para *E. coli* K12 como para *L. innocua*), y (ii) reduciendo la tasa de crecimiento máxima (como se observó para *L. innocua*, sobre todo a temperaturas bajas).

Aunque se necesitan más estudios para evaluar el efecto del citral sobre el crecimiento bacteriano en alimentos y su impacto sobre aspectos relacionados con la calidad sensorial de éstos, los resultados obtenidos apuntan a que podría llegar a emplearse como medida adicional de control del crecimiento en concentraciones sub-CMI, más adecuadas para la obtención de productos mínimamente procesados, microbiológicamente seguros y sensorialmente aceptables.

2

Cuantificación del efecto antimicrobiano de alimentos de origen vegetal en medio de referencia

2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana del asaí

2.1.1 Introducción

La palmera de asaí, palma murraco, palma manaca o palma de la col (Figura 2.1), es una especie vegetal monoica, de hojas pinnadas, que abunda en las regiones tropicales del norte de Sudamérica; más concretamente, en Brasil, Guayana Francesa, Trinidad y Tobago, Surinam, Venezuela, Colombia y Perú. En esos países, el asaí es un alimento esencial, que se aprovecha también para el tratamiento de ciertas patologías, desde tiempos precolombinos (Alonso, 2012). Sin embargo, en otras zonas del planeta el consumo de asaí es reciente.

En los últimos años, la distribución y venta de productos de asaí o con asaí ha aumentado notablemente en EE. UU., Europa, China y Japón, siendo Brasil el principal productor y exportador de bebidas a base de pulpa (Alonso, 2012). Este creciente interés surge, en parte, a la luz de estudios que demuestran que la ingesta de asaí podría tener efectos beneficiosos sobre la salud de quienes lo consumen (Pozo-Insfran *et al.*, 2006; Schauss *et al.*, 2006a; Mertens-Talcott *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010; Horiguchi *et al.*, 2011; Udani *et al.*, 2011; Feio *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2012; Bonomo *et al.*, 2014).

Tales efectos se deben a que esta drupa púrpura de no más de 2 cm de diámetro (Figura 2.1) contiene tanta fibra como la harina de trigo integral o el afrecho de arroz, una buena cantidad de ácidos grasos cardiosaludables (Schauss *et al.*, 2006b; Neida y Elba, 2007) y flavonoides, lignanos u otros compuestos fenólicos (Pozo-Insfran *et al.*, 2006; Schauss *et al.*, 2006b; Chin *et al.*, 2008),

que le otorgan un elevado poder antioxidante. Concretamente, la TAC del asaí liofilizado (1027 $\mu\text{mol ET/g}$) (Schauss *et al.*, 2006a) supera a la de cualquier alimento vegetal (Wu *et al.*, 2004). Por consiguiente, el asaí se considera una superfruta, que además parece tener propiedades bacteriostáticas y bactericidas.



Figura 2.1 Asaí: Palma (a), racimos (b) y fruto (c)³.

Hasta la fecha, la actividad antimicrobiana del asaí ha sido poco estudiada (Lian *et al.*, 2012; Melhorança Filho y Pereira, 2012; Bonomo *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha atribuido a los compuestos fenólicos que contiene (Lian *et al.*, 2012); hecho que concuerda con estudios llevados a cabo con extractos de otras frutas tropicales, cuya actividad antimicrobiana se relaciona, en concreto, con la presencia de polifenoles (Kabuki *et al.*, 2000; Esquenazi *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2002).

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos se debe, en parte, a su capacidad para alterar la estructura de la membrana plasmática y unirse a enzimas de membrana, dificultando la retención de compuestos intracelulares, la generación de energía y la toma de nutrientes (reducida no sólo por su acción

³ Imágenes modificadas de:

a) Scott.zona (2010) <https://www.flickr.com/photos/scottzona/4682465701/>
b) Forest Starr and Kim Starr (2011) <https://www.flickr.com/photos/forest-and-kim/5590899917/>
c) Seema Krishnakumar (2010) <https://www.flickr.com/photos/kkseema/5376237475/>
(último acceso el 03/09/2016)

a nivel de membrana, sino también por su facilidad para complejarse con todo tipo de nutrientes) (Cowan, 1999; Daglia, 2012).

En cualquier caso, teniendo en cuenta que el consumidor demanda productos nuevos, funcionales y seguros en ausencia de aditivos sintéticos, desde un punto de vista práctico resulta interesante evaluar en profundidad la capacidad antimicrobiana del asaí o de productos derivados, para poder valorar su potencial como conservantes antimicrobianos de origen natural.

En consecuencia, se cuantificó y modelizó el efecto antimicrobiano de distintas concentraciones de asaí sobre el crecimiento y la inactivación de *L. innocua* como sustituto de *L. monocytogenes* (Char *et al.*, 2010; Jadhav *et al.*, 2013; Belda-Galbis *et al.*, 2014), en medio de referencia, a 37, 22 y 10 °C.

2.1.2 Material y métodos

Preparación del cultivo microbiano

A partir de un cultivo puro liofilizado de la CECT, se obtuvieron 50 viales con *L. innocua* CECT 910, siguiendo el procedimiento descrito en el subapartado *Microorganismos* del apartado 1.1.2, con algunas modificaciones.

Brevemente, el liófilo se rehidrató con 10 mL de TSB (Scharlab SL, Barcelona, España). Tras 30 min, 5 mL de la suspensión se dispusieron en 100 mL de TSB. La mezcla obtenida se mantuvo 6 h, a 37 °C, en agitación continua de vaivén (70 rev/min). Posteriormente, 50 mL se transfirieron a 500 mL de TSB. Para obtener células en fase estacionaria, la nueva mezcla se mantuvo a 37 °C, en agitación continua de vaivén (70 rev/min), durante 21 h. Pasado ese tiempo, el cultivo celular se centrifugó 2 veces a 3836 ×g, durante 15 min, a 4 °C. Tras cada una de las dos etapas de centrifugación, el sedimento se resuspendió en 100 y 50 mL de TSB, respectivamente. El volumen final obtenido (50 mL) se dispensó en viales de 2 mL, incorporando 1 mL de cultivo celular y 1 mL de

glicerol (Scharlab SL, Barcelona, España) al 20 % (v:v) en TSB. Por último, los viales se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Además, siguiendo el protocolo descrito en el subapartado *Microorganismos* del apartado 1.1.2, se determinó la concentración celular promedio de los crioviales, partiendo de 3 muestras descongeladas a temperatura ambiente. Brevemente, las alícuotas se diluyeron en agua de peptona tamponada al 0,1 % (p:v) (Scharlab SL, Barcelona, España) y las diluciones se sembraron en TSA (Scharlab SL, Barcelona, España). El recuento de viables se llevó a cabo tras 48 h de incubación, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. El valor promedio obtenido teniendo en cuenta el factor de dilución requerido para un recuento fiable (Sutton, 2011) fue de: $9,51 \times 10^9 \pm 1,52 \times 10^9$ ufc/mL.

Procedimiento experimental

Como la composición del asaí (*E. oleracea* Mart.) depende del estado de maduración del fruto (Neida y Elba, 2007; Gordon *et al.*, 2012), se optó por trabajar con un extracto de bayas estandarizado, con 10 g de polifenoles por cada 100 g de producto comercial en polvo (Nature's Way Products Inc., Utah, EE. UU.).

Para evaluar el potencial antimicrobiano del asaí se obtuvieron curvas de crecimiento e inactivación, en ausencia y en presencia de extracto. En primer lugar se evaluó el efecto de un amplio intervalo de concentraciones (0,2-1 %, p:v), a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un doble objetivo: (i) determinar el valor de la CMI, en cuya presencia no hay proliferación durante un tiempo de incubación definido y, en base a éste, (ii) fijar el intervalo disponible de concentraciones no inhibitorias capaces de modificar el crecimiento de *L. innocua* en condiciones óptimas.

Además, una vez definido el intervalo de concentraciones sub-CMI, se evaluó el efecto de 3 concentraciones no inhibitorias (0,3; 0,5 y 0,7 %, p:v), a 22 y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En cualquier caso, para la obtención de las curvas se prepararon frascos de TSB con distintas concentraciones de asaí. Todos se inocularon con $\approx 1 \times 10^5$ ufc/mL y se mantuvieron a 37, 22 o 10 °C. Cada 60 min, 2 alícuotas de cada frasco se diluyeron en agua de peptona tamponada al 0,1 % (p:v) y se sembraron por duplicado en TSA. Con los recuentos obtenidos tras 48 h de incubación, a 37 °C, las curvas de crecimiento e inactivación se construyeron representando el logaritmo de la concentración celular (ufc/mL) en función del tiempo (h).

Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, cada experiencia se repitió al menos 3 veces, siendo 2 el número de réplicas por repetición y 4 el número de placas sembradas a partir de cada dilución. La variabilidad de los recuentos obtenidos se evaluó en base al CV de las 4 placas sembradas por punto y réplica (Ecuación I.2), de acuerdo con lo dicho en el subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 1.1.2.

Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos

Las curvas de crecimiento obtenidas a 37, 22 y 10 °C se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 1.2), para caracterizar el crecimiento de *L. innocua* en función de la temperatura y de la concentración de asaí, según el valor de los parámetros λ (h) y $\mu_{\text{máx}}$ ((log ufc/mL)/h) (Ecuaciones 1.3 y 1.4). Para ello se siguió el protocolo descrito en el subapartado *Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos* del apartado 1.1.2. De acuerdo con éste protocolo, la bondad de los ajustes se evaluó mediante el r^2 corregido y el MSE asociado a cada uno (Ecuaciones I.4 e I.5).

2.1.3 Resultados y discusión

Determinación del potencial antimicrobiano del asaí a temperatura óptima de crecimiento

La actividad antimicrobiana del asaí frente a *L. innocua* en TSB se relacionó con la concentración de extracto presente en el caldo de cultivo. Para ello,

primero se determinó la CMI y el intervalo de concentraciones no inhibitorias, capaces de modificar el crecimiento del microorganismo estudiado, en medio de referencia, a 37 °C, y, por lo tanto, bajo condiciones de crecimiento óptimas.

En total se evaluaron 6 concentraciones de asaí (0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,8 y 1 %, p:v). Las curvas de crecimiento e inactivación obtenidas se presentan en la Figura 2.2.

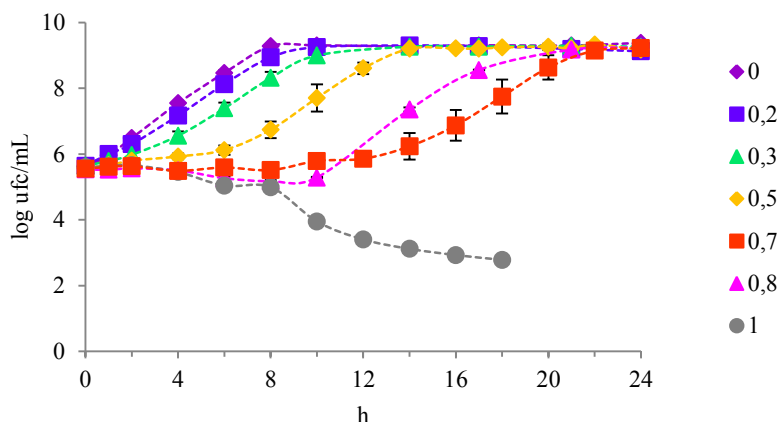


Figura 2.2 Crecimiento e inactivación de *Listeria innocua* en función de la concentración de asaí (0-1 %, p:v), a 37 °C. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

En la Tabla 2.1 se muestran los valores de N_0 , N_f y λ obtenidos según las condiciones de ensayo. De acuerdo con estos datos, 1 % (p:v) resultó ser la CMI de asaí para *L. innocua* en TSB, a 37 °C.

Además, en presencia de un 1 % (p:v) de asaí se observó la inactivación de casi 3 ciclos logarítmicos tras 18 h de incubación, y la no detección de viables tras 24 h de incubación en presencia de dicha concentración de asaí (Tabla 2.1). De este modo, se concluye que, bajo las condiciones de ensayo, la CMI coincidió con la CMM.

Tabla 2.1 Concentración celular de partida (N_0), concentración celular alcanzada en fase estacionaria (N_f) y duración del tiempo de latencia (λ) para *Listeria innocua*, a 37 °C, en función de la concentración de asaí.

| Asaí (% p:v) | N_0 (log ufc/mL) | N_f (log ufc/mL) | λ (h) |
|--------------|--------------------|--------------------------|---------------|
| 0 | 5,62 ± 0,06 | 9,38 ± 0,04 ^a | 0,83 ± 0,08 |
| 0,2 | 5,65 ± 0,05 | 9,13 ± 0,01 ^a | 1,20 ± 0,04 |
| 0,3 | 5,64 ± 0,02 | 9,26 ± 0,11 ^a | 2,34 ± 0,24 |
| 0,5 | 5,57 ± 0,06 | 9,16 ± 0,04 ^a | 5,35 ± 0,68 |
| 0,7 | 5,54 ± 0,01 | 9,22 ± 0,04 ^a | 12,35 ± 0,23 |
| 0,8 | 5,54 ± 0,01 | 9,24 ± 0,03 ^a | 11,20 ± 0,17 |
| 1 | 5,61 ± 0,06 | 2,78 ± 0,06 ^b | CMI y CMM |

^a Valor obtenido tras 24 h de incubación; ^b Valor obtenido tras 18 h de incubación.

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMM: concentración mínima microbicida.

Considerando que el producto de asaí estudiado contiene 10 g de polifenoles por cada 100 g de extracto de bayas (subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 2.1.2) y que los compuestos fenólicos podrían ser responsables de su actividad antimicrobiana (apartado 2.1.1), en base a la CMI obtenida (1%, p:v) se determinó que 0,1 % (p:v) fue la CMI de polifenoles procedentes del extracto de asaí estudiado, frente a *L. innocua*, en TSB, a 37 °C. Este valor está un poco por debajo del intervalo establecido por otros investigadores (0,16-0,26 %, p:v) al estudiar la capacidad antimicrobiana de ácidos fenólicos aislados, como el ácido cafeico y el felúrico, frente a *L. monocytogenes*, en TSB, a 30 °C (Wen *et al.*, 2003).

En este sentido, hay estudios que demuestran que el asaí contiene flavonoides y lignanos, además de ácidos fenólicos, entre ellos: protocatéquico, vanílico, siríngico, *p*-hidroxibenzoico, gálico, felúrico, cafeico, clorogénico, *p*-cumárico y elágico (Pozo-Insfran *et al.*, 2006; Pacheco-Palencia *et al.*, 2008; Rojano *et al.*, 2011). Todos ellos en conjunto podrían ser responsables del potencial antimicrobiano del extracto estudiado.

Por otro lado, a dosis por debajo de la CMI ($< 1 \%$, p:v) se observó que el crecimiento de *L. innocua* en TSB dependió de la concentración de asaí. En términos generales, a mayor concentración de asaí, mayor λ .

La influencia de la concentración de antimicrobiano sobre el parámetro cinético λ también ha sido observada por otros investigadores al evaluar el efecto antimicrobiano de otros productos vegetales (Ferrer *et al.*, 2009; Pina-Pérez *et al.*, 2012).

Evaluación del potencial antimicrobiano del asaí en concentraciones no inhibitorias

El potencial antimicrobiano del asaí a 3 dosis no inhibitorias equidistantes (0,3; 0,5 y 0,7 %, p:v) se cuantificó y modelizó a distintas temperaturas de incubación. En concreto, a temperatura óptima de crecimiento (37 °C), a temperatura ambiente (22 °C) y a temperatura de ligero abuso en refrigeración (10 °C), teniendo en cuenta que muchos frigoríficos operan como mínimo a 9 °C (Sergelidis *et al.*, 1997; Laguerre *et al.*, 2002; Carrasco *et al.*, 2007), superando, por tanto, el valor recomendado para evitar la proliferación de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos mínimamente procesados (4 °C) (Garrido *et al.*, 2010), de acuerdo con lo dicho en el subapartado *Efecto de la temperatura y de la concentración de carvacrol sobre el crecimiento de Escherichia coli K12* del apartado 1.1.3.

Con este objetivo, las curvas de crecimiento obtenidas en presencia y ausencia de dosis no inhibitorias de asaí, a 37, 22 y 10 °C (Figura 2.3) se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz, con un r^2 *corregido* mínimo de 0,9810 y un *MSE* máximo de 0,0364.

Adicionalmente, se calcularon los valores de λ y μ_{\max} asociados a cada curva. Los promedios obtenidos para estos parámetros, en las condiciones de ensayo, se muestran en la Tabla 2.2.

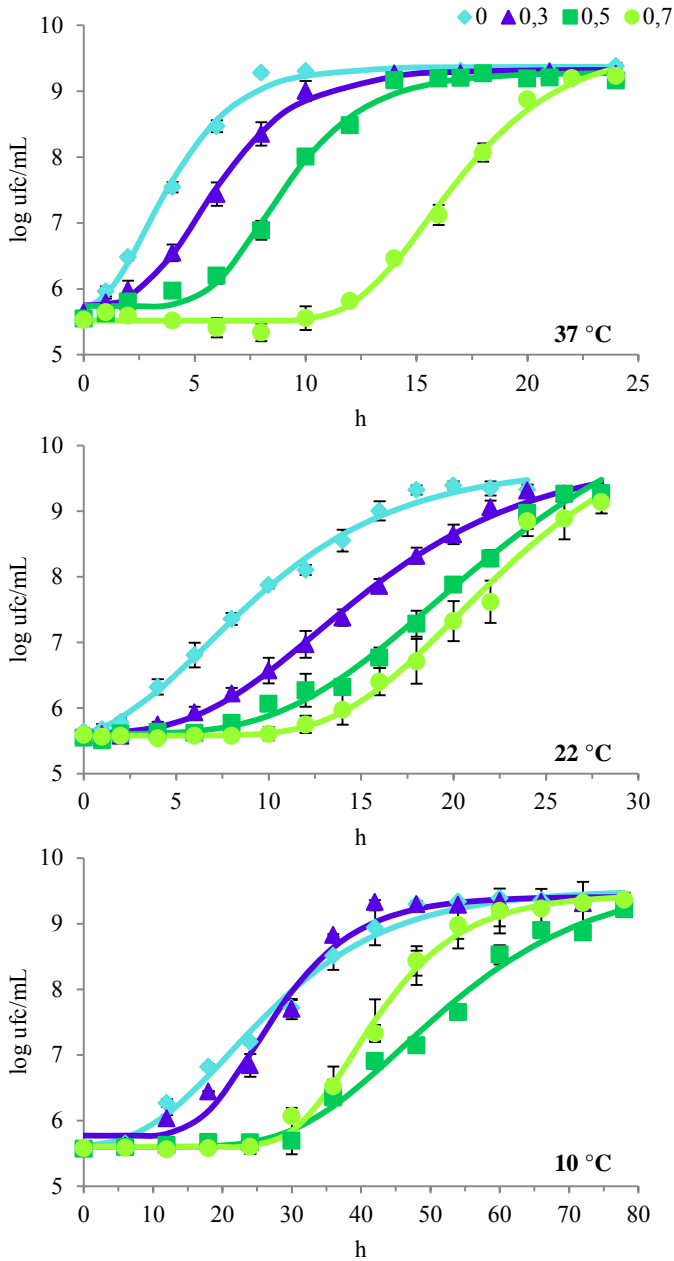


Figura 2.3 Crecimiento de *Listeria innocua* a 37, 22 y 10 °C, en función de la concentración de asái (0-0,7 %, p:v). Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos. Las líneas representan los valores predichos por la ecuación modificada de Gompertz.

Tabla 2.2 Duración del tiempo de latencia (λ) y velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) en funci3n de la concentraci3n de asa3, a 37, 22 y 10 °C.

| Asa3 (%, p:v) | λ (h) | | | $\mu_{m\acute{a}x}$ ((log ufc/mL)/h) | | |
|------------------|---------------|--------------|--------------|--------------------------------------|-------------|-------------|
| | 37 °C | 22 °C | 10 °C | 37 °C | 22 °C | 10 °C |
| 0 | 0,82 ± 0,07 | 2,12 ± 0,59 | 8,12 ± 1,37 | 0,65 ± 0,03 | 0,30 ± 0,00 | 0,11 ± 0,01 |
| 0,03 | 2,35 ± 0,22 | 6,01 ± 0,81 | 16,86 ± 3,34 | 0,51 ± 0,03 | 0,24 ± 0,03 | 0,18 ± 0,03 |
| 0,05 | 5,35 ± 0,71 | 10,57 ± 0,21 | 30,38 ± 0,76 | 0,53 ± 0,03 | 0,25 ± 0,03 | 0,11 ± 0,03 |
| 0,07 | 12,32 ± 0,26 | 13,99 ± 2,97 | 31,01 ± 2,24 | 0,47 ± 0,03 | 0,30 ± 0,03 | 0,14 ± 0,03 |

Independientemente de la concentraci3n de asa3, un descenso de temperatura siempre conllev3 un aumento de λ y un descenso de $\mu_{m\acute{a}x}$. Esto tambi3n ha sido observado por otros autores al evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano (Gospavic *et al.*, 2008; Pina-P3rez *et al.*, 2012). En vista de los resultados obtenidos, pasar de 37 a 10 °C supuso que λ se multiplicara 10 y que $\mu_{m\acute{a}x}$ se dividiera por 6, en ausencia de asa3.

Con independencia de la temperatura, la adici3n de asa3 a las concentraciones consideradas (0,3-0,7 %, p:v) produjo cambios en λ , pero no en $\mu_{m\acute{a}x}$. Bajo condiciones isot3rmicas, en presencia de asa3 parece que la fase de latencia se alarg3 mientras que la velocidad de crecimiento se mantuvo constante. En este sentido, la incubaci3n en presencia de un 0,7 % (p:v) de asa3 multiplic3 λ por 15, 7 y 4, a 37, 22 y 10 °C, respectivamente. Por tanto, la adici3n de dosis no inhibitorias de asa3 podr3a llegar a ser una medida adicional para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos, aumentando el tiempo de consumo sin riesgo, aunque se rompa la cadena de fr3o (siempre que la carga microbiana del producto sea inferior a la dosis infectiva y que no se produzcan contaminaciones que hagan que se supere dicho l3mite).

La relaci3n existente entre el logaritmo neperiano de λ y la concentraci3n de asa3, para cada una de las temperaturas ensayadas, se observa en la Figura 2.4. Entre ambas variables se estableci3 una relaci3n lineal con un r m3nimo de

0,9641. El valor de la pendiente de las rectas demuestra que el efecto de la variación de la concentración de asaí sobre λ es mayor a temperaturas elevadas, de modo que el asaí resultó más efectivo a 37 que a 22 y 10 °C. Quizás la temperatura modifica el potencial antimicrobiano del asaí, aunque también es posible que *L. innocua* sea más sensible a cambios de concentración cuando se incuba a 37 °C. De acuerdo con lo dicho para carvacrol y citral (apartados 1.1.3 y 1.2.3), cuando las bacterias crecen a bajas temperaturas modifican la composición de sus membranas para incrementar la tolerancia al frío; estos cambios pueden incrementar también su resistencia al asaí, máxime teniendo en cuenta (i) que la adaptación a un determinado estrés puede generar resistencia a otros (Wesche *et al.*, 2009) y (ii) que los compuestos fenólicos actúan a nivel de membrana (Cowan, 1999; Daglia, 2012).

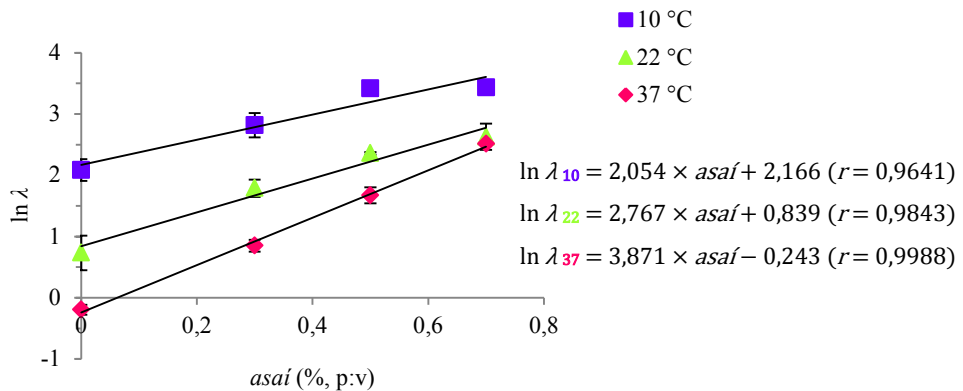


Figura 2.4 Relación entre la duración del tiempo de latencia (λ) y la concentración de asaí (*asaí*) a las temperaturas ensayadas. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

2.1.4 Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que a temperatura óptima de crecimiento (37 °C) el extracto de asaí estudiado puede controlar o inhibir el crecimiento de *L. innocua*, en función de la concentración. En este caso, 1 % (p:v) resultó ser la

CMI y la CMM, no detectándose células viables tras 24 h de incubación. A dosis por debajo de la CMI, además, el asaí resultó capaz de ralentizar el crecimiento bacteriano, prolongando la fase de latencia, hasta alcanzar un valor máximo de $31,01 \pm 2,24$ h en presencia de un 0,7 % (p:v) de asaí, a 10 °C.

Por consiguiente, el asaí podría incluirse en la formulación de alimentos no sólo dadas sus propiedades nutricionales y funcionales, sino también su potencial conservante, ya que puede ser una medida de control adicional, capaz de garantizar seguridad microbiológica durante un cierto tiempo, incluso, en caso de rotura de la cadena de frío o de ligero abuso en la temperatura de refrigeración.

2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de la estevia

2.2.1 Introducción

La estevia (Figura 2.5), también conocida como hoja dulce del Paraguay, hoja de miel, hoja de caramelo y hierba dulce (Carakostas *et al.*, 2008; Rodríguez y López, 2013), es un arbusto nativo del nordeste paraguayo, cuyas hojas han sido tradicionalmente empleadas por los indios guaraníes para endulzar bebidas y preparados medicinales (Goyal *et al.*, 2010). Su poder edulcorante se atribuye a diterpenos tetracíclicos, que reciben el nombre de esteviol glicósidos y que se forman por glicosilación diferencial del esteviol (Figura 2.5) (Brandle y Telmer, 2007). Asimismo, los esteviol glicósidos tienen actividad antimicrobiana, antihiperlipidémica, antihipertensiva, antiinflamatoria, antidiarreica, diurética, natriurética, inmunomoduladora y antitumoral (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009; Gupta *et al.*, 2013), siendo muy útiles para el tratamiento de patologías como la diabetes o la hipertensión (Chan *et al.*, 2000; Jeppesen *et al.*, 2000). Entre ellos destacan el esteviósido y el rebaudiósido A (Figura 2.5), que son, respectivamente, hasta 300 y 450 veces más dulces que la sacarosa (Crammer e Ikan, 1986). En cualquier caso, todos convierten a la estevia en fuente de

edulcorantes hipocalóricos (Savita *et al.*, 2004), que pueden sustituir todo o parte del azúcar añadido a los alimentos, sin modificar su aspecto y propiedades físicas (Yadav y Guleria, 2012). Por eso, desde hace unos años se ha disparado la producción y venta de productos de estevia o con estevia, tras demostrarse que su consumo es seguro, con una ingesta diaria admisible de 4 mg/kg, expresada en equivalentes de esteviol, de acuerdo con el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, por sus siglas en inglés) (JECFA, 2009), constituido por miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés).

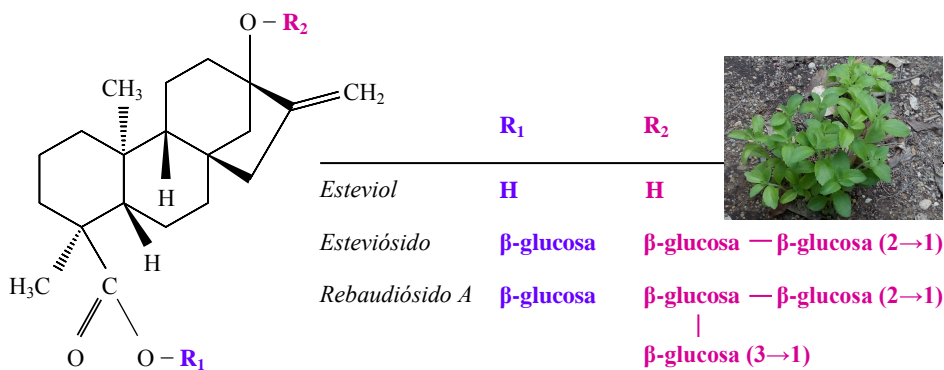


Figura 2.5 Estructura química del esteviol, el esteviósido y el rebaudiósido A que se acumulan en las hojas de estevia (Basado en: Walters, 2013).

En Asia y Sudamérica existen bebidas, conservas vegetales, productos del mar y dulces con estevia (Koyama *et al.*, 2003). Por otro lado, en EE. UU. está permitida la ingesta de extractos de estevia como suplementos dietéticos (Koyama *et al.*, 2003); además, el rebaudiósido A y mezclas de esteviol glicósidos muy puras son considerados aditivos alimentarios GRAS (Kraska *et al.*, 2012). En la UE el uso de esteviol glicósidos como aditivos alimentarios está permitido desde el año 2011 (Comisión Europea, 2011), después de que la

EFSA (2010) emitiera una opinión positiva con respecto a su seguridad. Gracias a ello, actualmente en España pueden adquirirse bebidas y chocolates con estevia, preparaciones edulcorantes y hojas secas para infusión.

Otro aspecto interesante de la estevia es su potencial antimicrobiano. La actividad antimicrobiana de algunos extractos se ha determinado mediante discos impregnados que generan halos de inhibición del crecimiento en placa (Sivaram y Mukundan, 2003; Tadhani y Subhash, 2006; Debnath, 2008; Ghosh *et al.*, 2008; Jayaraman *et al.*, 2008; Seema, 2010; Muanda *et al.*, 2011). Pese a que esta información es útil, no sirve para desarrollar modelos predictivos que permitan establecer qué concentraciones por debajo de la CMI son las más adecuadas, para garantizar estabilidad y seguridad microbiológica durante la vida útil de los alimentos mínimamente procesados; para ello serían necesarios estudios cinéticos que determinen el beneficio real asociado al uso de la estevia.

En consecuencia, se cuantificó y modelizó el efecto antimicrobiano de varios productos de estevia frente a *L. innocua*, a 37, 22 y 10 °C.

2.2.2 Material y métodos

Preparación del cultivo microbiano

A partir de un líofilo proporcionado por la CECT, se obtuvo un conjunto de viales conteniendo *L. innocua* CECT 910, siguiéndose el protocolo descrito en el subapartado *Preparación del cultivo microbiano* del apartado 2.1.2. La concentración celular promedio establecida para los viales fue de: $6,50 \times 10^9 \pm 7,97 \times 10^8$ ufc/mL.

Procedimiento experimental

Para evaluar el potencial antimicrobiano de distintos productos de estevia (*S. rebaudiana* Bertoni), primero se construyeron curvas de crecimiento a

37 °C, en TSB con y sin estevia, siguiendo el procedimiento descrito en el subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 2.1.2.

Los productos ensayados fueron los siguientes:

(i) una infusión de hojas secas (Anagálide SA, Huesca, España); (ii) un extracto crudo, con al menos 20 g de esteviol glicósidos por cada 100 g de producto (Glycostevia-EP, Anagálide SA, Huesca, España), y (iii) un extracto purificado de esteviol glicósidos, con una pureza mínima del 95 %, conteniendo al menos un 80 % (p:p) de rebaudiósido A (Glycostevia-95, Anagálide SA, Huesca, España).

Una vez evaluado el efecto de cada producto, se evaluó el potencial de distintas concentraciones del más efectivo, a 37, 22 y 10 °C.

En cualquier caso, para valorar el efecto de la infusión se obtuvo una disolución concentrada al 8,33 % (p:v), empleando agua embotellada. En concreto, 500 mL de agua hirviendo se mezclaron con 41,65 g de hoja y la mezcla se dejó en reposo durante 30 min. Pasado ese tiempo, la infusión se filtró, empleando un matraz Kitasato, un embudo Büchner, una bomba de vacío y papel de filtro Whatman n°. 1 (Whatman International Ltd, Kent, Reino Unido). La infusión filtrada se dividió en porciones y se congeló a -40 °C, hasta su uso.

Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos

De acuerdo con el procedimiento descrito en el subapartado *Modelización del crecimiento y determinación de parámetros cinéticos* del apartado 1.1.2, las curvas de crecimiento obtenidas en presencia y ausencia de estevia se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 1.2).

Además, se determinó el valor de los parámetros λ (h) y $\mu_{m\acute{a}x}$ ((log ufc/mL)/h), en función de la temperatura y de la concentración de estevia, según las Ecuaciones 1.3 y 1.4.

2.2.3 Resultados y discusión

Estudio del potencial antimicrobiano de distintos productos de estevia

El efecto de distintos productos de estevia sobre el crecimiento de *L. innocua* se evaluó a partir de las curvas obtenidas a temperatura óptima de crecimiento (37 °C), en presencia de una infusión de hojas secas (2,5 %, p:v), un extracto crudo (1 %, p:v) y un extracto purificado (1 %, p:v) rico en rebaudiósido A. La concentración ensayada de cada producto se estableció considerando la limitación que supone su capacidad endulzante desde un punto de vista sensorial (Savita *et al.*, 2004).

De acuerdo con la Figura 2.6, tanto el extracto crudo como la infusión aumentaron λ , disminuyeron $\mu_{m\acute{a}x}$ y redujeron la concentración celular tras 5 h de incubación, a 37 °C. En la Tabla 2.3 se muestran los resultados obtenidos, con un r^2 corregido mínimo de 0,9873 y un MSE máximo de 0,0150.

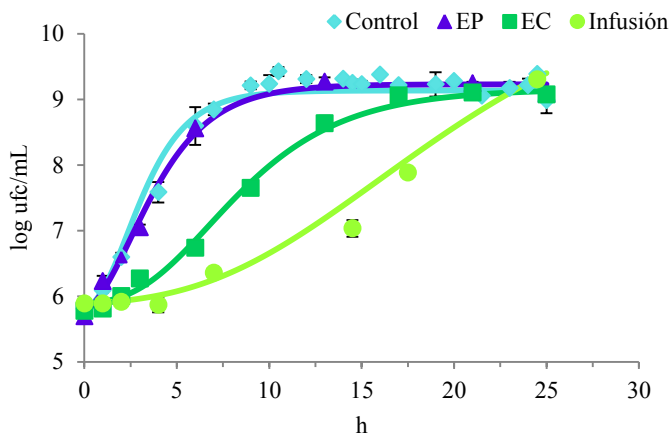


Figura 2.6 Crecimiento de *Listeria innocua* a 37 °C, en presencia de distintos productos de estevia: un extracto purificado (EP; 1 % p:v), un extracto crudo (EC; 1 %, p:v) y una infusión de hojas secas (2,5 %, p:v). Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos. Las líneas representan los valores predichos por la ecuación modificada de Gompertz.

Tabla 2.3 Caracterización del crecimiento de *Listeria innocua* en presencia y ausencia de distintos productos de estevia, a 37 °C, según la concentración celular de las muestras tras 5 h de incubación (N_5), la duración del tiempo de latencia (λ) y la velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$).

| Muestra | N_5 (log ufc/mL) | λ (h) | $\mu_{m\acute{a}x}$ ((log ufc/mL)/h) |
|-----------------------|--------------------|---------------|--------------------------------------|
| Control (sin estevia) | 8,60 ± 0,15 | 0,99 ± 0,10 | 0,64 ± 0,04 |
| Extracto purificado | 8,35 ± 0,20 | 0,47 ± 0,06 | 0,58 ± 0,05 |
| Extracto crudo | 6,58 ± 0,03 | 2,58 ± 0,12 | 0,31 ± 0,04 |
| Infusión de hojas | 6,05 ± 0,05 | 10,89 ± 0,28 | 0,25 ± 0,01 |

De acuerdo con el valor de los parámetros λ y $\mu_{m\acute{a}x}$, no hubo diferencias entre las muestras control y las que contenían el extracto purificado. En presencia del extracto crudo λ fue igual a 2,58 ± 0,12 h. Esa cifra es casi 3 veces mayor que la obtenida en ausencia de estevia (0,99 ± 0,10 h). Sin embargo, con la infusión de hojas se obtuvo un valor λ igual a 10,89 ± 0,28 h; este valor es 11 veces mayor que el valor obtenido en ausencia de estevia. Además, en presencia del extracto crudo y de la infusión de hojas, $\mu_{m\acute{a}x}$ se redujo a menos de la mitad (0,31 ± 0,04 y 0,25 ± 0,01 frente a 0,64 ± 0,04 (log ufc/mL)/h).

La distinta capacidad antimicrobiana de los extractos de estevia estudiados podría deberse a diferencias en composición, como consecuencia del nivel de procesado que han sufrido las hojas de estevia. La infusión, que es el producto menos procesado, resultó ser el más efectivo, seguido del extracto crudo. Considerando, además, que el extracto purificado no modificó el crecimiento de *L. innocua*, parece evidente que el proceso de purificación puede conllevar la degradación de compuestos con actividad antimicrobiana. En este sentido, se sabe que la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de ciertas plantas depende de la composición del aceite, que a su vez depende de la planta, de las condiciones ambientales que le rodean, del momento de cosecha, de la parte empleada para la obtención del aceite y del proceso de extracción (Burt, 2004).

Algo similar podría ocurrir con la actividad antimicrobiana de las hojas de estevia y de los productos derivados.

Por otro lado, los esteviol glicósidos podrían no estar relacionados con el potencial antimicrobiano. El extracto purificado, sin actividad antimicrobiana aparente, contiene más de un 95 % (p:p) de éstos, mientras que el extracto crudo, que fue menos activo que la infusión, contiene al menos un 20 % (p:p) de esteviol glicósidos. Diversos estudios demuestran que en las hojas de estevia, además de esteviol glicósidos, hay diterpenos no glicosídicos, triterpenos, alcoholes alifáticos y otros volátiles, compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides (Wölwer-Rieck, 2012), pertenecientes a familias de compuestos con capacidad antimicrobiana. Distintos extractos de estevia ricos en compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Muanda *et al.*, 2011). Además, muchos trabajos demuestran que terpenos y terpenoides también son antimicrobianos (Cowan, 1999). Los aceites esenciales obtenidos a partir de las hojas de estevia podrían ser antimicrobianos, precisamente, gracias a que contiene terpenoides volátiles, como el carvacrol (Muanda *et al.*, 2011), cuya actividad frente a hongos y bacterias está sobradamente contrastada (Ultee *et al.*, 1998; Chami *et al.*, 2004; Belda-Galbis *et al.*, 2014).

En cualquier caso, de acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto crudo y la infusión de estevia podrían llegar a emplearse como antimicrobianos edulcorantes no nutritivos, capaces de retrasar y ralentizar la multiplicación bacteriana.

Efecto de la temperatura y de la concentración de estevia sobre el crecimiento microbiano

En base a los resultados obtenidos con distintos productos de estevia, a 37 °C, se obtuvieron curvas de crecimiento para *L. innocua*, a 37, 22 y 10 °C, en TSB conteniendo 0; 0,5; 1,5 o 2,5 % (p:v) de estevia en infusión (Figura 2.7).

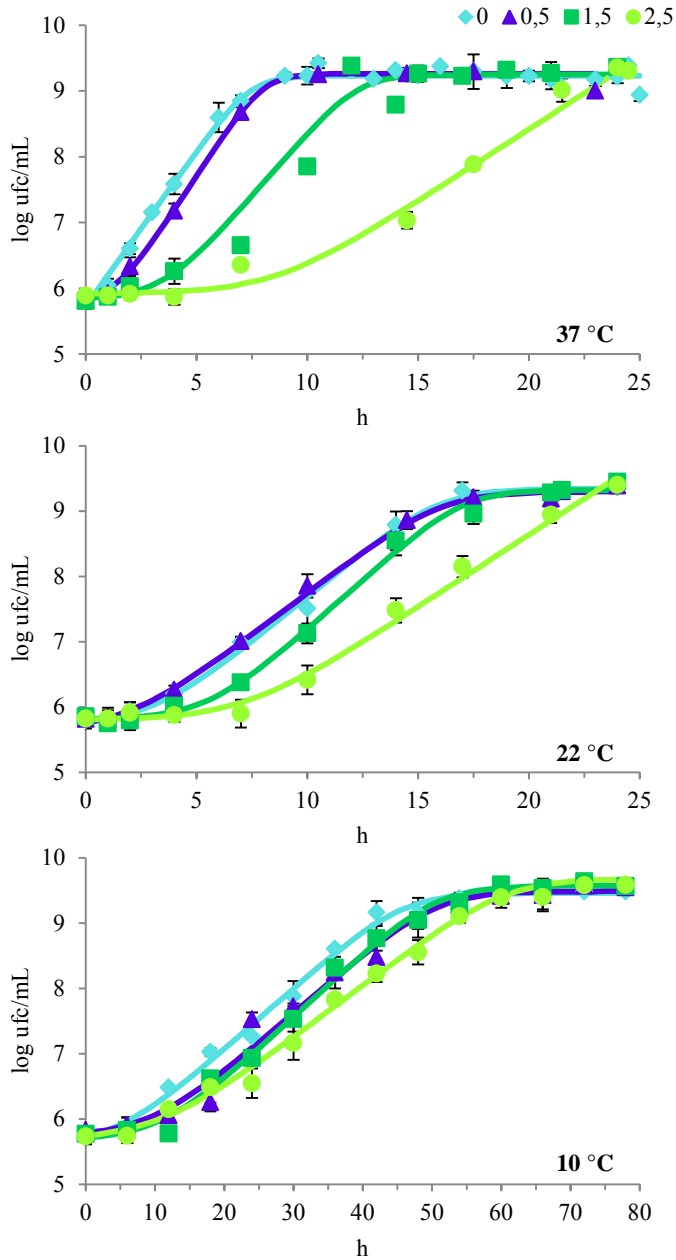


Figura 2.7 Crecimiento de *Listeria innocua* a 37, 22 y 10 °C, en función de la concentración de estevia (0-2,5 %, p.v). Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos. Las líneas representan los valores predichos por la ecuación modificada de Gompertz.

En la Tabla 2.4 se muestran los valores de λ y $\mu_{m\acute{a}x}$ obtenidos en funci3n de la temperatura y de la concentraci3n de estevia, tras el ajuste de las curvas a la ecuaci3n modificada de Gompertz, con un r^2 *corregido* m3nimo de 0,9648 y un *MSE* m3ximo de 0,0555.

Tabla 2.4 Duraci3n del tiempo de latencia (λ) y velocidad de crecimiento m3xima ($\mu_{m\acute{a}x}$) en presencia de distintas concentraciones de estevia en infusi3n, a 37, 22 y 10 °C.

| Estevia % (p:v) | λ (h) | | | $\mu_{m\acute{a}x}$ ((log ufc/mL)/h) | | |
|--------------------|---------------|-------------|--------------|--------------------------------------|-------------|-------------|
| | 37 °C | 22 °C | 10 °C | 37 °C | 22 °C | 10 °C |
| 0 | 0,98 ± 0,18 | 2,93 ± 0,63 | 10,78 ± 5,64 | 0,63 ± 0,04 | 0,33 ± 0,01 | 0,13 ± 0,04 |
| 0,5 | 1,50 ± 0,12 | 3,65 ± 0,63 | 11,30 ± 1,68 | 0,59 ± 0,03 | 0,30 ± 0,02 | 0,10 ± 0,02 |
| 1,5 | 3,84 ± 1,03 | 5,67 ± 0,89 | 12,02 ± 0,96 | 0,42 ± 0,09 | 0,32 ± 0,01 | 0,12 ± 0,02 |
| 2,5 | 9,43 ± 0,28 | 8,19 ± 0,58 | 12,37 ± 1,81 | 0,23 ± 0,00 | 0,26 ± 0,05 | 0,09 ± 0,01 |

En ausencia de estevia, reducir la temperatura siempre conllev3 un incremento de λ y un descenso de $\mu_{m\acute{a}x}$. Teniendo en cuenta los valores obtenidos bajo esas condiciones (sin estevia, a 37, 22 y 10 °C), la relaci3n de ambos par3metros con la temperatura (°C) fue la siguiente (r m3nimo = 0,9999; Ecuaciones 2.1 y 2.2):

$$\lambda = -0,228 \times temperatura + 8,998 \quad (\text{Ecuaci3n 2.1})$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = 0,017 \times temperatura - 0,107 \quad (\text{Ecuaci3n 2.2})$$

En concreto, pasar de 37 a 10 °C en ausencia estevia supuso que λ se multiplicara por 11 y que $\mu_{m\acute{a}x}$ se dividiera por 4,84. En presencia de estevia, con independencia de la concentraci3n, se observ3 la misma tendencia; es decir, una mayor ralentizaci3n del crecimiento a menor temperatura.

Por otro lado, a 37 °C se detect3 una influencia notable de la concentraci3n de estevia sobre el crecimiento. A esa temperatura, en presencia de un 2,5 % (p:v)

de estevia aumentó el tiempo de latencia (λ se multiplicó por 9,62) y disminuyó la pendiente de la curva obtenida ($\mu_{m\acute{a}x}$ se dividió por 2,73) (Tabla 2.4). A 37 °C, en presencia y ausencia de estevia (a los porcentajes ensayados), la relación existente entre ambos parámetros y la concentración de estevia (% p:v) fue la siguiente (r mínimo = 0,9593; Ecuaciones 2.3 y 2.4):

$$\lambda = 3,019 \times \text{concentración de estevia} + 0,008 \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = -0,150 \times \text{concentración de estevia} + 0,593 \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

A 22 y 10 °C, la adición de estevia tuvo el mismo efecto que a 37 °C, aunque las diferencias existentes entre los valores obtenidos con y sin estevia son menos evidentes (sobre todo a 10 °C; Tabla 2.4). Esto indica que el potencial antimicrobiano de la infusión decreció con la temperatura, tal y como ocurrió con el carvacrol, el citral y el extracto de asaí estudiado (apartados 1.1.3, 1.2.3 y subapartado *Evaluación del potencial antimicrobiano del asaí en dosis no inhibitorias* del apartado 2.1.3). De nuevo es posible que la temperatura modifique la actividad del producto o la sensibilidad del microorganismo a la exposición. Aun así, el uso de estevia para alargar la vida útil de alimentos mínimamente procesados está justificado porque podría retrasar y enlentecer el crecimiento de *L. monocytogenes* si el almacenamiento es incorrecto u ocurre un fallo en la cadena de frío.

Con los datos obtenidos se desarrollaron modelos de superficies de respuesta para λ y $\mu_{m\acute{a}x}$ (r mínimo = 0,9534) que permiten predecir el valor de esos parámetros cuando cambia la temperatura o la concentración de estevia y, por lo tanto, optimizar la conservación de alimentos cuando éstas son las estrategias consideradas para garantizar la seguridad microbiológica durante su vida útil (Ecuaciones 2.5 y 2.6).

$$\lambda = -20,932 - 1,205 \times T + 0,017 \times T^2 + 0,086 \times T \times S \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = -0,084 + 0,019 \times T + 0,066 \times S - 0,001 \times T \times S \quad (\text{Ecuaci3n 2.6})$$

En dichos modelos, T ($^{\circ}\text{C}$) representa la temperatura y S (% p:v), la concentraci3n de hojas de estevia.

2.2.4 Conclusi3n

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto crudo y la infusi3n de estevia fueron capaces de prolongar el tiempo de latencia y reducir la velocidad de crecimiento de *L. innocua* a 37 $^{\circ}\text{C}$, siendo la infusi3n m\acute{a}s efectiva que el extracto crudo, quiz*as por tratarse de un producto menos procesado. Adem*as se ha demostrado que la infusi3n puede ser efectiva a temperaturas por debajo de la \3ptima; sobre todo, a temperatura ambiente (22 $^{\circ}\text{C}$). De acuerdo con esto, en presencia de un $2,5$ % (p:v) de estevia en infusi3n, a 22 $^{\circ}\text{C}$, λ casi se triplic3, mientras que $\mu_{m\acute{a}x}$ se dividi3 por $1,24$.

Por tanto, parece evidente que deber*a reconsiderarse el aprovechamiento de productos obtenidos a partir de las hojas de estevia, dada su capacidad para dificultar el crecimiento bacteriano, sobre todo si se produce una rotura en la cadena de fr*o.

3

Evaluación del potencial antimicrobiano de una infusión de hojas secas de estevia en una matriz alimentaria

3.1 Introducción

Consumir frutas y hortalizas es imprescindible para el buen funcionamiento del organismo y previene la aparición de enfermedades crónicas no transmisibles, como la obesidad, la diabetes, la hipertensión y ciertos tipos de cáncer (CDC, 2011). Para ello, en el marco de una dieta sana y equilibrada, se aconseja ingerir diariamente al menos 400 g netos de frutas y hortalizas frescas, sin contar los tubérculos feculentos (OMS y FAO, 2003). Esta cantidad equivale a 5 piezas o porciones listas para el consumo en fresco o cocinadas, de unos 80 g cada una (Pomerleau *et al.*, 2005).

En los países desarrollados, para porcentajes considerables de la población (en ocasiones, por encima del 50 %) no se alcanza este mínimo (CDC, 2011; Tennant *et al.*, 2014). Sin embargo, la sociedad es cada vez más consciente de la recomendación y como resultado está cambiando sus hábitos alimentarios, de acuerdo con un informe de los CDC y con un estudio realizado por Taylor Nelson Sofres (TNS), para la Agencia de Normas Alimentarias (FSA, por sus siglas en inglés) y la Oficina de Información Central (COI, por sus siglas en inglés) del Reino Unido (TNS, 2007; CDC, 2011).

En los últimos años ha aumentado la producción y venta de zumos enriquecidos con leche u otras bebidas vegetales, en parte, porque permiten aprovechar los beneficios asociados a la ingesta de frutas y hortalizas. No obstante, para que la ingesta de zumos comerciales suponga una fracción de la recomendada para frutas y hortalizas, éstos deben ser alimentos mínimamente procesados. En este

sentido, resulta esencial tanto la aplicación de tecnologías de conservación no térmicas como el uso de conservantes de origen natural, que sean capaces de garantizar estabilidad e inocuidad, sin apenas modificar las características de los zumos recién exprimidos.

En referencia al uso de conservantes de origen natural, para la producción de alimentos libres de aditivos debe optarse, sin duda, por formulaciones que contengan alimentos con propiedades antimicrobianas.

En consecuencia, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para asaí y estevia en medio de referencia (Capítulo 2), así como la capacidad edulcorante de la estevia y que nunca se ha valorado su potencial antimicrobiano en un alimento, se formuló una bebida vegetal y se evaluó el efecto de distintas concentraciones de estevia (0,5-2,5 %, p:v), en forma de infusión, frente a *L. monocytogenes*, a 37 y 10 °C. Con este objetivo, se cuantificó y modelizó la inactivación en función de la concentración de estevia y se cuantificó el daño subletal en presencia de un 2,5 % (p:v) de ésta.

3.2 Material y métodos

3.2.1 Preparación del cultivo microbiano

De acuerdo con el procedimiento descrito para *L. innocua* en el subapartado *Preparación del cultivo microbiano* del apartado 2.1.2, se preparó un conjunto de viales con *L. monocytogenes* CECT 4032 ($7,17 \times 10^9 \pm 1,01 \times 10^8$ ufc/mL), en fase estacionaria. La cepa escogida fue originalmente asociada a un caso de meningitis contraída por consumo de queso de pasta blanda.

3.2.2 Formulación de la bebida

La composición de la bebida empleada para evaluar el potencial antimicrobiano de distintas concentraciones de estevia (*S. rebaudiana* Bertoni) se muestra en la Tabla 3.1.

Para la formulación del alimento se tuvo en cuenta el interés que suscitan y la buena aceptación que tienen los zumos sin azúcares añadidos, enriquecidos con leche o productos similares, elaborados a partir de cereales, vegetales o frutos secos.

Tabla 3.1 Composición de la bebida formulada.

| Ingrediente | % (v:v) |
|--|---------|
| Zumo de mango (<i>Mangifera indica</i> L.) | 10 |
| Zumo de naranja (<i>Citrus ×sinensis</i> (L.) Osbeck ‘Salustiana’) | 7,5 |
| Zumo de papaya (<i>Papaya carica</i> L.) | 32,5 |
| Batido de avena ^a (<i>Avena sativa</i> L.) | 20 |
| Infusión de hojas de estevia ^b (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) o agua embotellada | 30 |

^a *Lactavena Bio, Santiveri SL, Barcelona, España;* ^b *Anagálide SA, Huesca, España*

La proporción total de zumos se estableció considerando que en el mercado no existen bebidas de este tipo con un 50 % (v:v) de zumos procedentes de fruta fresca, más parecido a ésta que cualquier néctar o zumo preparado a partir de concentrados. Mango (*Mangifera indica* L.), naranja (*C. ×sinensis* (L.) Osbeck ‘Salustiana’) y papaya (*Papaya carica* L.) se escogieron por ser ricas en compuestos antioxidantes, que pueden ralentizar el deterioro bioquímico de la bebida y que son beneficiosos para el consumidor, impidiendo la acumulación de radicales libres y el desarrollo de patologías asociadas al daño oxidativo (Gutiérrez *et al.*, 2007).

El porcentaje exacto de cada zumo se fijó para un pH final superior a 4,6, siendo éste un valor crítico para la proliferación de microorganismos en zumos (Pilavtepe-Çelik, 2013).

La mezcla de zumos se combinó con un batido de avena (*Avena sativa* L.) para formular una bebida rica en fibra, apta para intolerantes a la lactosa, sin colesterol ni otras grasas de origen animal. En concreto, se escogió el batido de

avena ecológica Lactavena Bio de la marca Santiveri SL (Barcelona, España) porque contenía sólo avena y agua, y porque su porcentaje de avena era el más alto del mercado (14 %, p:v).

3.2.3 Obtención de la bebida

Los zumos se prepararon por separado, usando exprimidores convencionales, equipos de molienda (FitzMill, FitzPatrick, Chicago, EE. UU.), prensas neumáticas, tela de lino, tamices (diámetro: 297 μm) y batidoras, que en conjunto permitieron obtener una mezcla homogénea, aprovechando al máximo las piezas fruta adquiridas.

Además, se preparó infusión de hojas secas de estevia (Anagálide SA, Huesca, España), al 8,33 % (p:v), de acuerdo con el protocolo descrito en el subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 2.2.2.

La mezcla de zumos, el batido de avena y la infusión de estevia se dividieron en porciones y se almacenaron, por separado, a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para cada ensayo, los zumos y el batido se mezclaron y se esterilizaron en autoclave ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min). Bajo condiciones asépticas, la infusión se añadió a la bebida tras esterilizarse por doble filtración mediante filtros de jeringa estériles de 0,45 y 0,22 μm (Minisart, Sartorius SA, Madrid, España).

En las muestras sin estevia, la infusión se reemplazó por agua embotellada esterilizada en autoclave ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min), que también se utilizó para diluir la infusión y obtener muestras de bebida con distintas concentraciones de estevia.

3.2.4 Estudio de la actividad antimicrobiana de la estevia en la bebida formulada

Para evaluar el potencial antimicrobiano de la estevia en la bebida se obtuvieron curvas de supervivencia a 37 y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, en presencia de distintas concentraciones de estevia. Las concentraciones escogidas fueron las mismas que se emplearon

para evaluar el potencial antimicrobiano de la infusión en medio de referencia (0,5-2,5 %, p:v; subapartado *Efecto de la temperatura y de la concentración de estevia sobre el crecimiento microbiano* del apartado 2.2.3).

Los datos experimentales se obtuvieron por recuento de viables, durante un periodo máximo de 1008 h (42 d), con una N_0 de 1×10^5 ufc/mL. La dilución de las muestras se realizó en agua de peptona tamponada al 0,1 % (p:v) (Scharlab SL, Barcelona, España); la siembra, utilizando TSA (Scharlab SL, Barcelona, España), y el recuento de viables, tras mantener las placas a 37 °C, durante 48 h.

Cada curva se construyó a partir de 3 repeticiones, con 2 réplicas por repetición y 4 placas por punto. La variabilidad de los resultados se evaluó en base al CV (Ecuación I.2) asociado a las placas por punto, de acuerdo con lo dicho en el subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 1.1.2.

3.2.5 Ajuste de los resultados a un modelo

Las curvas de supervivencia obtenidas en presencia y ausencia de estevia, a 37 y 10 °C, se ajustaron a la distribución de frecuencias de Weibull (Ecuación 3.1) (Peleg y Cole, 1998),

$$\log S_t = -b \times t^n \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

donde S_t (adimensional) representa la fracción de supervivientes a tiempo t (h); b (1/h), el factor de escala, y n (adimensional), el factor de forma.

La distribución de frecuencias de Weibull destaca por su simplicidad y robustez para describir cinéticas de inactivación lineales ($n = 1$), cóncavas ($n < 1$) y convexas ($n > 1$) (Mafart *et al.*, 2002).

Asimismo, cabe destacar que la expresión semilogarítmica escogida se ha utilizado para describir la inactivación microbiana (Buzrul *et al.*, 2005; Ferrante *et al.*, 2007; Pina-Pérez *et al.*, 2010; Ortuño *et al.*, 2012), resultando más

conveniente que la expresión lineal para la descripción de curvas no lineales (Peleg y Cole, 1998), como las obtenidas.

Con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II, versión 11 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, EE. UU.), el ajuste de las curvas se efectuó por regresión no lineal, empleando el algoritmo de Marquadt para minimizar la suma residual de cuadrados (Zwietering *et al.*, 1990).

La bondad de los ajustes se evaluó mediante el r^2 corregido y el *MSE* asociado a cada uno (Ecuaciones I.4 e I.5).

3.2.6 Estudio del daño subletal generado por la estevia a 37 y 10 °C

Para evaluar el daño provocado por la incubación en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.2.4, realizando la siembra en medio selectivo; concretamente, en TSA con un 5 % (p:v) de cloruro sódico (Scharlab SL, Barcelona, España) (García *et al.*, 2005; Somolinos *et al.*, 2008; Muñoz-Cuevas *et al.*, 2013) (Figura 3.1).

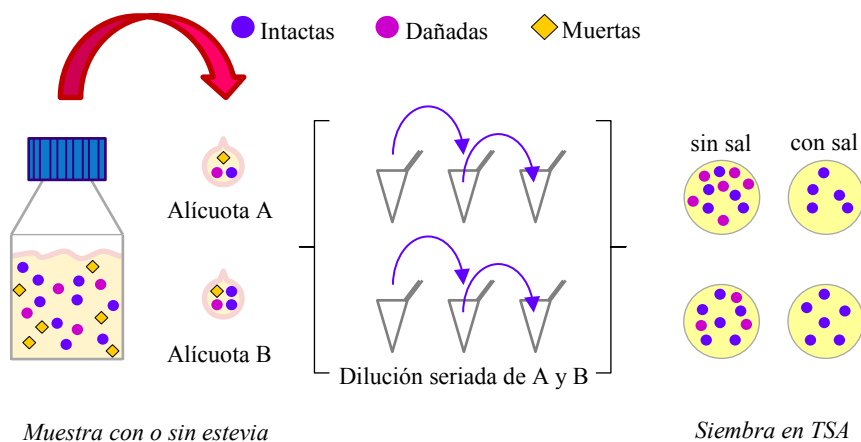


Figura 3.1 Protocolo para la obtención de curvas de supervivencia evaluando tanto la inactivación como el daño subletal en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia.

Puesto que las células dañadas son incapaces de crecer en medios selectivos (Wu, 2008; Wesche *et al.*, 2009), el daño (log ufc/mL) con el tiempo (h) se cuantificó, en ausencia y en presencia de estevia, sabiendo (i) que dañadas e intactas son células viables capaces de crecer en ausencia de sal, y (ii) que las células intactas son viables no dañadas capaces de crecer en presencia de ésta (Ecuaciones 3.2-3.4).

$$viables = intactas + dañadas = \text{recuento SIN sal} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

$$intactas = \text{recuento CON sal} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

$$dañadas = viables - intactas \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Además, se construyeron histogramas que muestran la evolución de las células muertas, dañadas e intactas, teniendo en cuenta que el número total de células muertas (log ufc/mL) a tiempo t (h) es igual a la diferencia entre el recuento sin sal a tiempo t y el recuento sin sal a tiempo 0; o lo que es lo mismo, a la diferencia entre recuento de viables a tiempo t y el recuento de viables a tiempo 0 (Ecuación 3.5).

$$muertas = viables - viables \text{ a tiempo } 0 \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Actividad antimicrobiana de la estevia en la bebida formulada

Para evaluar el efecto de distintas concentraciones de estevia sobre la inactivación de *L. monocytogenes* en un alimento, se obtuvieron curvas de supervivencia a 37 y 10 °C, en una bebida vegetal que contenía zumo de mango, zumo de naranja, zumo de papaya, batido de avena y agua o infusión de hojas de estevia a las siguientes concentraciones: 0,5; 1,5 y 2,5 % (p:v) (Figura 3.2).

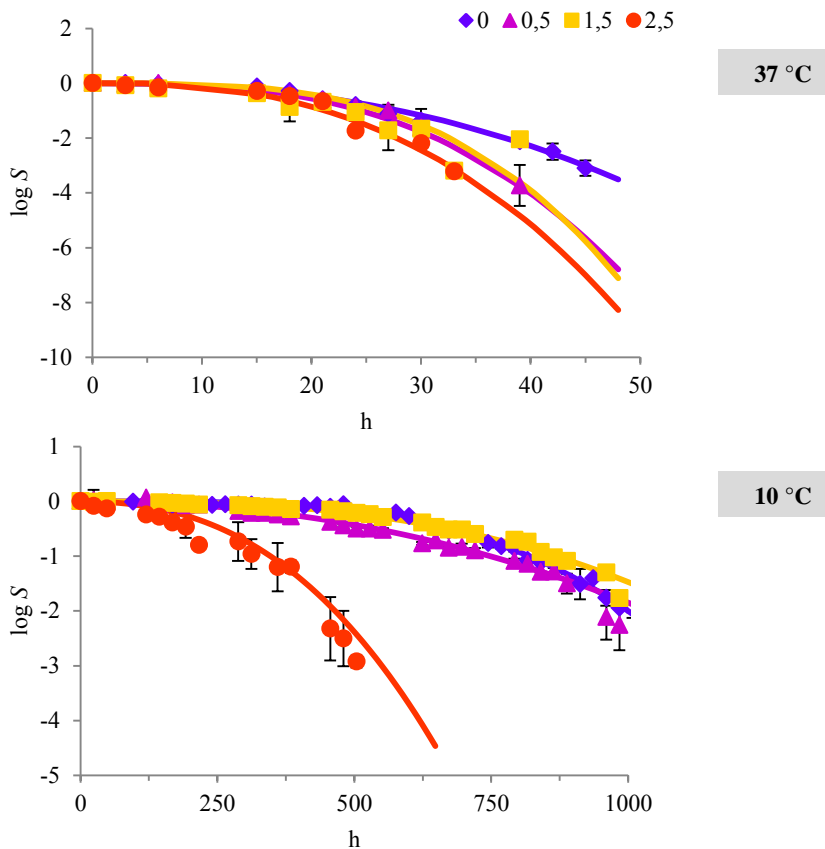


Figura 3.2 Curvas de supervivencia (S) para *Listeria monocytogenes* en función de la temperatura y de la concentración de estevia en la bebida formulada (0-2,5 %, p:v). Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos. Las líneas representan los valores predichos por la distribución de frecuencias de Weibull.

Según los resultados obtenidos, a 37 °C la concentración de *L. monocytogenes* en la bebida, con y sin estevia, se mantuvo constante ($\approx 1 \times 10^6$ ufc/mL) durante 18 h. A partir de ese momento, la concentración celular decreció, lográndose la inactivación de 3,10 ciclos logarítmicos en la bebida sin estevia, y la no detección de células viables en la bebida con un 2,5 % (p:v) de ésta, tras 45 h de

incubación (Figura 3.2). A 10 °C, la concentración de *L. monocytogenes* en ausencia de estevia permaneció constante durante cerca de 500 h (21 d), disminuyendo en 1,94 ciclos logarítmicos, tras 984 h (41 d) de incubación. En este caso, la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia supuso que tras 120 h (5 d) comenzara a disminuir la concentración de *L. monocytogenes* en la bebida, lográndose 2,93 reducciones logarítmicas tras 500 h (21 d) de incubación (Figura 3.2).

Las curvas obtenidas se ajustaron a la distribución de frecuencias de Weibull, con un r^2 corregido mínimo de 0,9547 y un MSE máximo de 0,0645. En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros b y n .

Tabla 3.2 Valor de los parámetros de la distribución de frecuencias de Weibull (b y n) en función de la concentración de estevia y de la temperatura.

| Elevia (%, p:v) | b | | n | |
|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 37 °C | 10 °C | 37 °C | 10 °C |
| 0 | $0,04 \pm 1,41 \times 10^{-3}$ | $0,001 \pm 2,07 \times 10^{-5}$ | $2,32 \pm 0,39$ | $3,48 \pm 0,07$ |
| 0,5 | $0,04 \pm 2,12 \times 10^{-3}$ | $0,001 \pm 1,64 \times 10^{-6}$ | $2,84 \pm 0,16$ | $2,11 \pm 0,19$ |
| 1,5 | $0,04 \pm 2,83 \times 10^{-3}$ | $0,001 \pm 2,25 \times 10^{-5}$ | $3,28 \pm 0,14$ | $2,71 \pm 0,05$ |
| 2,5 | $0,05 \pm 1,00 \times 10^{-3}$ | $0,003 \pm 5,39 \times 10^{-4}$ | $2,59 \pm 0,12$ | $2,48 \pm 0,49$ |

Independientemente de la temperatura y de la concentración de estevia, el valor de n fue siempre superior a 1. La presencia de un hombro indica que la inactivación ocurre, o es evidente, tras un cierto tiempo, cuyo significado genera cierta controversia (Xiong *et al.*, 1999; Peleg, 2000). Algunos autores creen que podría tratarse de un tiempo durante el cual las células acumulan daños irreparables, hasta alcanzar un nivel crítico, pero también los hay que consideran que éste sólo es parte de la forma acumulativa de una distribución de eventos letales que ocurren con el tiempo (Xiong *et al.*, 1999; Peleg, 2000).

En cualquier caso, no se detectaron diferencias entre las muestras control y las que contenían hasta un 1,5 % (p:v) de estevia, independientemente de la temperatura. Sin embargo, sí que se observaron diferencias entre el grupo control y las muestras con un 2,5 % (p:v) de estevia. En presencia de este porcentaje b se multiplicó por 1,25 y 3 a 37 y 10 °C, respectivamente. Considerando que b está inversamente relacionado con el tiempo hasta que ocurre la primera reducción decimal y directamente relacionado con la velocidad de inactivación, de acuerdo con estos resultados, un 2,5 % (p:v) de estevia aceleró la inactivación de *L. monocytogenes* en la bebida, reduciendo el tiempo de latencia y aumentando la pendiente de la curva de inactivación, sobre todo a 10 °C.

Con independencia de la concentración de estevia, se observó que disminuir la temperatura, pasando de 37 a 10 °C, comportó una reducción de b , justificable dada la ralentización general de los procesos biológicos a temperaturas bajas.

3.3.2 Daño subletal generado por la estevia a 37 y 10 °C

La exposición a agentes o condiciones estresantes, sean de naturaleza física o química, puede generar daño subletal y la población dañada puede tener un comportamiento diferente en comparación con las células intactas.

En principio, las células dañadas pueden ser más sensibles que las intactas, y esto facilitaría su inactivación. No obstante, también es posible que el daño genere cambios que incrementen la resistencia del microorganismo al agente o condición que lo generó, e incluso a otros, manteniendo o incrementado la virulencia de aquellos que son patógenos (Leistner, 2000; Wu, 2008; Wesche *et al.*, 2009). Por ello, para valorar el potencial de cualquier estrategia de conservación es importante detectar y caracterizar el daño infligido, porque así se evitan posibles sobre- o subestimaciones, al tiempo que puede aumentarse la eficacia de la estrategia en cuestión.

De acuerdo con lo dicho, para evaluar de una forma más completa y precisa el potencial antimicrobiano de la estevia frente a *L. monocytogenes*, se cuantificó el daño subletal producido con la incubación en presencia de un 2,5 % (p:v) de ésta, a 37 y 10 °C.

En vista de los histogramas obtenidos (Figuras 3.3 y 3.4), a tiempo 0 la población no contenía células dañadas. A partir de ese momento y en términos generales, la proporción inicial de células intactas disminuyó hasta desaparecer, al tiempo que aumentó la proporción de células muertas y la proporción de células dañadas. Independientemente de las condiciones de ensayo, tras la desaparición de las células intactas las células dañadas alcanzaron una proporción máxima, que disminuyó hasta desaparecer, sin detectarse la reaparición de células intactas y, por tanto, lográndose la inactivación completa del inóculo inicial. Estas observaciones apoyarían la hipótesis de que “dañada” es un estadio intermedio entre “intacta” y “muerta”, estableciéndose una única dirección de flujo desde las células intactas a las dañadas o muertas, en el sistema estudiado. Por consiguiente y puesto que todas las células acabaron muriendo, el daño subletal no se consideró un riesgo, sino más bien una ventaja, para la bebida formulada, en las condiciones de ensayo.

Según los histogramas obtenidos, la no detección de células intactas ocurrió siempre antes en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia. Este hecho se explica porque la proporción inicial de células intactas comenzó a disminuir antes y disminuyó más rápido en presencia de estevia, independientemente de la temperatura. El hecho de que las células intactas comenzarán a desaparecer antes y lo hicieran más rápido se explica porque que la estevia aumentó la proporción total de daño y muerte por hora, hasta que desaparecieron las células intactas. Este aumento se asoció a un aumento en la proporción de células muertas para todos los tiempos considerados, y a un aumento en la proporción de células dañadas en algunos casos.

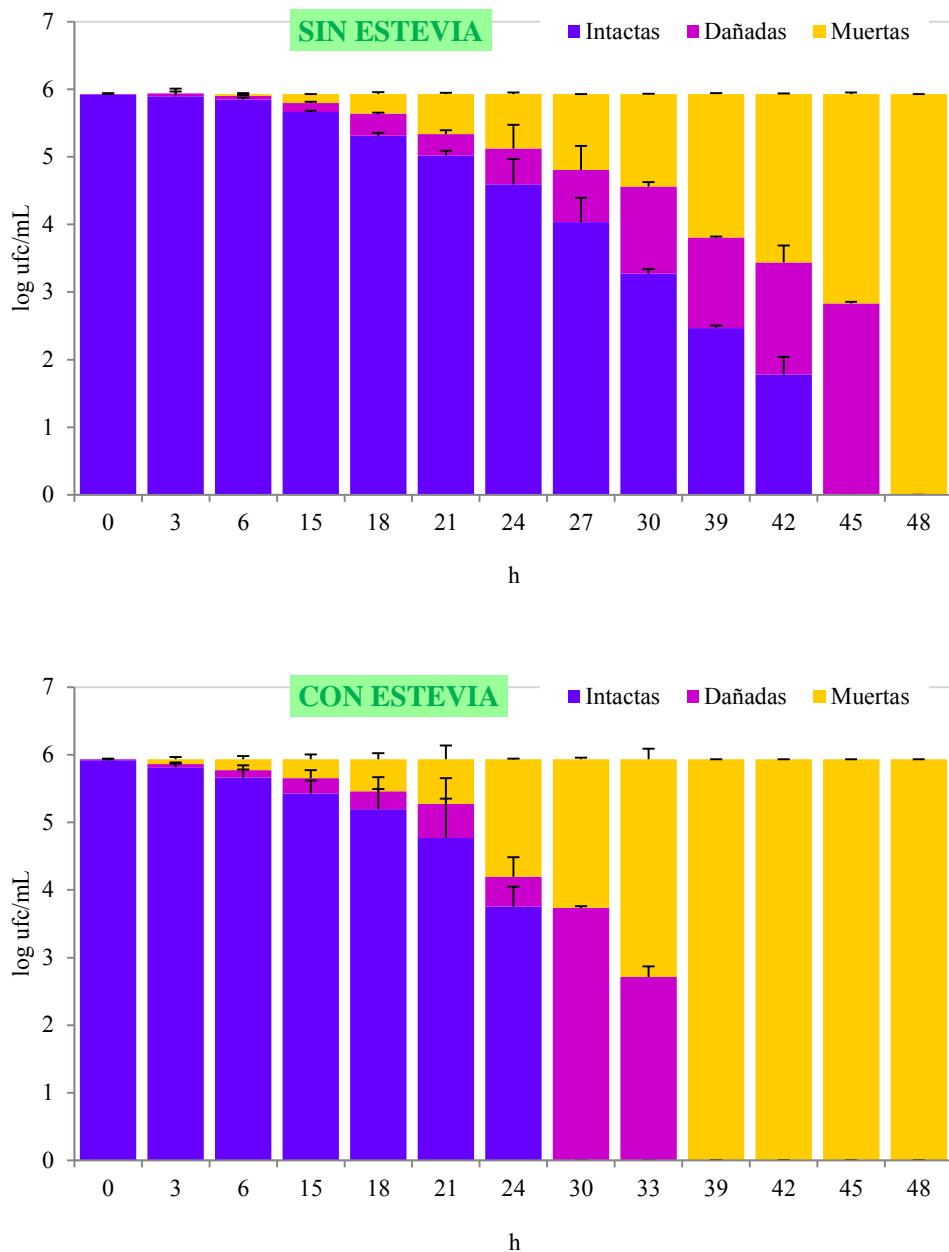


Figura 3.3 Concentración de células intactas, dañadas y muertas con el tiempo de incubación, a 37 °C, en la bebida formulada sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

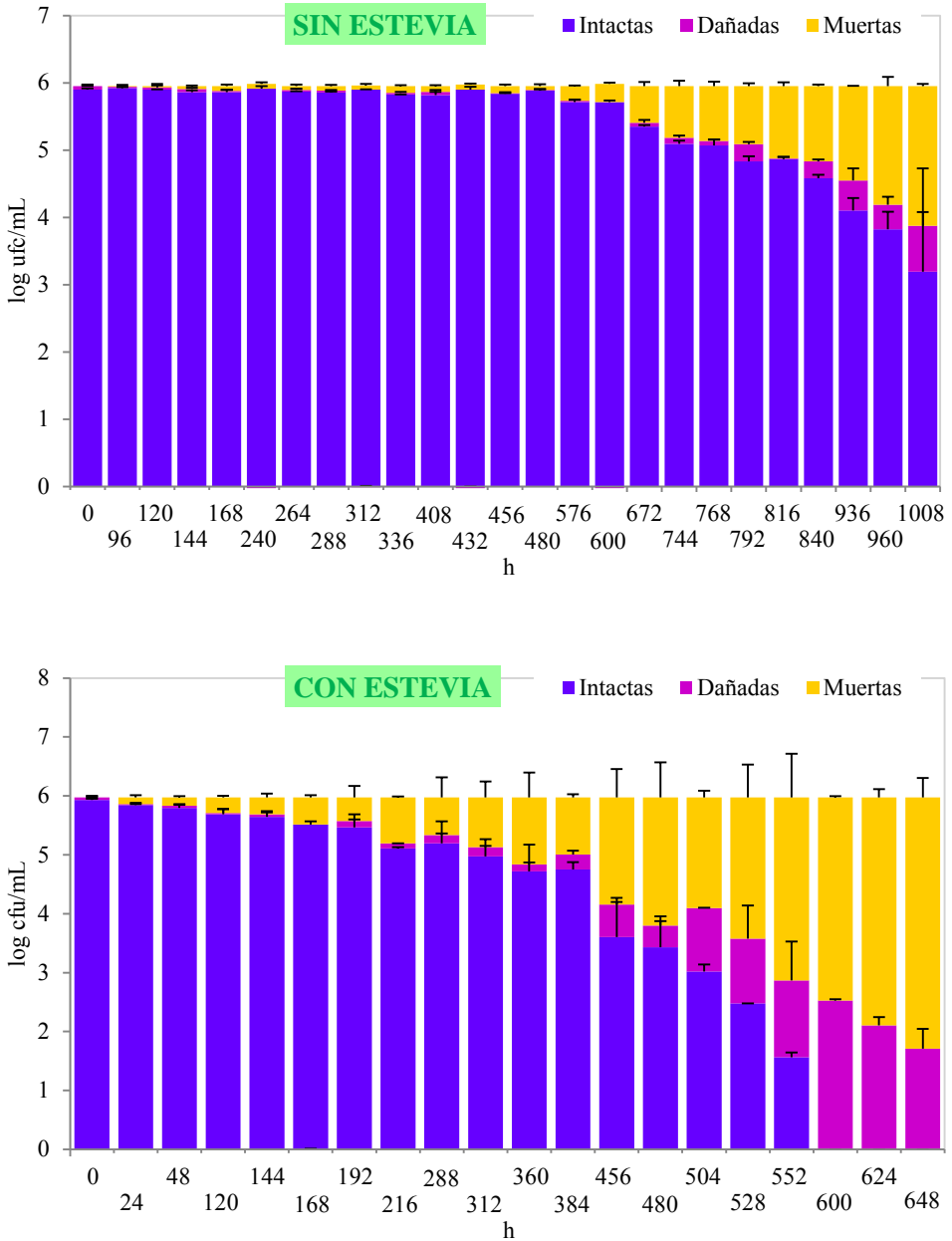


Figura 3.4 Concentración de células intactas, dañadas y muertas con el tiempo de incubación, a 10 °C, en la bebida formulada sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

3.4 Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que un 2,5 % (p:v) de estevia aceleró la inactivación de *L. monocytogenes* en una bebida con mango, naranja, papaya y avena, sobre todo a 10 °C (considerada como una temperatura de ligero abuso en refrigeración). En esas condiciones, la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia triplicó el valor del parámetro *b*, directamente relacionado con la velocidad de inactivación. Además, se observó que la adición de estevia aceleró la inactivación de las células intactas, aumentando la proporción de células muertas, y en algunos casos también la proporción de células dañadas. En las condiciones de ensayo, el daño no se consideró un riesgo porque todas las células presentes en la bebida acabaron muriendo.

Por consiguiente, se demuestra que un 2,5 % (p:v) de estevia podría llegar a utilizarse para alargar la vida útil de bebidas similares a la bebida formulada (al menos desde un punto de vista microbiológico), además de como un ingrediente edulcorante de origen vegetal, seguro, apto para diabéticos, no cariogénico, acalórico y con posibles efectos positivos sobre la salud del consumidor.

4

Evaluación del potencial antimicrobiano de las altas presiones hidrostáticas combinadas con la adición de estevia en una matriz alimentaria

4.1 Introducción

La tecnología de barreras se basa en el uso combinado de distintos métodos de conservación para obtener alimentos seguros, estables, nutritivos, sabrosos y económicos, aprovechando efectos sinérgicos (Figura 4.1), que aumenten la eficacia de los métodos escogidos, que permitan, por lo tanto, reducir su intensidad y respetar en mayor medida las características naturales del producto en cuestión (Leistner y Gorris, 1995; Leistner, 2000). Así, la tecnología de barreras es muy conveniente en la producción de alimentos mínimamente procesados, para los que se recomienda combinar la aplicación de tecnologías no térmicas con el uso de conservantes antimicrobianos de origen natural, porque de este modo podría garantizarse estabilidad e inocuidad hasta el momento de consumo (Corbo *et al.*, 2009).

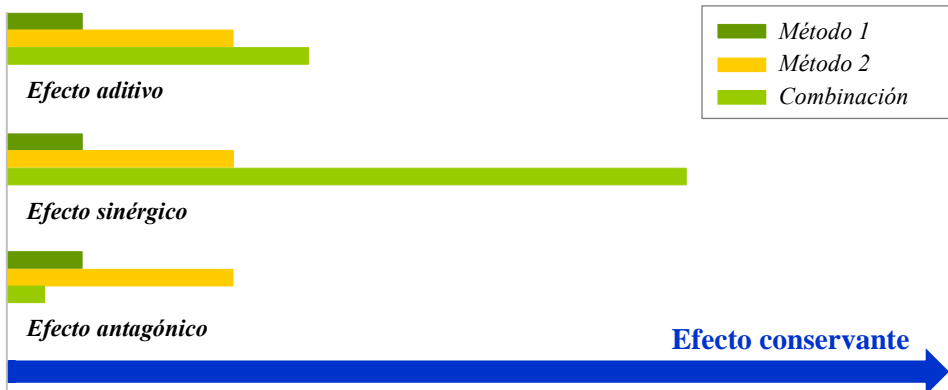


Figura 4.1 Efectos posibles al combinar dos métodos de conservación (Basado en: Raso y Barbosa-Cánovas, 2003).

El desarrollo y la puesta en práctica de tecnologías de conservación alternativas al procesado térmico, convencional u optimizado, surge hace más de 30 años, en vista de que el calor produce cambios no deseados en las características propias de los alimentos (Lado y Yousef, 2002). Entre estas tecnologías destaca el procesado mediante HHP, no sólo porque puede reducir la carga microbiana de los alimentos, sino también porque puede inhibir la actividad de enzimas relacionados con el deterioro de éstos (Basak *et al.*, 2002; Chen y Hoover, 2003; Wang *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013), siendo, además, una alternativa que ya se aplica comercialmente.

En el contexto de la tecnología de barreras, diversos trabajos demuestran que combinar la aplicación de HHP con el uso de antimicrobianos de origen natural puede tener efectos sinérgicos frente bacterias gram positivas y gram negativas (Morgan *et al.*, 2000; Karatzas *et al.*, 2001; García-Graells *et al.*, 2003; Pina-Pérez *et al.*, 2009; Feyaerts *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta estos estudios, tras evaluarse el potencial antimicrobiano de la estevia en una bebida vegetal (Capítulo 3), se evaluó el efecto obtenido al combinar la adición estevia con las HHP, frente *L. monocytogenes*, en la misma bebida.

4.2 Material y métodos

4.2.1 Preparación del cultivo microbiano

Según el procedimiento descrito para *L. innocua* en el subapartado *Preparación del cultivo microbiano* del apartado 2.1.2, se prepararon 50 viales conteniendo *L. monocytogenes* CECT 4032, en fase estacionaria.

La concentración celular promedio de los viales se estimó por recuento en placa (*Preparación del cultivo microbiano* del apartado 2.1.2), obteniéndose un valor de: $8,34 \times 10^9 \pm 1,47 \times 10^9$ ufc/mL.

4.2.2 Obtención de la bebida

De acuerdo con los apartados 3.2.2 y 3.2.3, se preparó una bebida vegetal con zumo mango (*M. indica* L.; 10 %, v:v); zumo de naranja (*C. ×sinensis* (L.) Osbeck ‘Salustiana’; 7,5 %, v:v); zumo de papaya (*P. carica* L.; 10 %, v:v); batido de avena (*A. sativa* L.; 20 %, v:v), y agua o infusión de hojas secas de estevia (*S. rebaudiana* Bertoni; 30 %, v:v).

4.2.3 Tratamiento de las muestras por altas presiones hidrostáticas

Para el tratamiento por HHP se empleó un equipo de la empresa EPSI NV (Temse, Bélgica). Concretamente, el equipo instalado en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC). Este equipo posee una cámara de presurización vertical, con capacidad para 2,35 L; un sistema generador de presión por compresión indirecta, y un módulo de termostatación, que permite controlar la temperatura de la vasija durante el procesado (Figura 4.2).



- (1) Cámara de presurización
- (2) Módulo generador de alta presión
- (3) Sistema de termostatación

Figura 4.2 Elementos básicos del equipo de altas presiones hidrostáticas disponible en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Fotografía cedida por el Grupo Procesos de Conservación y Evaluación de Riesgos en Alimentos).

Como medio presurizante se utilizó una mezcla de agua y etilenglicol, en proporción 70:30 (v:v). Una vez fijadas las condiciones de procesado, el equipo controló la presión (MPa), el tiempo (min) y la temperatura (°C) de trabajo.

La temperatura se fijó en 22 °C, considerando que la compresión adiabática del agua conlleva un aumento de 3 °C por cada 100 MPa (Ting *et al.*, 2002; Rastogi *et al.*, 2007). La velocidad de incremento de la presión hasta el valor de trabajo fue de 300 MPa/min. La despresurización se realizó siempre de forma rápida, pero no súbita; con una duración de entre 30 y 45 s.

Los tratamientos ensayados se muestran en la Tabla 4.1. Para evaluar su efecto antimicrobiano se prepararon bolsas termoselladas con bebida inoculada para un N_0 entre 1×10^7 y 1×10^8 ufc/mL. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en ausencia y en presencia de estevia (2,5 %, p:v).

Tabla 4.1 Presiones y tiempos de tratamiento considerados para evaluar el efecto antimicrobiano del procesado por altas presiones hidrostáticas en ausencia y en presencia de estevia (2,5 %, p:v).

| Presión (MPa) | Tiempo de tratamiento (min) |
|---------------|-----------------------------|
| 250 | 5; 10; 15; 17,5; 20 |
| 275 | 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 |
| 300 | 1; 3; 4; 5; 6; 7 |
| 325 | 1; 2; 3; 4; 5 |

Las bolsas se mantuvieron en un baño de agua y hielo antes y después de someterlas a HHP. Posteriormente, se aprovecharon para evaluar el efecto del tratamiento, en ausencia y presencia de estevia, o bien para evaluar el efecto antimicrobiano de la combinación de métodos durante el almacenamiento posprocesado, a las temperaturas ensayadas, según el procedimiento descrito en los apartados 4.2.4 y 4.2.5.

Cada tratamiento se llevó a cabo al menos 3 veces, con 2 réplicas por repetición y 4 placas por réplica. La variabilidad de los resultados se evaluó en base al CV (Ecuación I.2) asociado a las placas por réplica, de acuerdo con lo dicho en el subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 1.1.2.

4.2.4 Estudio de la inactivación y el daño producidos con el procesado mediante altas presiones hidrostáticas, en la bebida con y sin estevia

La inactivación alcanzada con distintos tratamientos (Tabla 4.1) se determinó comparando los recuentos pre- y posprocesado obtenidos en TSA (Scharlab SL, Barcelona, España). Para la cuantificación del daño por HHP se procedió de acuerdo con el apartado 3.2.6. Según éste, la proporción de células dañadas postratamiento se calculó como la diferencia entre el recuento de células viables y el recuento de células intactas obtenidos con el mismo tratamiento.

A partir de los resultados experimentales se construyeron curvas de inactivación en función de la presión. De acuerdo con lo dicho en el apartado 3.2.5, las curvas obtenidas se ajustaron a la distribución de frecuencias de Weibull (Ecuación 3.1). La bondad de los ajustes se evaluó mediante el r^2 corregido y el *MSE* asociado a cada uno (Ecuaciones I.4 e I.5).

Adicionalmente, se construyeron histogramas para conocer el número de células intactas, dañadas y muertas en función de las características del tratamiento y de la concentración de estevia.

4.2.5 Estudio de la actividad antimicrobiana de la estevia en la bebida formulada, tras ser sometida a altas presiones hidrostáticas, durante el almacenamiento posprocesado a distintas temperaturas

Muestras de bebida con (2,5 %, p:v) o sin estevia, inoculadas y sometidas a distintos tratamientos (300 MPa, 1 o 3 min), se incubaron a 37 y 10 °C, para estudiar el efecto obtenido al combinar la adición de estevia con el procesado mediante HHP durante el tratamiento y el almacenamiento posterior, a distintas

temperaturas. Para ello se efectuaron recuentos pre- y posprocesado, en TSA sin sal y en TSA con un 5 % (p:v) de sal (Scharlab SL, Barcelona, España), durante un tiempo máximo de 672 h (28 d). A partir de los resultados obtenidos en TSA sin sal se construyeron curvas de inactivación posprocesado. Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.5, las curvas obtenidas se ajustaron a la distribución de frecuencias de Weibull (Ecuación 3.1). La bondad de los ajustes se evaluó en base al r^2 corregido y al MSE de cada uno (Ecuaciones I.4 e I.5).

Además, aprovechando los recuentos en TSA con sal, de acuerdo con lo dicho en el apartado 3.2.6, se construyeron histogramas que permitieron conocer el número de células intactas, dañadas y muertas en función de la intensidad del tratamiento, de la concentración de estevia, de la temperatura y del tiempo incubación posprocesado por HHP. La presión y los tiempos de tratamiento ensayados se fijaron en base a los resultados obtenidos con muestras tratadas no incubadas, descartándose aquellos tratamientos nada o demasiado efectivos y manteniéndose constante el nivel de presión, para facilitar la comparación de los resultados obtenidos.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Cinéticas de inactivación por altas presiones hidrostáticas para Listeria monocytogenes en la bebida formulada con y sin estevia

Partiendo de la inactivación obtenida con distintos tratamientos, en ausencia y presencia de estevia (2,5 %, p:v), se construyeron curvas de supervivencia para *L. monocytogenes* en función de la presión (Figura 4.3).

Las curvas obtenidas se ajustaron a la distribución de frecuencias de Weibull, con un r^2 corregido mínimo de 0,8537 y un MSE máximo de 1,1693.

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros b y n .

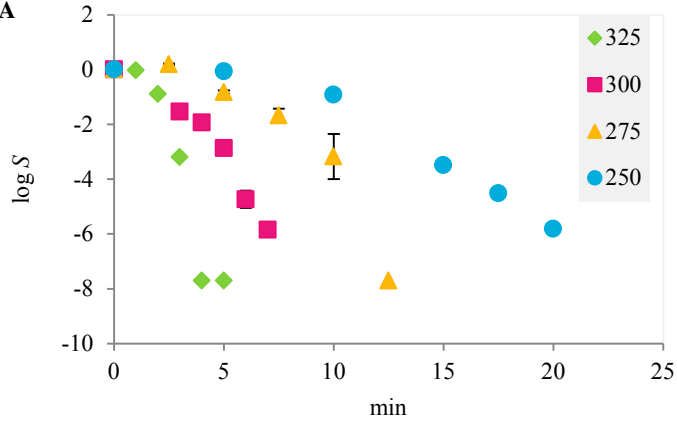
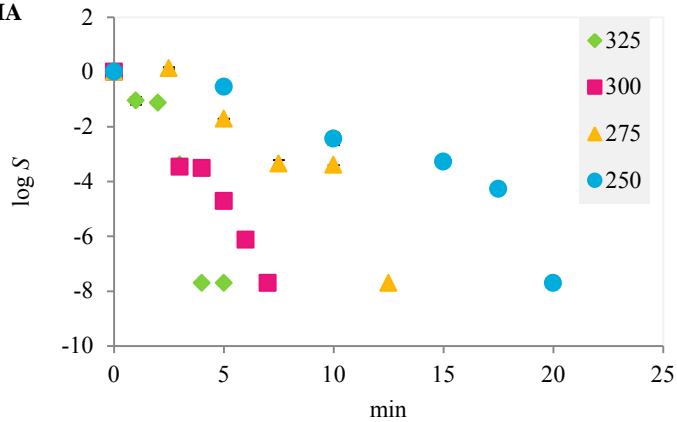
SIN ESTEVIA**CON ESTEVIA**

Figura 4.3 Curvas de supervivencia (S) para *Listeria monocytogenes*, de acuerdo con el nivel de presión (325, 300, 275 y 250 MPa), en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

Según los valores de n , todas las curvas fueron convexas ($n > 1$) (Tabla 4.2); la existencia de un hombro reveló la importancia del tiempo de tratamiento. Por otro lado, según los valores de b , a mayor presión, mayor velocidad de inactivación, con mayor efecto en presencia de estevia (Tabla 4.2). Además, la adición de estevia aumentó la velocidad de inactivación para todos los niveles de presión ensayados (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Valores para los parámetros de la distribución de frecuencias de Weibull (b y n) en función del nivel de presión y de la concentración de estevia.

| Presión MPa | 0 % (p:v) estevia | | 2,5 % (p:v) estevia | |
|----------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | b | n | b | n |
| 250 | 0,11 ± 0,01 | 2,25 ± 0,24 | 0,18 ± 0,03 | 1,28 ± 0,21 |
| 275 | 0,17 ± 0,03 | 2,22 ± 0,34 | 0,28 ± 0,10 | 1,28 ± 0,49 |
| 300 | 0,37 ± 0,01 | 1,85 ± 0,17 | 0,60 ± 0,01 | 1,42 ± 0,02 |
| 325 | 0,48 ± 0,01 | 3,21 ± 0,13 | 0,80 ± 0,25 | 1,55 ± 0,40 |

4.3.2 Inactivación y daño subletal producidos mediante altas presiones hidrostáticas en presencia y ausencia de estevia

El efecto de la presión y el tiempo de tratamiento sobre la inactivación y el daño subletal de *L. monocytogenes* en la bebida formulada se evaluó en ausencia y presencia de estevia (2,5 %, p:v), según el número de células intactas, dañadas y muertas con distintos tratamientos.

Los resultados obtenidos indican que aumentar el nivel de presión (para casi todos los tiempos comparables) o el tiempo (para todos los niveles de presión estudiados) aumentó la proporción de células muertas; suponiendo, en algunas ocasiones, pasar de una inactivación escasa (< 1 ciclo logarítmico) a la inactivación completa del inóculo inicial (\approx 8 ciclos logarítmicos) (Figura 4.4). Dicho aumento en la proporción de células muertas se relacionó con un descenso en la proporción de células intactas, cuando las había, o con un descenso en la proporción de células dañadas, cuando no había intactas (Figura 4.4).

En presencia de células intactas, aumentar el nivel de presión no siempre comportó un aumento en la proporción de las células muertas. No obstante, aumentar el nivel de presión aumentó siempre la proporción de células dañadas (Figura 4.4).

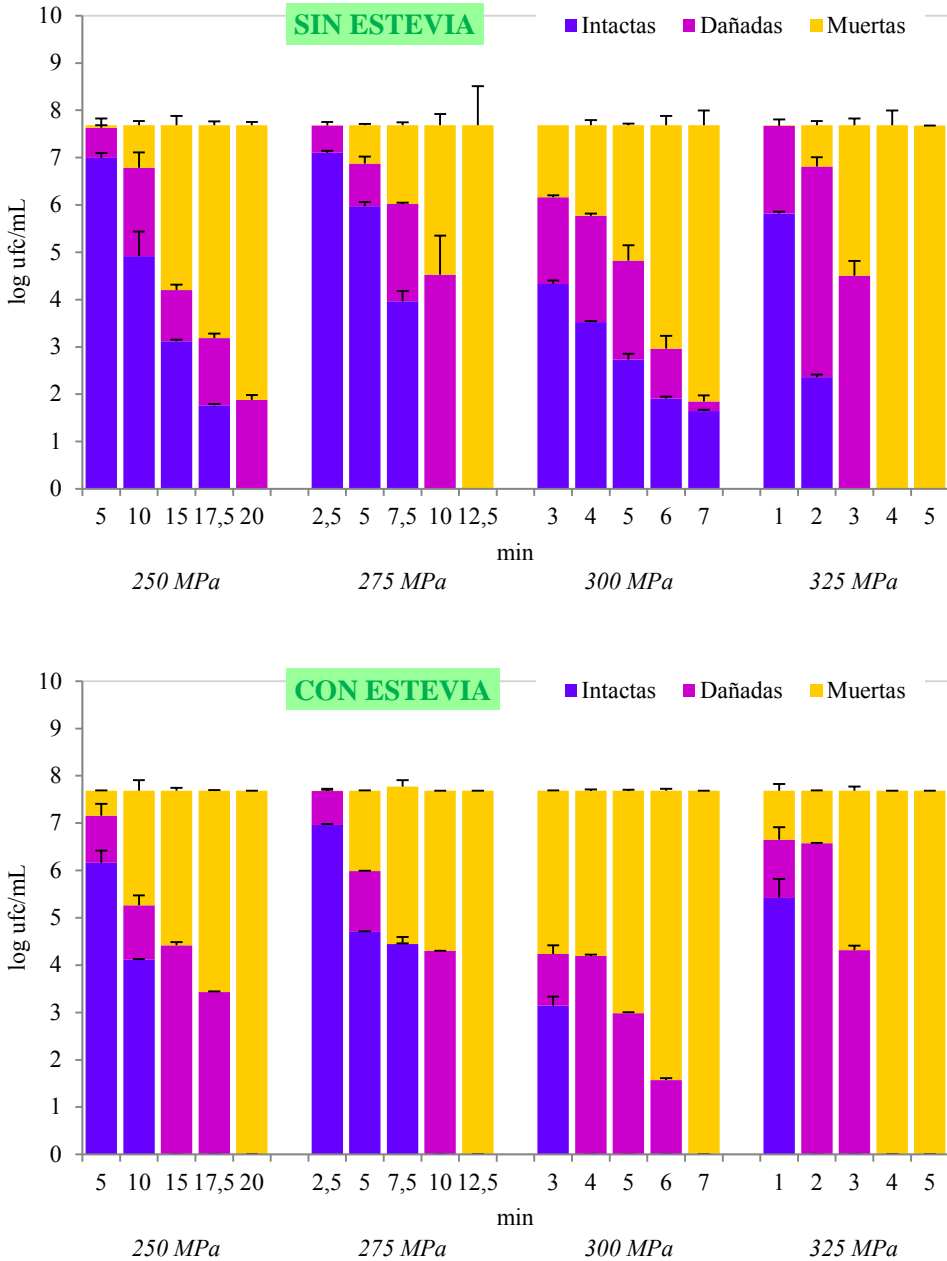


Figura 4.4 Concentración de células intactas, dañadas y muertas en función de la presión (MPa) y del tiempo (min) de tratamiento, en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

En cualquier caso, la adición de estevia potenció el efecto antimicrobiano de las HHP. Para un tratamiento que no acabara con la población de células intactas, en presencia de estevia aumentó la proporción total de muertas y dañadas (Figura 4.4). Este aumento se relacionó con un aumento en la proporción de células muertas, de células dañadas o de células muertas y dañadas, según las condiciones de presión y tiempo, llegando a suponer la no detección de células intactas en algunos casos. De lo contrario, es decir, para un tratamiento que sí que acabara con la población de células intactas, en presencia de estevia disminuyó la proporción de células dañadas y aumentó la proporción de células muertas, lográndose la inactivación completa del inóculo inicial en algunos casos (Figura 4.4).

De acuerdo con los resultados obtenidos, estudiar el daño subletal permitió detectar diferencias entre tratamientos aparentemente idénticos o similares en cuanto al grado de inactivación. En base a la proporción de células muertas no se hubieran detectado diferencias, por ejemplo, entre muestras con y sin estevia sometidas a 325 MPa, 2 min (Figura 4.4). Sin embargo, la cuantificación del daño puso de manifiesto que en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia todas las células viables estaban dañadas, demostrándose que la adición de estevia puede aumentar la eficacia antimicrobiana del procesado por HHP no sólo aumentando la inactivación, sino también aumentando el daño.

4.3.3 Inactivación y daño subletal durante el almacenamiento posprocesado por altas presiones hidrostáticas, a distintas temperaturas, en la bebida con y sin estevia

En vista de los resultados obtenidos en los Capítulos 2 y 3, la estevia podría actuar como una medida de control adicional frente a *L. monocytogenes* durante el almacenamiento y, por tanto, durante la vida útil de alimentos mínimamente procesados. Por otro lado, de acuerdo con los apartados 4.3.1 y 4.3.2, el procesado mediante HHP podría inactivar y producir daño subletal sobre la

población de *L. monocytogenes*, con mejores resultados en presencia de estevia. Teniendo en cuenta estos resultados se evaluó el efecto de la combinación estevia/HHP sobre la inactivación y el daño subletal de *L. monocytogenes* en la bebida formulada, con y sin estevia, según las condiciones de tratamiento y durante el almacenamiento posterior a distintas temperaturas. Las condiciones de tratamiento y almacenamiento consideradas para llevar a cabo este estudio se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Condiciones de tratamiento y almacenamiento consideradas para evaluar el efecto antimicrobiano de la aplicación conjunta de infusión de hojas de estevia y de altas presiones hidrostáticas en la bebida formulada.

| Factor | Unidades | Niveles |
|---------------------------|----------|---------|
| Concentración de estevia | %, p:v | 0; 2,5 |
| Presión de tratamiento | MPa | 300 |
| Tiempo de tratamiento | min | 1; 3 |
| Temperatura de incubación | °C | 37; 10 |

Según el procedimiento descrito en el apartado 4.2.5, en primer lugar se evaluó el efecto de la estrategia combinada sobre la inactivación de *L. monocytogenes*. Para ello, los recuentos obtenidos en TSA sin sal se ajustaron a la distribución de frecuencias de Weibull, con un r^2 corregido mínimo de 0,9524 y un MSE máximo de 0,7154. Los resultados obtenidos para los parámetros b y n de la distribución de frecuencias de Weibull se muestran en la Tabla 4.4.

Los valores de n revelan que se obtuvieron curvas de supervivencia cóncavas para la mayoría de combinaciones ensayadas ($n > 1$; Tabla 4.4). Este tipo de curvas ponen de manifiesto que la inactivación comenzó sin un periodo de latencia, con una caída rápida al inicio, que después fue menos pronunciada. En referencia a esto, puede que durante el almacenamiento desaparecieran primero las células más sensibles y luego las más resistentes a los estreses aplicados. De

acuerdo con los resultados obtenidos, sólo para la combinación de factores más intensa (300 MPa, 3 min, 10 °C, 2,5 % p:v) se observó una pauta de inactivación distinta, obteniéndose una curva convexa, con un periodo inicial de latencia, sin cambios aparentes en la concentración de células viables (Tabla 4.4).

Por otro lado, considerando los valores de b y teniendo en cuenta que este parámetro está inversamente relacionado con el tiempo transcurrido hasta que ocurre la primera reducción decimal y directamente relacionado con la velocidad de inactivación, aumentar el tiempo de tratamiento por HHP, la temperatura de almacenamiento posprocesado o la concentración de estevia supuso acelerar la inactivación de *L. monocytogenes* en la bebida formulada (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 Valores para los parámetros de la distribución de frecuencias de Weibull (b y n) en función de la presión y el tiempo de tratamiento por altas presiones hidrostáticas, de la temperatura de almacenamiento posprocesado y de la concentración de estevia, para *Listeria monocytogenes*, en la bebida formulada.

| Tratamiento (MPa, min) | Temperatura (°C) | Estevia (%, p:v) | b | n |
|---------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 300, 1 | 37 | 0 | $0,93 \pm 0,06$ | $0,53 \pm 0,05$ |
| | | 2,5 | $5,45 \pm 0,74$ | $0,37 \pm 0,14$ |
| | 10 | 0 | $0,01 \pm 0,00^a$ | $0,80 \pm 0,08$ |
| | | 2,5 | $0,06 \pm 0,01$ | $0,46 \pm 0,01$ |
| 300, 3 | 37 | 0 | $15,81 \pm 1,35$ | $0,29 \pm 0,00^b$ |
| | | 2,5 | $26,57 \pm 4,20$ | $0,24 \pm 0,01$ |
| | 10 | 0 | $0,40 \pm 0,04$ | $0,41 \pm 0,06$ |
| | | 2,5 | $0,91 \pm 0,10$ | $1,18 \pm 0,09$ |

^a $0,011 \pm 0,002$; ^b $0,289 \pm 0,003$

Además, aprovechando los recuentos obtenidos en TSA con sal, se evaluó el daño subletal y la evolución de las células intactas, dañadas y muertas en la bebida con y sin estevia, tratada y almacenada a distintas temperaturas. A modo de ejemplo, los resultados obtenidos a 37 °C se muestran en las Figuras 4.5 y 4.6.

En vista de los recuentos obtenidos justo antes y después de cada tratamiento, el procesado por HHP provocó daño y muerte (Figuras 4.5 y 4.6). De acuerdo con los resultados del apartado 4.3.2, la proporción total de células muertas y dañadas aumentó con el tiempo de tratamiento y en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia (Figuras 4.5 y 4.6).

Además, durante el almacenamiento posprocesado a 37 y 10 °C, la proporción total de células muertas y dañadas siguió aumentando, hasta la no detección de células intactas (Figuras 4.5 y 4.6). A partir de ese momento, la proporción de células dañadas disminuyó hasta la inactivación completa del inóculo inicial y sin detectarse la reaparición de células intactas. De acuerdo con lo dicho en el apartado 3.3.2, estas observaciones apoyarían la hipótesis de que “dañada” es un estadio intermedio entre “intacta” y “muerta”, para la bebida formulada, en las condiciones de ensayo. Por consiguiente, el daño producido con el procesado por HHP o en presencia de estevia se consideró ventajoso.

Con independencia del tiempo de almacenamiento, aumentar el tiempo de tratamiento, la concentración de estevia o la temperatura de incubación redujo la proporción de células intactas, cuando las había (Figuras 4.5 y 4.6). Ello implica que todos estos factores aumentaron la proporción total de células muertas y dañadas, lo que se tradujo en una reducción del tiempo necesario hasta la no detección de células intactas. Además, aumentar el tiempo de tratamiento, la temperatura de incubación o la concentración de estevia redujo el tiempo necesario para la inactivación completa del inóculo inicial.

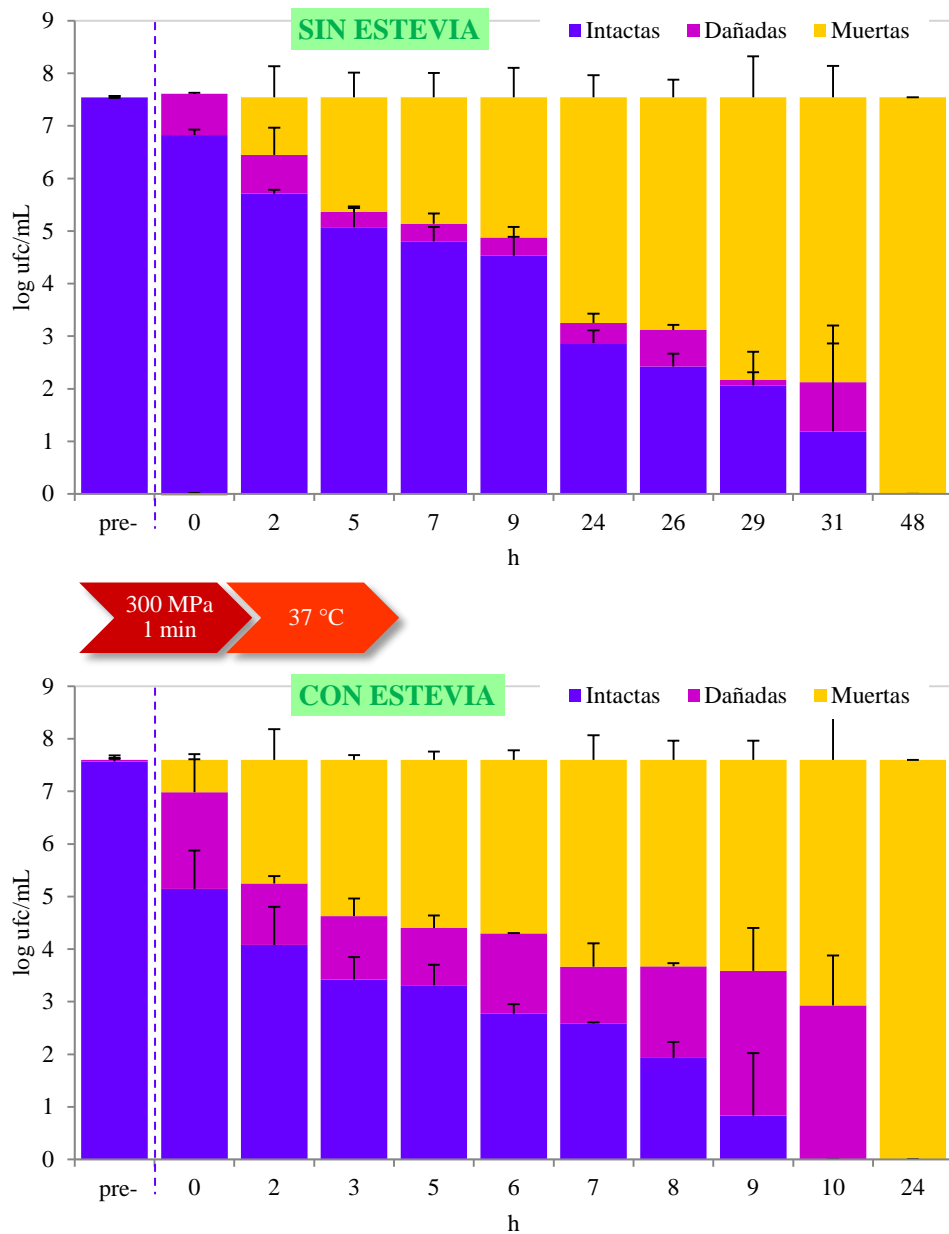


Figura 4.5 Células intactas, dañadas y muertas pre- y posprocesado por altas presiones hidrostáticas (300 MPa, 1 min), en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta. Temperatura de incubación posprocesado: 37 °C. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

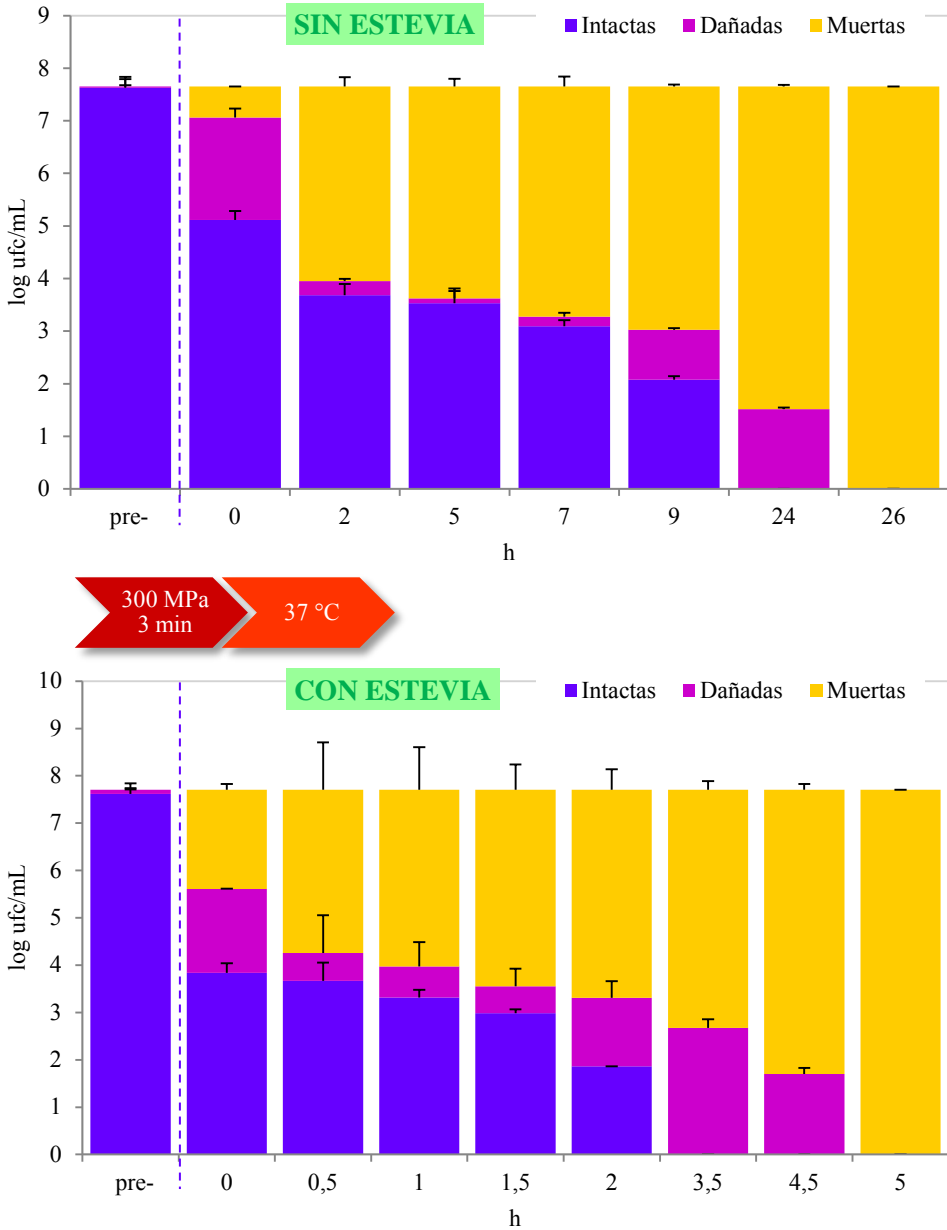


Figura 4.6 Células intactas, dañadas y muertas pre- y posprocesado por altas presiones hidrostáticas (300 MPa, 3 min), en la bebida sin estevia y con un 2,5 % (p:v) de ésta. Temperatura de incubación posprocesado: 37 °C. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios obtenidos.

4.4 Conclusión

El tratamiento por HHP redujo la presencia de *L. monocytogenes* en la bebida formulada con y sin estevia. Algunos de los tratamientos fueron capaces de inactivar más de 5 ciclos logarítmicos, cumpliendo así con los requerimientos de la FDA (2016). La adición de un 2,5 % (p:v) de estevia incrementó la eficacia de las HHP aumentando la proporción total de células muertas y dañadas, o bien reduciendo la proporción de células dañadas cuando no había intactas, logrando respectivamente para algunas combinaciones de presión y tiempo, (i) que todas las células viables postratamiento estuvieran dañadas, o bien (ii) que tuviera lugar la inactivación completa del inóculo inicial.

Durante la incubación de muestras sometidas a HHP, aumentar el tiempo de tratamiento o la concentración de estevia aceleró la inactivación durante el almacenamiento, aumentando la proporción de daño y muerte por hora hasta la no detección de células intactas, y disminuyendo el tiempo transcurrido hasta la no detección de células viables. De este modo, se demostró, además, que el procesado por HHP tiene consecuencias sobre la velocidad de inactivación durante el almacenamiento.

En definitiva, combinar la adición de estevia con la aplicación de HHP podría resultar conveniente para mejorar y garantizar la seguridad microbiológica de bebida vegetales mínimamente procesadas.

5

Optimización de los factores implicados en la conservación de alimentos combinando la adición de estevia con la aplicación de altas presiones hidrostáticas

5.1 Introducción

Optimizar las estrategias empleadas para la conservación de los alimentos resulta necesario con objeto de garantizar inocuidad y la mayor retención de propiedades sensoriales, nutricionales y funcionales. Para lograr un procesado óptimo y mínimo resulta esencial que la concentración de los conservantes escogidos y la intensidad de los tratamientos aplicados estén apropiadamente administradas.

De acuerdo con la Real Academia Española (RAE), optimizar significa “buscar la mejor manera de realizar una actividad” (RAE, 2014). En el contexto que nos ocupa, una definición más formal sería la de encontrar, de forma eficiente y sistemática, la mejor solución del conjunto de posibles para maximizar o minimizar aspectos relacionados con la obtención de alimentos mínimamente procesados, que cumplan con los requerimientos del consumidor (Banga *et al.*, 2003). En este sentido, es importante establecer cuáles son las variables de decisión, parámetros o factores de procesado, cuáles son las funciones objetivo o respuestas y qué resultado es el más conveniente.

En el área de ciencia y tecnología de los alimentos, la metodología más utilizada para la optimización de cualquier proceso es la RSM (Banga *et al.*, 2003; Parsayee *et al.*, 2013). El éxito de esta aproximación, desarrollada a mediados del s. XX (Box y Wilson, 1951; Box y Draper, 1959), se debe a que permite investigar condiciones óptimas en sistemas multivariantes (Jia *et al.*, 2013),

cuando se considera el efecto simultáneo de dos o más factores, sobre una o más variables de interés, efectuando un número mínimo de ensayos.

Así, conforme a lo expuesto, se optimizó el procesado por HHP en presencia de estevia, teniendo en cuenta que la combinación puede aumentar la actividad antimicrobiana de ambos métodos (Capítulo 4) y dado su potencial (por separado) para reducir o inhibir la actividad enzimática, manteniendo o mejorando el perfil nutricional y funcional de los alimentos frescos (Shinagawa *et al.*, 2013; Criado *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2014).

Utilizando la RSM se investigó el efecto de la concentración de estevia, el nivel de presión y el tiempo de tratamiento por HHP sobre (i) la concentración de *L. monocytogenes*, (ii) la actividades enzimáticas PPO y POD, (iii) el TPC y (iv) la TAC de un extracto obtenido a partir de zumo de mango, naranja y papaya, para determinar qué combinación de factores resulta óptima para poder obtener un producto microbiológicamente seguro, enzimáticamente estable y rico en compuestos antioxidantes.

Las actividades PPO y POD se escogieron considerando que son responsables del pardeamiento enzimático que ocurre durante la manipulación, el procesado y el almacenamiento de alimentos vegetales frescos, por formación de pigmentos oscuros que alteran el sabor y el color de los mismos (Tomás-Barberán y Espín, 2001; Köksal y Gülçin, 2008; Chakraborty *et al.*, 2014).

5.2 Material y métodos

5.2.1 Preparación del cultivo microbiano

A partir de un cultivo puro liofilizado se preparó un conjunto de 50 viales conteniendo *L. monocytogenes* CECT 4032, en fase estacionaria, con una concentración celular promedio de $7,23 \times 10^9 \pm 8,13 \times 10^8$ ufc/mL. Con este

objetivo siguió el procedimiento descrito en el subapartado *Preparación del cultivo microbiano* del apartado 2.1.2.

5.2.2 Obtención del extracto enzimático

La obtención de un extracto con actividades PPO y POD procedentes de zumo de mango (*M. indica* L.), naranja (*C. ×sinensis* (L.) Osbeck ‘Salustiana’) y papaya (*P. carica* L.) se efectuó a 4 °C, empleando tampón fosfato sódico (0,05 M, pH 7), conteniendo cloruro sódico 1 M (Scharlab SL, Barcelona, España) y un 5 % (p:v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP; Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.).

Partiendo de fruta madura, después de lavarla, pelarla y trocearla en ausencia de huesos y pepitas, el extracto se obtuvo para cada repetición de cada ensayo. El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Obtención de una mezcla de pulpas con un 20 % (p:p) de mango, un 15 % (p:p) de naranja y un 65 % (p:p) de papaya (respetando las proporciones establecidas en la bebida desarrollada para cuantificar el efecto antimicrobiano de la estevia y las HHP; Capítulos 3 y 4).
2. Preparación del tampón de extracción a partir de fosfato sódico monobásico 2-hidrato (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.), fosfato sódico dibásico anhidro (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.), agua destilada, cloruro sódico y PVPP.
3. Triturado de la mezcla de pulpas, a 4 °C y en presencia del tampón de extracción (en proporción 1:1, p:v).
4. Filtración manual del homogeneizado, a 4 °C, empleando tela de lino.

5. Centrifugación del producto filtrado a $20\ 252,92 \times g$, durante 30 min, a 4 °C.
6. Recuperación del sobrenadante.

5.2.3 Preparación de muestras de extracto con distintas concentraciones de estevia

Según el procedimiento descrito en el subapartado *Procedimiento experimental* del apartado 2.2.2, se preparó un solución madre de infusión de hojas de estevia (*S. rebaudiana* Bertoni) al 8,33 % (p:v), utilizando hojas secas suministradas por la empresa Anagálide SA (Huesca, España).

Para cada ensayo se prepararon muestras con distintas concentraciones de estevia (1,25 y 2,50 %, p:v), añadiendo 3 o 6 mL de infusión a 14 mL de extracto enzimático recién obtenido. En las muestras con 3 mL de infusión, se enrasó con agua embotellada para un volumen final homogéneo de 20 mL. Además, se prepararon muestras sin estevia, con 14 mL de extracto y 6 mL de agua embotellada.

Con el fin de cuantificar la inactivación microbiana lograda al combinar la adición de estevia con el procesado por HHP, muestras de extracto con y sin estevia se inocularon con *L. monocytogenes* ($\approx 1 \times 10^8$ ufc/mL). Para llevar a cabo esta parte del estudio, según lo dicho en el apartado 3.2.3, la infusión de estevia se añadió al extracto en condiciones de asepsia, tras esterilizarse por doble filtración, mediante filtros de jeringa estériles de 0,45 y 0,22 μm (Minisart, Sartorius SA, Madrid, España).

5.2.4 Tratamiento de las muestras mediante altas presiones hidrostáticas

Muestras con y sin estevia, inoculadas o no, se dispusieron en bolsas que se termosellaron y sometieron a 300, 400 y 500 MPa, durante 5, 10 o 15 min, a

temperatura ambiente (22 °C), según el procedimiento descrito en el apartado 4.2.3.

Para garantizar la reproducibilidad de resultados, cada ensayo se repitió al menos 2 veces.

5.2.5 Estudio de la inactivación microbiana

La densidad celular de muestras con y sin estevia (log ufc/mL), se determinó justo antes y después de cada tratamiento, por recuento de viables en TSA (Scharlab SL, Barcelona, España).

A partir de los recuentos obtenidos, la inactivación asociada a cada uno de los tratamientos ensayados se estableció de acuerdo a la diferencia existente entre los recuentos pre- y posprocesado (log ufc/mL), tomándose 2 alícuotas de cada muestra y sembrándose en masa 2 placas de cada dilución, en TSA (Scharlab SL, Barcelona, España). De este modo, cada recuento se obtuvo a partir de un total de 4 placas, incubadas a 37 °C, durante 48 h.

5.2.6 Determinación de las actividades enzimáticas polifenoloxidasas y peroxidasa

La determinación cuantitativa de las actividades PPO y POD se llevó a cabo por espectrofotometría, a 25 °C, utilizando sustratos incoloros específicos para cada enzima, que se transforman en compuestos coloreados por acción de las mismas (Figuras 5.1-5.2). Para ello se usó un espectrofotómetro PG-1800 de la empresa Labolan SL (Navarra, España).

Según la reacción que se muestra en la Figura 5.1 y de acuerdo con Giner *et al.* (2001), la actividad PPO se cuantificó en base al incremento de absorbancia observado, a 410 nm, después de añadir 1,95 mL de pirocatecol (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.), en tampón fosfato sódico (0,05 M, pH 7), a 100 µL de extracto enzimático.

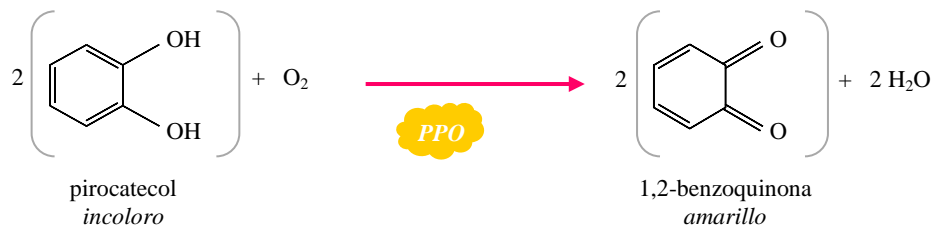


Figura 5.1 Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la actividad polifenoloxidasas (PPO).

Por otro lado, según la reacción que se muestra en la Figura 5.2 y de acuerdo con Rodrigo *et al.* (1996), la actividad POD se determinó a 470 nm, mezclando 2,39 mL de solución enzimática y 0,61 mL de solución reactiva. La disolución enzimática se preparó a partir de 0,2 mL de extracto enzimático y 3,8 mL de tampón fosfato sódico (0,05 M, pH 7). Por su parte, la mezcla reactiva se preparó con guayacol (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.), peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.) y agua bidestilada, de modo tal que en la mezcla final (con disolución enzimática y disolución reactiva) la concentración de guayacol y peróxido de hidrógeno fue 0,45 y 0,36 M, respectivamente.

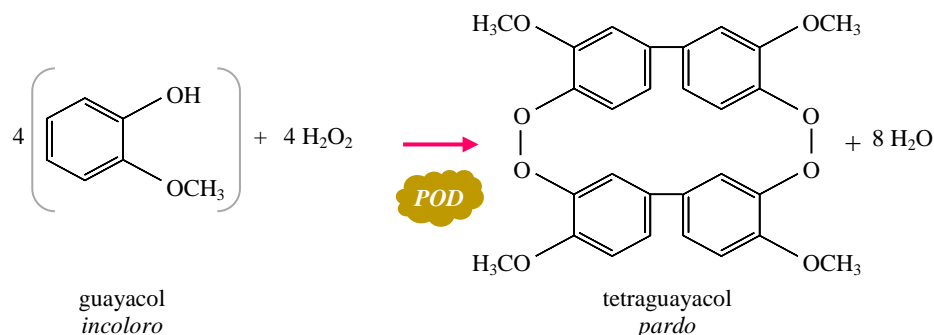


Figura 5.2 Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la actividad peroxidasa (POD).

La absorbancia de muestras con y sin estevia se midió inmediatamente antes y después de aplicar los tratamientos ensayados, por triplicado, durante 2,5 min, a intervalos de 1 s.

Las actividades PPO y POD se calcularon a partir del valor de la pendiente del tramo lineal de la curva obtenida al representar los valores de absorbancia registrados en función del tiempo, para cada muestra. Con este objetivo, una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para aumentar la absorbancia de las muestras en 1 unidad por minuto y mililitro de extracto.

La influencia de las condiciones de tratamiento y de la concentración de estevia se determinó en base al porcentaje de actividad relativa (*RA*, por sus siglas en inglés), calculada según la Ecuación 5.1,

$$\% RA = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

donde *A* y *A*₀ representan la actividad PPO o POD de muestras tratadas y sin tratar, respectivamente.

5.2.7 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos

El TPC del extracto enzimático estudiado se determinó por espectrofotometría, en presencia y ausencia de estevia, antes y después de someterlo a distintos tratamientos de HHP.

Para ello se siguió el protocolo descrito por Georgé *et al.* (2005), con algunas modificaciones, y se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania); una mezcla de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico, que en presencia de compuestos fenólicos y carbonato sódico, a pH básico, se reducen pasando de color amarillo a azul, con una intensidad que varía según el TPC de las muestras (Figura 5.3).

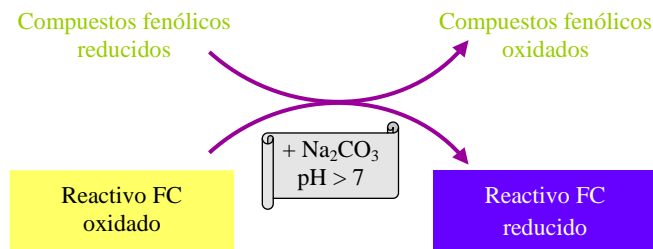


Figura 5.3 Fundamentos básicos del método empleado para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu (FC), que pasa de amarillo a azul cuando se reduce.

Brevemente, se prepararon mezclas con 10 mL de extracto y 50 mL de acetona (Panreac Química SLU, Barcelona, España) al 30 % (v:v) en agua destilada. Para tener muestras sin agentes reductores hidrosolubles (en cuya presencia se hubiera sobreestimado el TPC), la mezcla extracto-acetona (2 mL) se purificó con cartuchos de extracción en fase sólida (Oasis, Waters Corp., Massachusetts, EE. UU.) y agua destilada (2×2 mL). Además, el extracto lavado (3 mL) se mantuvo a $85\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h. En presencia y ausencia de estevia, antes y después de cada tratamiento, la determinación del TPC se efectuó en base a la absorbancia de las muestras, teniendo en cuenta la absorbancia de disoluciones estándar de ácido gálico (0-1000 ppm; UCB SA, Bruselas, Bélgica). Para ello se mezclaron: 100 μL de muestra o estándar, 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y 3 mL de carbonato sódico (Scharlab SL, Barcelona, España) al 2 % (p:v) en agua destilada. Tras 1 h en oscuridad, la absorbancia de las muestras y los estándares se midió por triplicado, a 765 nm, en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 2 (Bodenseewerk PerkinElmer & Co. GmbH, Überlingen, Alemania). Con los valores de las disoluciones estándar se construyó una recta de calibración y el TPC de las muestras se determinó interpolando en la recta. Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto, considerando el factor de dilución de las muestras diluidas.

5.2.8 Determinación de la actividad antioxidante total

La TAC de extractos con y sin estevia, se determinó pre- y posprocesado por HHP, utilizando dos de las metodologías desarrolladas para ello.

- a) Método para la determinar la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) utilizando ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS)

Este ensayo se basa en la transferencia de electrones y evalúa la capacidad de las muestras para captar el radical monocatiónico del ABTS ($ABTS^{\bullet+}$), a través de la decoloración que se asocia a la reducción del radical en presencia de compuestos antioxidantes (Figura 5.4).

Fórmula química del $ABTS^{\bullet+}$:

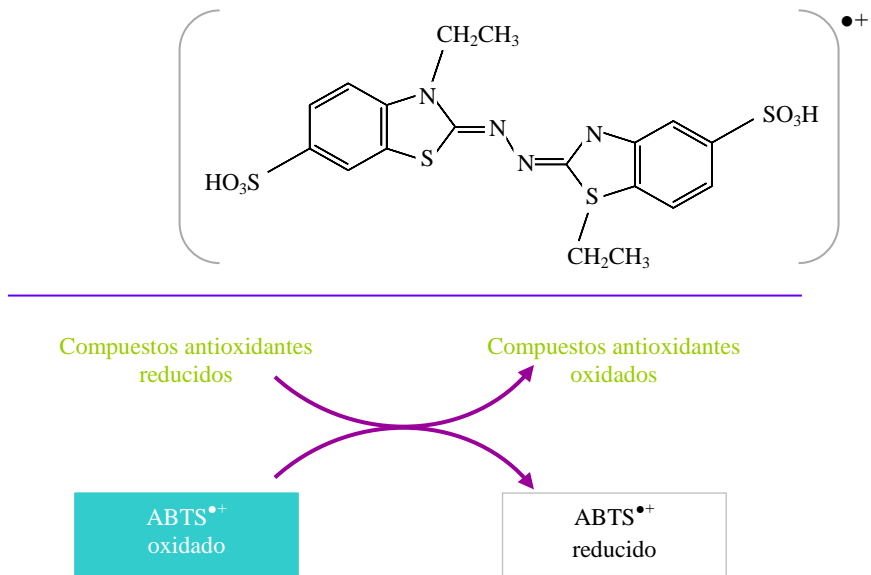


Figura 5.4 Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox, usando una solución con radical monocatiónico del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$), que pasa de color verde-azulado a incoloro.

Con objeto de medir la TAC del extracto enzimático con y sin estevia, antes y después de someterlo a HHP, primero se preparó una disolución conteniendo ABTS^{•+}. De acuerdo Re *et al.* (1999) y Zulueta *et al.* (2009), se emplearon 25 mL de disolución ABTS 7 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.) y 440 µL de disolución persulfato potásico 140 mM (Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.). La mezcla ácido-oxidante se mantuvo en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 16 h, para garantizar la formación del radical por oxidación del ácido. Transcurrido ese tiempo, la solución ABTS^{•+} se diluyó con etanol (J.T.Baker, Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Holanda), hasta lograr una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. La absorbancia del extracto enzimático, con y sin estevia, antes y después de someterlo a HHP se determinó por triplicado. De acuerdo con Zulueta *et al.* (2009), para ello se mezclaron 2 mL de ABTS^{•+} y 100 µL de muestra diluida en agua destilada, hasta lograr entre un 20 y un 80 % de inhibición del radical, comparando el valor de absorbancia obtenido a tiempo 0 y tras 20 min de reacción, con el fin de obtener resultados fiables. Las medidas de absorbancia se efectuaron con un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 2. Los resultados de inhibición se expresaron en milimoles equivalentes de Trolox por litro de extracto, usando una recta de calibración, obtenida según el protocolo que se ha descrito, pero usando disoluciones estándar de Trolox (0-250 µM; Sigma-Aldrich Co. LLC, Missouri, EE. UU.), en lugar de distintas muestras de extracto, y teniendo en cuenta el factor de dilución para el caso de muestras diluidas.

- b) Método para la determinar la capacidad antioxidante en base a la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas inglés) empleando fluoresceína (FL)

Este método se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno y se desarrolló para evaluar la TAC de muestras biológicas (Cao *et al.*, 1993) según su capacidad para neutralizar radicales peroxilo (ROO[•]), que se generan mediante

la descomposición térmica del 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) diclorhidrato (AAPH), a 37 °C. Concretamente, el método evalúa la oxidación completa de determinados sustratos, teniendo en cuenta que los compuestos antioxidantes evitan la acumulación de radicales libres y, por lo tanto, la oxidación de sustratos oxidables. En este caso, el sustrato empleado fue la FL, aprovechando que la forma oxidada no es fluorescente (Ou *et al.*, 2001) (Figura 5.5).

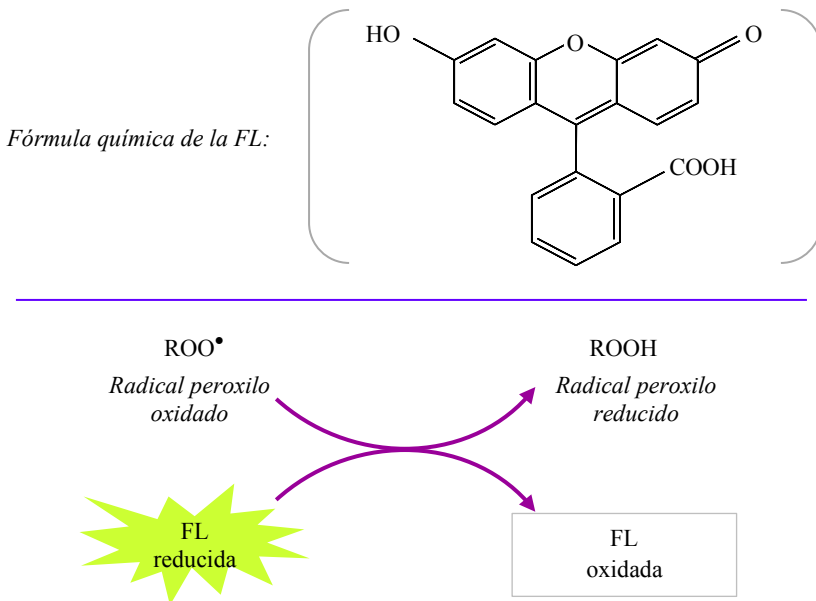


Figura 5.5 Fundamentos básicos del método empleado para la determinación de la capacidad antioxidante en base a la capacidad de absorción de radicales de oxígeno, utilizando fluoresceína (FL), cuya forma oxidada no es fluorescente.

De acuerdo con Zulueta *et al.* (2009), la mezcla de reacción contenía:

- ✓ 50 μL de FL (78 nM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) en tampón fosfato (75 mM, pH 7);
- ✓ 50 μL de muestra en tampón fosfato (75 mM, pH 7) o de Trolox (20 μM) en tampón fosfato (75 mM, pH 7), y

- ✓ 25 µL de solución AAPH (221 mM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) en tampón fosfato (75 mM, pH 7).

Para ello se emplearon placas multipocillo blancas, de fondo plano (Sero-Wel 96 well plates, Bibby Sterilin Ltd, Reino Unido) y un fluorímetro automático (Wallac 1420 VICTOR2, PerkinElmer Inc., Massachusetts, EE. UU.), con filtros de fluorescencia para una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente.

Antes de incorporar el AAPH, las placas se incubaron a 37 °C, 15 min. La fluorescencia de las muestras se midió justo después de adicionar AAPH, y cada 5 min, hasta que la intensidad observada fue inferior al 5 % del valor de lectura inicial. La TAC de las muestras estudiadas se determinó en base el área que queda bajo la curva de caída de la fluorescencia, considerándose estándar la TAC del Trolox y sabiendo que el área observada en presencia de antioxidantes será mayor que el área observada en ausencia de éstos. Con los resultados obtenidos se calcularon los valores de ORAC aplicando la Ecuación 5.2,

$$ORAC = \frac{C_{Trolox} \times (AUC_{muestra} - AUC_{blanco})}{(AUC_{Trolox} - AUC_{blanco})} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

donde C_{Trolox} (mM) representa la concentración milimolar de Trolox considerada en este estudio (0,02 mM), y AUC , el área bajo la curva de decaimiento de la fluorescencia obtenida (i) con extracto (“muestra”), (ii) tampón (“blanco”), o (iii) Trolox, tras calcularse su valor de acuerdo con la Ecuación 5.3,

$$AUC = \left(0,5 + \frac{f_5}{f_0} + \frac{f_{10}}{f_0} + \dots + \frac{f_{n+5}}{f_0} \right) \times 5 \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

donde f_0 y f_n representan la fluorescencia inicial y la fluorescencia a tiempo n , respectivamente.

Los resultados obtenidos se expresaron en milimoles equivalentes de Trolox por litro de extracto, teniendo en cuenta el factor de dilución de las muestras diluidas.

5.2.9 Diseño experimental, análisis de resultados y optimización empleando la metodología de superficies de respuesta

La RSM se empleó para investigar el efecto simultáneo de la concentración de estevia, el nivel de presión y el tiempo tratamiento por HHP sobre la calidad microbiológica, la estabilidad enzimática y la capacidad antioxidante de un extracto obtenido a partir de mango, naranja y papaya. Más concretamente, se evaluó (i) la inactivación de *L. monocytogenes*, (ii) la inhibición de las actividades PPO y POD, (iii) el TPC del extracto enzimático estudiado y (iv) la TAC de éste.

Empleando un diseño central compuesto con centros en las caras⁴ (Figura 5.6), se definió una matriz experimental compuesta por 16 experimentos (Tabla 5.1), que permitió ensayar distintas combinaciones de concentración, presión y tiempo, tras fijarse un nivel máximo, mínimo y central para cada factor. Los niveles considerados fueron los siguientes:

0; 1,25 y 2,5 % (p:v) para la concentración de estevia; 300, 400 y 500 MPa para el nivel de presión, y 5, 10 y 15 min para el tiempo de tratamiento.

Los valores máximos y mínimos para cada factor se establecieron considerando el poder edulcorante de las hojas de estevia, la cantidad máxima de éstas que se admite en la formulación de distintos alimentos (Savita *et al.*, 2004) y las características del equipo disponible para el procesado por HHP (apartado 4.2.3).

⁴ El diseño central compuesto consta de un diseño factorial 2^k , completo o fraccionado, con $2k$ puntos axiales y n puntos centrales, siendo k el número de factores considerados en el estudio. En el caso concreto del diseño central compuesto con centros en las caras, la distancia entre el punto central y los puntos axiales es igual a 1 (Montgomery, 1991).

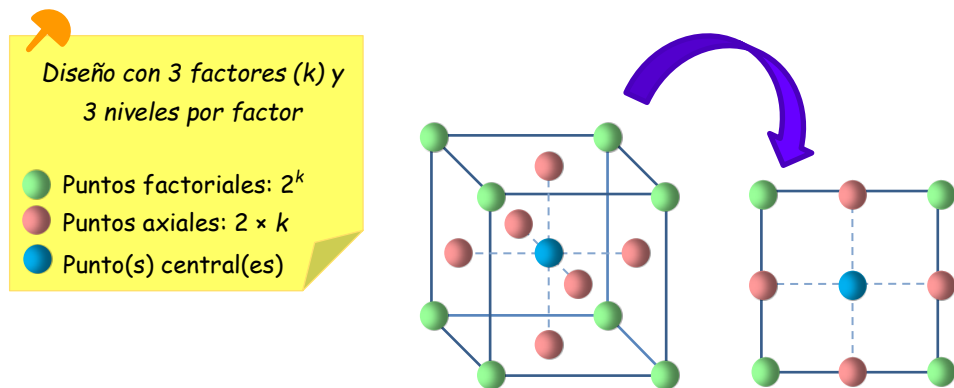


Figura 5.6 Diseño central compuesto con centros en las caras (Basado en: Montgomery, 2004).

Tabla 5.1 Diseño experimental.

| Combinación | Presión | Tiempo | Estevia |
|-------------|---------|--------|---------|
| | MPa | min | % (p.v) |
| 1 | 500 | 15 | 0 |
| 2 | 400 | 15 | 1,25 |
| 3 | 500 | 5 | 2,50 |
| 4 | 500 | 15 | 2,50 |
| 5 | 300 | 10 | 1,25 |
| 6 | 400 | 5 | 1,25 |
| 7* | 400 | 10 | 1,25 |
| 8 | 400 | 10 | 0 |
| 9 | 300 | 5 | 2,50 |
| 10 | 400 | 10 | 2,50 |
| 11 | 500 | 5 | 0 |
| 12 | 300 | 5 | 0 |
| 13 | 300 | 15 | 0 |
| 14 | 300 | 15 | 2,50 |
| 15 | 500 | 10 | 1,25 |
| 16* | 400 | 10 | 1,25 |

* Punto central.

El diseño experimental, el análisis de resultados y la optimización se realizaron con ayuda del programa Statgraphics Centurion XV.II, versión 11 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, EE. UU.).

El diseño se planteó con 2 puntos centrales para estimar el error experimental y reducir la varianza de las estimaciones. Además, el diseño se aplicó 2 veces para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. El orden de ejecución de las 16 combinaciones que se muestran en la Tabla 5.1 se estableció al azar, para cada repetición por separado.

Los resultados obtenidos experimentalmente se aprovecharon para describir la relación existente entre los factores estudiados y las respuestas PPO, POD, TPC, TEAC y ORAC. La descripción se efectuó ajustando los datos a un polinomio de segundo orden (Ecuación 5.4),

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{j=2}^k \sum_{i < j}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

donde y representa la repuesta predicha (PPO, POD, TPC, TEAC u ORAC); k , el número de factores de los que depende la respuesta; x_i y x_j , distintos factores (concentración de estevia, presión y tiempo); β_0 , el término independiente; β_i , el coeficiente de regresión para los términos lineales; β_{ii} , el coeficiente de regresión para los términos cuadráticos; β_{ij} , el coeficiente de regresión para los términos de interacción, y ε , el error aleatorio asociado.

El ajuste se efectuó por regresión lineal múltiple, usando el método de mínimos cuadrados. Los términos no estadísticamente significativos ($p_{valor} > 0,05$) se eliminaron del polinomio tras un análisis de la varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés). Aprovechando las ecuaciones obtenidas, la optimización de la estrategia combinada estevia/HHP se efectuó en base al valor de una función de

deseabilidad global, teniendo en cuenta los criterios de optimización, que, en concreto, eran los siguientes:

- ✓ Minimizar la actividad enzimática PPO y POD, y
- ✓ Maximizar el TPC y la TAC del extracto estudiado.

La función de deseabilidad global incluye deseabilidades individuales para cada respuesta y permite determinar qué combinación de factores es la adecuada para alcanzar un valor óptimo para todas las respuestas consideradas (Vera *et al.*, 2014). Con este objetivo, en la optimización se fijaron distintos puntos de partida, considerando todas las posibilidades que ofrecía el programa empleado; en concreto: el centro de la región experimental, el mejor punto del diseño, todos los puntos del diseño, el mejor vértice y todos los vértices.

Los recuentos microbianos se utilizaron para validar la combinación óptima, de acuerdo con la legislación vigente.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Estudio del efecto de la estevia y de las altas presiones hidrostáticas sobre la inactivación microbiana, la actividad enzimática, el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante total del extracto estudiado

En vista de los resultados obtenidos, el procesado por HHP resultó adecuado para reducir la concentración de *L. monocytogenes* en la matriz desarrollada. Todas las combinaciones de presión y tiempo ensayadas resultaron capaces de lograr la inactivación parcial o total del inóculo de partida, con mejores resultados al aumentar el nivel de presión, el tiempo de tratamiento y la concentración de estevia (Tabla 5.2). En cualquier caso, el grado de inactivación obtenido al aplicar 300 MPa durante 15 min y 400 o 500 MPa durante 5, 10 o 15 min fue siempre superior a 5 ciclos logarítmicos, siendo este valor la

reducción mínima exigida para las estrategias destinadas a garantizar la seguridad microbiológica de zumos mínimamente procesados o productos similares (FDA, 2016).

Por otro lado, el procesado por HHP redujo la actividad enzimática del extracto estudiado. La actividad PPO y POD de las muestras sin estevia no tratadas fue de $7,42 \pm 1,30$ y $2,07 \pm 0,69$ Δ abs/min/mL de extracto. La reducción observada dependió de la presión (Tabla 5.2).

En general, la actividad POD resultó más resistente que la PPO al procesado en ausencia de estevia. La diferencia observada a 500 MPa fue mayor que la observada a 300 y 400 MPa. En cualquier caso, no se logró la inhibición completa de ningún enzima, siendo $2,56 \pm 0,21$ y $15,66 \pm 0,71$ % los valores más bajos obtenidos para la RA PPO y POD, respectivamente.

La efectividad del procesado mediante HHP para la inactivación de enzimas depende del propio enzima, del nivel de presión, del tiempo de tratamiento, de la temperatura, del pH y de la composición del medio (Hendrickx *et al.*, 1998; Chakraborty *et al.*, 2014). No obstante, la resistencia de los enzimas es bien conocida y se postula como uno de los inconvenientes que se asocia a la aplicación de HHP para alargar la vida útil de los alimentos mínimamente procesados.

En la bibliografía hay trabajos que demuestran que los enzimas PPO y POD son altamente resistentes a la presión (Quaglia *et al.*, 1996; Garcia-Palazon *et al.*, 2004; González-Cebrino *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2014). En consecuencia, muchos autores proponen la aplicación de HHP junto la adición de inhibidores enzimáticos. En este sentido, la adición de estevia logró mejorar el nivel de inactivación enzimática por presión. La adición un 2,5 % (p:v) de estevia supuso no detectar actividad POD posprocesado, cualesquiera que fueran las condiciones de tratamiento (Tabla 5.2). Además, la adición de estevia

redujo la actividad PPO asociada a algunas combinaciones de presión y tiempo. De acuerdo con los resultados, en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia, tras el procesado a 500 MPa durante 15 min, se logró la inactivación casi completa de la PPO (98,13 %). Estos resultados demuestran que la infusión de hojas estudiada contiene agentes antipardeamiento, que inhibieron las actividades enzimáticas PPO y POD del extracto estudiado. Dicha capacidad podría estar relacionada con la presencia de compuestos fenólicos en las hojas de estevia (Muanda *et al.*, 2011). En relación a esto, el TPC obtenido en presencia de estevia fue considerablemente mayor que el TPC obtenido en ausencia de ésta (Tabla 5.2). La adición de estevia supuso, por tanto, un aporte de compuestos fenólicos.

A mayor concentración de estevia, mayor TPC, siendo éste el único factor que modificó el TPC del extracto estudiado, puesto que no se detectaron diferencias entre el TPC obtenido pre- y posprocesado por HHP. De acuerdo con Barba *et al.* (2010), el TPC del extracto resultó independiente de la presión y del tiempo de tratamiento (Tabla 5.2).

Teniendo en cuenta que el potencial antioxidante está relacionado con su TPC, de acuerdo con los resultados obtenidos para el TPC, la TAC del extracto estudiado resultó dependiente sólo de la concentración de estevia, observándose que la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia aumentó significativamente la TAC del extracto estudiado (Tabla 5.2).

Finalmente, los valores “ORAC” fueron siempre mayores que los valores “TEAC” (Tabla 5.2). De acuerdo con Zulueta *et al.* (2009), el método ORAC proporcionó una mejor estimación de la TAC del extracto estudiado porque, a diferencia del método TEAC, permite determinar la acción de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, combinando en un solo valor el tiempo y la velocidad de inhibición del daño oxidativo.

Tabla 5.2 Efecto combinado de la estevia y de las altas presiones hidroestáticas sobre distintos parámetros de calidad.

| Presión MPa | Tiempo min | Estevia % (p:v) | <i>Listeria monocytogenes</i> ciclos log inactivados | RA PPO % | RA POD % | TPC mg GAE/L | TEAC mmol ET/L | ORAC mmol ET/L |
|----------------|---------------|----------------------------|---|---------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 300 | 5 | 0 | 0,17 ± 0,01 | 33,84 ± 1,88 | 27,46 ± 2,69 | 180,91 ± 10,09 | 2,41 ± 0,28 | 4,65 ± 0,19 |
| | | 2,50 | 3,96 ± 0,03 | 15,60 ± 0,23 | ND | 4337,82 ± 19,44 | 27,93 ± 0,97 | 38,30 ± 0,29 |
| | 15 | 1,25 | – | 17,96 ± 0,11 | 23,05 ± 1,24 | 2300,70 ± 22,90 | 14,90 ± 1,84 | 21,50 ± 0,30 |
| | | 0 | 5,72 ± 0,02 | 16,37 ± 0,23 | 22,29 ± 0,04 | 177,17 ± 11,62 | 2,16 ± 0,46 | 4,75 ± 0,24 |
| 400* | 5 | 2,50 | ≥ 7,84 ± 0,17 ^a | 16,54 ± 0,69 | ND | 4777,89 ± 56,94 | 29,63 ± 3,18 | 40,90 ± 0,52 |
| | | 1,25 | – | 15,51 ± 0,11 | 20,55 ± 1,30 | 2802,51 ± 13,98 | 17,32 ± 1,18 | 23,80 ± 0,20 |
| | 15 | 0 | 6,30 ± 0,08 | 12,25 ± 0,78 | 19,95 ± 0,73 | 77,80 ± 8,46 | 2,62 ± 0,06 | 4,10 ± 0,30 |
| | | 1,25* | – | 12,35 ± 0,75* | 18,52 ± 0,27* | 2847,11 ± 146,10* | 19,62 ± 1,26* | 23,65 ± 0,35* |
| 500 | 5 | 2,50 | ≥ 7,84 ± 0,17 ^a | 11,90 ± 0,13 | ND | 4151,48 ± 25,50 | 30,07 ± 0,80 | 39,30 ± 0,40 |
| | | 1,25 | – | 12,07 ± 0,36 | 17,50 ± 0,01 | 2457,54 ± 5,99 | 19,72 ± 0,23 | 21,10 ± 0,20 |
| | 10 | 0 | ≥ 7,84 ± 0,17 ^a | 3,14 ± 0,07 | 16,13 ± 0,59 | 191,17 ± 2,54 | 2,55 ± 0,13 | 4,15 ± 0,24 |
| | | 2,50 | ≥ 7,84 ± 0,17 ^a | 3,99 ± 0,05 | ND | 4193,85 ± 21,97 | 29,02 ± 1,50 | 41,35 ± 0,35 |
| 15 | 1,25 | – | 3,00 ± 0,21 | 12,10 ± 0,01 | 2357,64 ± 18,41 | 19,38 ± 0,12 | 22,30 ± 0,20 | |
| | 0 | ≥ 7,84 ± 0,17 ^a | 2,56 ± 0,21 | 15,66 ± 0,71 | 188,18 ± 8,12 | 2,61 ± 0,28 | 3,60 ± 0,14 | |
| | | 2,50 | ≥ 7,84 ± 0,17 ^a | 1,87 ± 0,25 | ND | 4142,25 ± 52,88 | 31,88 ± 1,45 | 40,70 ± 0,35 |

* Punto central del diseño; ^a En estos casos se logró la inactivación total del inóculo de partida.

Ciclos log inactivados: ciclos logarítmicos inactivados; RA: actividad relativa; PPO: polifenoloxidas; POD: peroxidas; TPC: contenido total de compuestos fenólicos; TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox; ORAC: capacidad de absorción de radicales de oxígeno.

–: combinación no ensayada; ND: no detectado.

5.3.2 Optimización de la concentración de estevia y del procesado por altas presiones hidrostáticas para la obtención de un producto vegetal mínimamente procesado, seguro a nivel microbiológico, estable a nivel enzimático y óptimo a nivel funcional

El procesado no térmico de los alimentos junto con el uso de conservantes naturales ayuda a garantizar seguridad y estabilidad microbiológica, intentando producir cambios mínimos en las características sensoriales, nutricionales y funcionales del producto procesado. Para ello resulta fundamental escoger una combinación que minimice la concentración microbiana y la actividad enzimática del producto, maximizando la retención de propiedades sensoriales, así como de componentes nutricionales y bioactivos.

Mediante la RSM se optimizó la concentración de estevia, el nivel presión y el tiempo de tratamiento para minimizar las actividades PPO y POD y maximizar el TPC y la TAC del extracto estudiado, teniendo en cuenta que debe reducirse la concentración de *L. monocytogenes* en al menos 5 ciclos logarítmicos. De acuerdo con estos criterios, como se explica en el apartado 5.2.9, se determinó la combinación óptima de factores (Figura 5.7).



Figura 5.7 Valor óptimo de los factores “concentración de estevia”, “nivel de presión” y “tiempo de tratamiento” para maximizar la calidad microbiológica, enzimática y funcional del extracto estudiado.

La deseabilidad asociada a dicha combinación fue igual a 0,93. Su proximidad a 1 indica una conformidad casi total con los requerimientos impuestos para la

optimización. Bajo esas condiciones, los valores predichos para las respuestas optimizadas fueron los siguientes:

- RA PPO: 7,30 %
- RA POD: *no detectada*
- TPC: 4451,99 mg GAE/L
- TEAC: 29,70 mmol ET/L
- ORAC: 40,29 mmol ET/L

Para calcularlos se tuvieron en cuenta sólo las relaciones estadísticamente significativas ($p_{valor} \leq 0,05$) entre los factores y las respuestas considerados para la optimización. En concreto, las Ecuaciones 5.5-5.9 (r mínimo = 0,8603),

$$RA\ PPO = 46,257 - 0,086 \times P \quad (\text{Ecuación 5.5})$$

$$RA\ POD = 40,842 - 2,144 \times S - 0,051 \times P - 5,264 \times S^2 + 0,018 \times S \times P \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

$$TPC = 314,389 + 1655,040 \times S \quad (\text{Ecuación 5.7})$$

$$TEAC = 2,470 + 14,636 \times S - 1,497 \times S^2 \quad (\text{Ecuación 5.8})$$

$$ORAC = 4,433 + 14,344 \times S \quad (\text{Ecuación 5.9})$$

donde S (% p:v) representa la concentración de estevia y P (MPa), la presión.

Adicionalmente, en vista de los resultados de inactivación obtenidos (Tabla 5.2) la combinación óptima garantizaría la inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en el extracto estudiado. De acuerdo con éstos, de hecho, podría llegar a alcanzarse una reducción superior a 7 ciclos logarítmicos.

5.4 Conclusión

Los resultados obtenidos sugieren que combinar el uso de extractos acuosos de estevia con el procesado por HHP podría ser una estrategia útil para obtener bebidas vegetales seguras y estables, mejorando su TPC y TAC.

Aplicar un 2,5 % (p:v) de estevia y 453 MPa, durante 5 min, resultó una combinación óptima para inactivar al menos 5 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*, maximizando el TPC y la TAC del extracto estudiado, al tiempo que se minimizaron las actividades PPO y POD, hasta niveles no alcanzados en ausencia de estevia.

Discusión general

Actividad antimicrobiana del carvacrol y del citral en medio de referencia

Reducir y controlar la concentración de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos es clave para prevenir su deterioro y garantizar su inocuidad. Con este doble objetivo se ha venido utilizando el procesado térmico, por ser una tecnología eficaz, versátil y sencilla. Actualmente, sin embargo, en vista de que el consumidor demanda productos poco procesados, existe una marcada tendencia hacia el uso de tecnologías alternativas, que proporcionen estabilidad y seguridad, manteniendo la calidad de los alimentos frescos. Estas tecnologías suelen combinarse con el almacenamiento refrigerado, porque su aplicación no consigue la esterilización de los alimentos, y con la adición de conservantes, porque es difícil asegurar una refrigeración correcta y sin fallos hasta el momento de consumo.

Por otro lado, el consumidor cada vez acepta menos la presencia de aditivos sintéticos en los alimentos, puesto que considera que son potencialmente nocivos para la salud. En consecuencia, hoy también se promueve el uso de conservantes antimicrobianos de origen natural, que reduzcan la concentración o controlen el crecimiento de los microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos mínimamente procesados, al menos, durante el tiempo de vida útil. Entre ellos, destacan los de origen vegetal (frente a los de origen animal o microbiano), principalmente, porque muchos son aromatizantes o saborizantes

alimentarios permitidos, que además pueden tener efectos positivos sobre la salud del consumidor (Davidson *et al.*, 2015).

El primer objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del carvacrol y del citral, en medio de referencia, a distintas temperaturas, en concentraciones no inhibitorias. Para ello se llevó a cabo un estudio cinético del efecto observado, en base a parámetros que describen el crecimiento de acuerdo con la temperatura de incubación y la concentración de antimicrobiano (Capítulo 1). Los estudios de este tipo son muy valiosos a nivel práctico, porque permiten prever y cuantificar la evolución de cualquier microorganismo en función de la concentración de antimicrobiano y del resto de condiciones de almacenamiento, además de aprovechar dosis efectivas mínimas, interesantes desde un punto de vista sensorial, para garantizar un procesado mínimo.

El potencial antimicrobiano del carvacrol y el citral se evaluó (i) frente a *E. coli* K12, como sustituto no patógeno de serogrupos patógenos de *E. coli* (como el O157:H7, entre otros), y (ii) frente a *L. innocua*, como sustituto no patógeno de *L. monocytogenes*. Ambos se escogieron considerando que los patógenos a los que sustituyen preocupan a las autoridades sanitarias y a los productores y procesadores de alimentos (Behling *et al.*, 2010; Newell *et al.*, 2010).

La capacidad del carvacrol y del citral para inhibir el crecimiento o reducir la supervivencia de hongos y bacterias ya ha sido anteriormente demostrada (Kim *et al.*, 1995; Chami *et al.*, 2004; Periago *et al.*, 2006; Velázquez-Núñez *et al.*, 2013). Sin embargo, existen muy pocos estudios en los que se cuantifique el potencial antimicrobiano de concentraciones por debajo de la CMI, mediante curvas de crecimiento y desarrollando o aplicando modelos matemáticos predictivos (Periago *et al.*, 2004; Periago *et al.*, 2006; Valero y Giner, 2006; Esteban *et al.*, 2013; Velázquez-Núñez *et al.*, 2013; Siroli *et al.*, 2015). Con este objetivo, se determinó la CMI de carvacrol y citral para *E. coli* K12 y

L. innocua, a distintas temperaturas, y se obtuvieron curvas de crecimiento en presencia de hasta 8 concentraciones sub-CMI, según el microorganismo, la temperatura y el antimicrobiano. Todas las curvas se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz y se calculó el valor de los parámetros λ y $\mu_{m\acute{a}x}$.

Comparando la CMI de carvacrol y citral obtenida en función de la temperatura (Tabla D.1) y de acuerdo con otros autores (Dorman y Deans, 2000), el carvacrol resultó más efectivo que el citral, ya que sus valores fueron en general más bajos. Además, para cualquiera de las temperaturas ensayadas, ambos fueron más efectivos frente *E. coli* K12 que frente a *L. innocua* (Tabla D.1).

Tabla D.1 Comparación de la dosis mínima inhibitoria de carvacrol y citral ($\mu\text{L}/\text{mL}$) para los microorganismos estudiados a las temperaturas ensayadas.

| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | <i>Escherichia coli</i> K12 | | <i>Listeria innocua</i> | |
|------------------------------------|-----------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | carvacrol | citral | carvacrol | citral |
| 37 | 0,140 | 0,325 | 0,200 | 0,300 |
| 30 | 0,140 | 0,325 | 0,200 | 0,300 |
| 15 | 0,200 | 0,300 | 0,500 | 0,500 |
| 8 | * | * | 0,500 | 1 |

* A 8°C no se detectó crecimiento de *E. coli* K12, ni siquiera en ausencia de carvacrol y citral.

Por otro lado, a dosis sub-CMI carvacrol y citral fueron capaces de ralentizar el crecimiento de *E. coli* K12 y *L. innocua*, a 37, 30 y 15°C , incrementando λ y, en términos generales, disminuyendo $\mu_{m\acute{a}x}$. Además, para *L. innocua*, a 8°C el citral incrementó el valor de λ y ambos disminuyeron el valor de $\mu_{m\acute{a}x}$.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de su composición, de la naturaleza química de sus componentes y de los grupos funcionales que éstos contengan (Dorman y Deans, 2000). No obstante, dicha actividad se atribuye normalmente a los compuestos fenólicos, como el

carvacrol (Figura D.1), porque suelen ser mayoritarios en la composición de muchos aceites, además de muy activos (Dorman y Deans, 2000).

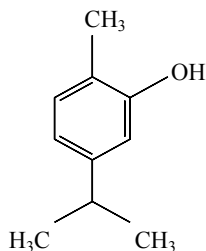


Figura D.1 Estructura química del carvacrol.

Considerando que los compuestos fenólicos actúan sobre todo a nivel de membrana, su potencial antimicrobiano se ha relacionado (i) con su afinidad por las fases hidrófobas, (ii) con la presencia de grupos hidroxilo ($-OH$) y (iii) con la presencia de anillos aromáticos. La importancia de los grupos $-OH$ parece estar relacionada con su facilidad para formar puentes de hidrógeno. Gracias a ello, el carvacrol podría interactuar con partes polares de la membrana, adquiriendo una orientación óptima de los anillos en el interior de la bicapa lipídica y una interacción más fuerte, por unión de su grupo $-OH$ a un grupo fosfato o a un enlace éster de la cabeza de los fosfolípidos que forman la bicapa (Figura D.2) (Veldhuizen *et al.*, 2006).

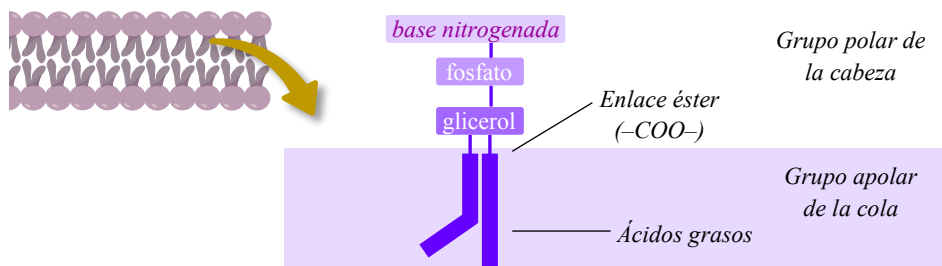


Figura D.2 Estructura simplificada de un fosfolípido de membrana.

Además, el grupo $-OH$ del carvacrol le proporcionaría la capacidad de acumular protones en el citoplasma, funcionando como un transportador transmembrana de cationes monovalentes, capaz de intercambiar el protón de su grupo $-OH$ por cationes tales como el ion potasio (Figura D.3) (Ultee *et al.*, 2002).

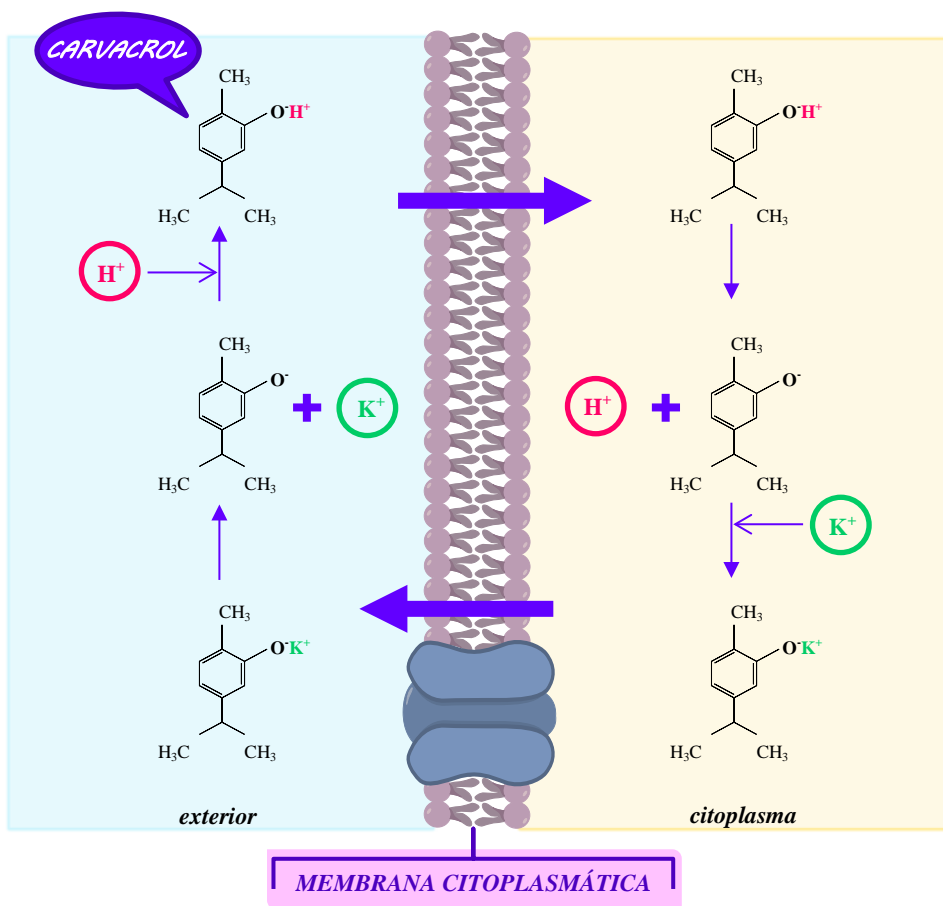


Figura D.3 Mecanismo de acción del carvacrol como transportador de cationes monovalentes a nivel de la membrana (Basado en: Ultee *et al.*, 2002).

La acumulación del carvacrol en las membranas y su acción como transportador de protones explicaría cómo altera la estructura y función de las envoltas celulares, y cómo consigue reducir o anular el gradiente de pH, reducir o anular

el potencial eléctrico, disipar la fuerza protón-motriz, eliminar el flujo de electrones transmembrana, impedir la síntesis de ATP, inhibir la síntesis de flagelos, reducir la movilidad celular y, por último, afectar al crecimiento o a la supervivencia de los microorganismos (Ultee *et al.*, 2002; Burt *et al.*, 2007).

Por otro lado, la presencia del anillo aromático proporciona un sistema de electrones deslocalizados altamente reactivos, que disminuyen la constante de disociación ácida (pK_a) de los grupos $-OH$ y, por lo tanto, que promueven la desprotonación del carvacrol en el citoplasma (Ultee *et al.*, 2002; Ben Arfa *et al.*, 2006; Veldhuizen *et al.*, 2006). Adicionalmente, en el caso del carvacrol (que no posee sustituyentes muy voluminosos), el anillo aromático confiere a la molécula una geometría prácticamente plana, que podría facilitar su interacción con las células y su difusión a través de las membranas.

Al igual que el carvacrol, el citral posee una geometría plana, pero carece de anillo aromático y de grupos $-OH$ (Figura D.4). En consecuencia, el citral podría acumularse en las membranas, pero no actuaría como transportador de cationes monovalentes. Además, parece que la estereoquímica también puede afectar al potencial antimicrobiano; de acuerdo con Dorman y Deans (2000), los isómeros *cis* son inactivos y el citral es una mezcla de isómeros *cis/trans*. Todo esto explicaría por qué el citral resultó menos efectivo.

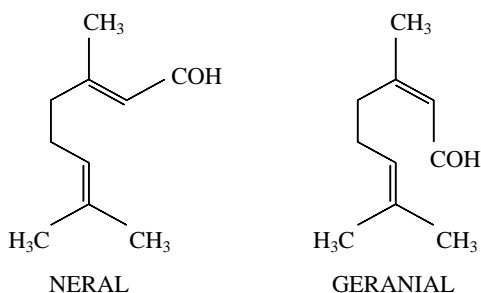


Figura D.4 Estructura química de los dos isómeros que componen el citral.

Actividad antimicrobiana del asaí y de la estevia en medio de referencia

Una vez evaluada la actividad del carvacrol y del citral, se evaluó el potencial antimicrobiano de extractos procedentes de la fruta de asaí y de las hojas de estevia, frente a *L. innocua* (como sustituto no patógeno de *L. monocytogenes*), en medio de referencia, a distintas temperaturas (Capítulo 2). Con este objetivo se obtuvieron también curvas de crecimiento a dosis sub-CMI, que se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz para calcular el valor de los parámetros λ y $\mu_{m\acute{a}x}$. El asaí y la estevia se escogieron fundamentalmente porque su actividad antimicrobiana ha sido poco estudiada (nunca desde un punto de vista cinético), porque su comercialización está en auge y porque ambos son alimentos con propiedades bioactivas, que permitirían formular productos novedosos, libres de aditivos antimicrobianos.

Para evaluar el potencial del asaí se utilizó un extracto de bayas en polvo. Según los resultados obtenidos, en las condiciones ensayadas, el asaí podría inhibir o controlar el crecimiento de *L. innocua*, pudiendo incrementar λ hasta un valor máximo de más de 30 h, si se produce un ligero aumento de la temperatura de refrigeración (10 °C).

Para evaluar el potencial de la estevia se emplearon dos extractos de esteviol glicósidos e infusiones preparadas con distintas concentraciones de hojas secas. Bajo las condiciones ensayadas, la actividad de la infusión fue mayor que la actividad de los extractos. Además, la actividad de los extractos se relacionó inversamente con el grado de pureza, no detectándose diferencias entre las muestras sin estevia y las muestras con el extracto más puro. En consecuencia, es posible que el proceso de purificación de esteviol glicósidos elimine aquellos compuestos que podrían estar relacionados con la actividad antimicrobiana de la estevia. En cualquier caso, el extracto crudo y la infusión de hojas controlaron

el crecimiento de *L. innocua*, aumentando λ y disminuyendo $\mu_{m\acute{a}x}$; para el caso concreto de la infusión, con independencia de la concentración de estevia y de la temperatura de incubación.

Comparando los resultados obtenidos para el extracto de asaí y la infusión de estevia, a 37 °C, en medio referencia, frente a *L. innocua*, el asaí resultó más efectivo, con una CMM del 1 % (p:v), mientras que un 2,5 % (p:v) de estevia no resultó letal, siendo ésta la concentración máxima ensayada de estevia en infusión, por ser la máxima sensorialmente admisible de hojas de estevia (Savita *et al.*, 2004). No obstante, de acuerdo con lo dicho anteriormente, a dosis no inhibitorias la infusión de estevia aumentó λ y disminuyó $\mu_{m\acute{a}x}$, a diferencia del asaí, que sólo aumentó λ .

En estudios con otros extractos vegetales la capacidad antimicrobiana de éstos se ha relacionado con la presencia de compuestos fenólicos (Shan *et al.*, 2007; Lian *et al.*, 2012) y, en particular, con la presencia de polifenoles (Kabuki *et al.*, 2000; Sakanaka *et al.*, 2000; Esquenazi *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2002). Para tratar de establecer un paralelismo entre los compuestos fenólicos y la actividad antimicrobiana del asaí y de la estevia, se determinó el TPC de muestras con un 1 % (p:v) de asaí y el TPC de muestras de infusión de hojas de estevia al 2,5 % (p:v). En vista de los resultados obtenidos, el TPC de las muestras de estevia fue mayor que el TPC de las muestras con asaí (3072,48 ± 139,56 frente a 2154,91 ± 126,10 mg GAE/L). Considerando que un 1 % (p:v) de asaí resultó más efectivo, según los valores de TPC obtenidos, la actividad antimicrobiana del asaí y de la estevia no sólo depende del TPC, pudiendo depender también del perfil específico de compuestos fenólicos que tengan, así como de la existencia de otros compuestos.

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos que presentan en su estructura al menos un anillo aromático con uno o varios grupos –OH. En lo

referente a la actividad antimicrobiana destacan algunos polifenoles (Daglia, 2012). En concreto, los flavan-3-oles, los flavonoles y los taninos (Figuras D.5 y D.6), porque son muy activos, presentan un amplio espectro de acción y tienen capacidad para suprimir factores de virulencia (Daglia, 2012).

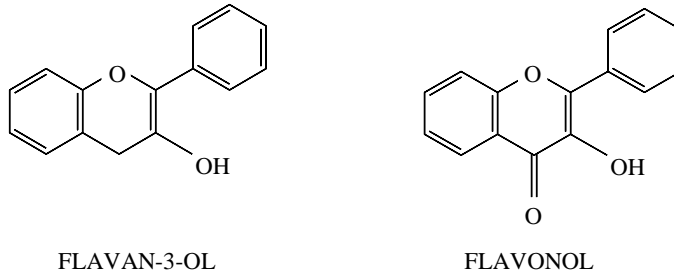


Figura D.5 Estructura química general de los flavan-3-oles y de los flavonoles.

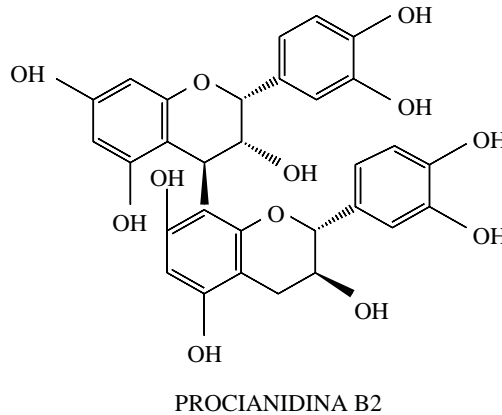


Figura D.6 Ejemplo de la estructura química de un tanino condensado.

En cuanto al mecanismo de acción de los polifenoles, se sabe que éstos pueden unirse a adhesinas, dificultando la formación de biopelículas y la colonización del hospedador (cuando se trata de patógenos). Además, alteran la estructura de la membrana citoplasmática y, por ende, dificultan la retención de compuestos, la generación de energía y la toma de nutrientes, mermada también por su

habilidad para unirse a moléculas de todo tipo (Cowan, 1999; Daglia, 2012). Los taninos, por ejemplo, pueden interactuar con proteínas, complejarse con polisacáridos y quelar iones metálicos (Scalbert, 1991). Adicionalmente, los flavan-3-oles disminuyen la movilidad microbiana, mientras que los flavonoles fomentan la agregación celular (Daglia, 2012).

Considerando todos los resultados obtenidos en medio de referencia, carvacrol y citral resultaron más efectivos frente a *L. innocua* que los extractos de asaí y estevia estudiados. De acuerdo con los resultados obtenidos, a 37 °C, la CMI de carvacrol y de citral para *L. innocua* fue 0,02 y 0,03 % (p:v), respectivamente. Bajo las mismas condiciones de ensayo, la CMI de asaí para *L. innocua* (1 %, p:v) fue 33 veces mayor que la CMI de citral, mientras que la concentración máxima ensayada y sensorialmente admisible de hojas de estevia (2,5 %, p:v), no siendo inhibitoria, fue unas 83 veces mayor que la CMI de citral. Con todo, no hay que perder de vista que tanto el carvacrol como el citral son, por un lado, compuestos cuya volatilidad e hidrofobicidad muchas veces dificulta su aplicación y disminuye su eficacia en alimentos, y por otro, que son compuestos altamente puros, usados como aditivos aromatizantes o saborizantes, sin valor nutricional. Las hojas de estevia y el asaí, en cambio, son alimentos que añaden a sus características nutricionales y funcionales, potenciales propiedades antimicrobianas, que son útiles en la conservación de alimentos, para garantizar la estabilidad e inocuidad microbiológica.

No obstante, a nivel práctico la elección de cualquier antimicrobiano siempre depende del alimento (siendo especialmente importante el impacto sobre las propiedades sensoriales), del microorganismo y de factores relacionados con el procesado y el envasado del producto en cuestión. Por ejemplo, un aceite esencial es mucho más efectivo si se incluye en un material destinado a producir un envase activo, mientras que los extractos de asaí o estevia ejercen mejor su

función en alimentos líquidos, como las bebidas a base de frutas, o con un cierto grado de humedad, como es el caso de las confituras o las mermeladas.

Actividad antimicrobiana de la estevia en una bebida a base de frutas

El efecto de la interacción entre compuestos justifica que la actividad antimicrobiana de cualquier conservante se deba evaluar en las condiciones en las que se pretende aplicar. De ahí el interés de realizar estudios en alimentos, aunque éstos sirvan de base para el desarrollo de otros productos. En ocasiones puede ocurrir que ciertas características fisicoquímicas potencien, reduzcan o anulen la actividad conservante. En este sentido, diversos estudios demuestran que determinados componentes de los alimentos pueden reducir la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (Holley y Patel, 2005; Hyldgaard *et al.*, 2012) y de las bacteriocinas (Gänzle *et al.*, 1999).

Una vez completado el estudio del potencial de distintos antimicrobianos de origen vegetal en medio de referencia, se evaluó el efecto de la estevia en una bebida a base de zumos con mango, naranja, papaya, avena y estevia, añadida en forma de infusión, como un alimento más en la formulación del producto (Capítulo 3). Citral y carvacrol no se consideraron en este estudio dada su hidrofobicidad y volatilidad. Por otro lado, el asaí tampoco se consideró, puesto que en concentraciones por debajo de la CMI afectó sólo a la fase de latencia, mientras que la estevia afectó tanto a la fase de latencia como la velocidad de crecimiento.

En el desarrollo de la bebida se tuvo en cuenta (i) que está en auge la venta de zumos enriquecidos con leche o productos similares; (ii) que el consumo regular de zumos recién exprimidos resulta beneficioso para la salud; (iii) que en el

mercado es difícil adquirir bebidas con zumos obtenidos a partir de fruta fresca; (iv) que este tipo de alimentos se deteriora con facilidad; (v) que mango, naranja y papaya son frutas ricas en antioxidantes, y (vi) que la avena es un alimento rico en fibra y apto para intolerantes a la lactosa.

Además, se tuvo en cuenta que la estevia no se considera un aditivo, como sí lo son carvacrol y citral, y que su adición en forma de infusión supondría, por un lado, obtener un alimento sin azúcares ni edulcorantes artificiales añadidos (efecto que no se conseguiría con el asaí) y, por otro, incrementar la calidad funcional de la bebida, ya que el consumo de estevia puede tener efectos beneficiosos sobre la salud (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009; Gupta *et al.*, 2013).

En esta bebida se evaluó el efecto antimicrobiano de distintas concentraciones de estevia (0,5; 1,5 y 2,5 %, p:v), frente a *L. monocytogenes*, teniendo en cuenta que puede contaminar los zumos y que este tipo de alimentos puede soportar el crecimiento del patógeno (Benlloch-Tinoco *et al.*, 2015).

En vista de los resultados obtenidos, *L. monocytogenes* resultó incapaz de crecer en la bebida formulada, incluso en ausencia de estevia y a temperatura óptima de crecimiento (37 °C), a diferencia de lo observado en medio de referencia. Este comportamiento podría deberse, por un lado, al pH de la bebida ($4,65 \pm 0,05$) y, por otro, a la presencia de compuestos antimicrobianos aportados por la mezcla zumos. En la bibliografía, estudios recientes demuestran que los zumos de mango, naranja y papaya tienen actividad antimicrobiana (Bansode y Chavan, 2013; Manzoor *et al.*, 2013; Youseif *et al.*, 2014). En cualquier caso, aunque no se detectara crecimiento, la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia supuso ventajas adicionales, incrementando el valor del parámetro de inactivación *b* de la distribución de frecuencias de Weibull, inversamente relacionado con el tiempo transcurrido hasta que tiene lugar la primera

reducción decimal, y directamente relacionado con la velocidad de inactivación, sobre todo a 10 °C.

El uso de conservantes a concentraciones subletales, como se propone en este trabajo, es adecuado para mantener la calidad de los alimentos mínimamente procesados. Sin embargo, estas concentraciones pueden dar lugar a células viables subletalmente dañadas (Somolinos *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2013), que son incapaces de crecer medios selectivos (Wu, 2008; Wesche *et al.*, 2009) y cuyos mecanismos de resistencia pueden ser diferentes a aquellos de las células intactas, llegando a comprometer también la inocuidad del producto. Por consiguiente, cuantificar el daño subletal producido mediante la incubación en presencia de estevia permitió valorar con precisión su potencial antimicrobiano. Gracias a ello, se observó que la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia adelantó y aceleró la inactivación de las células intactas, aumentado la proporción de células muertas, y en algunos casos también la proporción de células dañadas, durante el almacenamiento a distintas temperaturas. El daño subletal producido en presencia de estevia no se consideró un riesgo debido a que todas las células presentes en el alimento acabaron muriendo.

En definitiva, los resultados obtenidos demuestran que la adición de estevia en infusión podría ser una medida de control adicional de la supervivencia de *L. monocytogenes* en bebidas similares a la bebida formulada, sobre todo a temperaturas de ligero abuso en refrigeración (10 °C).

Tratamiento por altas presiones hidrostáticas para la estabilización de una bebida vegetal con estevia

La aplicación conjunta de tecnologías no térmicas y de antimicrobianos de origen vegetal es una de las posibles alternativas para alargar la vida útil de

alimentos mínimamente procesados, sobre todo si se combinan tratamientos y concentraciones con efectos sinérgicos, porque puede minimizarse su intensidad y, por ende, el impacto sobre las características fisicoquímicas, nutricionales y bioactivas del producto en cuestión (Escobar *et al.*, 2014).

Entre las tecnologías de procesado no térmicas desarrolladas hasta la fecha destaca la aplicación de HHP. Esta tecnología está irrumpiendo con fuerza en el sector industrial, siendo capaz de reducir la carga microbiana de los alimentos y la acción de enzimas implicados en el deterioro, conservando en gran medida todas las propiedades del producto, o incluso produciendo cambios interesantes para el desarrollo de nuevos alimentos (San Martín *et al.*, 2002).

Según los resultados del Capítulo 4, la aplicación de HHP, sola y combinada con la adición de estevia, podría reducir la población de *L. monocytogenes* en más de 5 ciclos logarítmicos, cumpliendo con los requerimientos de la FDA para zumos de baja acidez ($\text{pH} > 4,6$) no sometidos a tratamientos térmicos (FDA, 2016). En cualquier caso, la adición de estevia incrementó la eficacia de la tecnología, aumentado la proporción total de células muertas y dañadas, cuando había células intactas, o la proporción de células muertas, cuando sólo quedaban dañadas. Además, en presencia de estevia aumentó la velocidad de inactivación de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento posprocesado a distintas temperaturas. Del mismo modo, considerando también los resultados obtenidos en el Capítulo 3 (para la bebida con y sin estevia almacenada a distintas temperaturas), la aplicación de HHP mejoró la eficacia de antimicrobiana de la estevia, reduciendo la concentración de células viables en la bebida a tiempo 0 y aumentando la velocidad de inactivación durante el almacenamiento posprocesado a distintas temperaturas.

Comparando los valores de *b* obtenidos en los Capítulos 3 y 4 se demuestra que la combinación estevia/HHP tuvo efectos sinérgicos sobre la inactivación de

L. monocytogenes, llegándose a obtener un valor de b casi 3 órdenes de magnitud mayor durante el almacenamiento a 10 °C, combinando la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia con el procesado a 300 MPa, 3 min.

Finalmente, teniendo en cuenta que la estabilidad enzimática y las propiedades bioactivas de los alimentos también son importantes en el contexto de los alimentos mínimamente procesados, se optimizó la estrategia de conservación estevia/HHP, evaluando su efecto sobre *L. monocytogenes*, las actividades enzimáticas PPO y POD, el TPC y la TAC de una matriz obtenida a partir del zumo de mango, naranja y papaya (Capítulo 5).

En la Figura D.7 se muestra la influencia de los factores considerados sobre las respuestas actividad enzimática, TPC y TAC. Como se observa en la figura, incrementar la concentración de estevia o el nivel de presión redujo las actividades enzimáticas PPO y POD. Algunas de las combinaciones ensayadas permitieron la inactivación completa de la POD y reducciones considerables de la PPO (≥ 95 %), aunque el efecto de la estevia fue estadísticamente significativo sólo en el caso de la POD ($p_{valor} \leq 0,05$). Por otro lado, la adición de estevia incrementó significativamente el TPC y la TAC de la matriz estudiada ($p_{valor} \leq 0,05$).

En conjunto, estos resultados sugieren que la combinación de extractos acuosos de estevia con el procesado por HHP podría ser útil para obtener bebidas vegetales listas para el consumo, inocuas, estables y con propiedades bioactivas mejoradas. La combinación óptima de parámetros de proceso, de acuerdo con los resultados obtenidos, sería la siguiente: 2,5 % (p:v), para la concentración de estevia; 453 MPa, para el nivel presión, y 5 min, para el tiempo de tratamiento. En esas condiciones podrían llegar a inactivarse al menos 5 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes*, consiguiendo minimizar las actividades enzimáticas estudiadas y maximizar el TPC y la TAC del producto procesado.

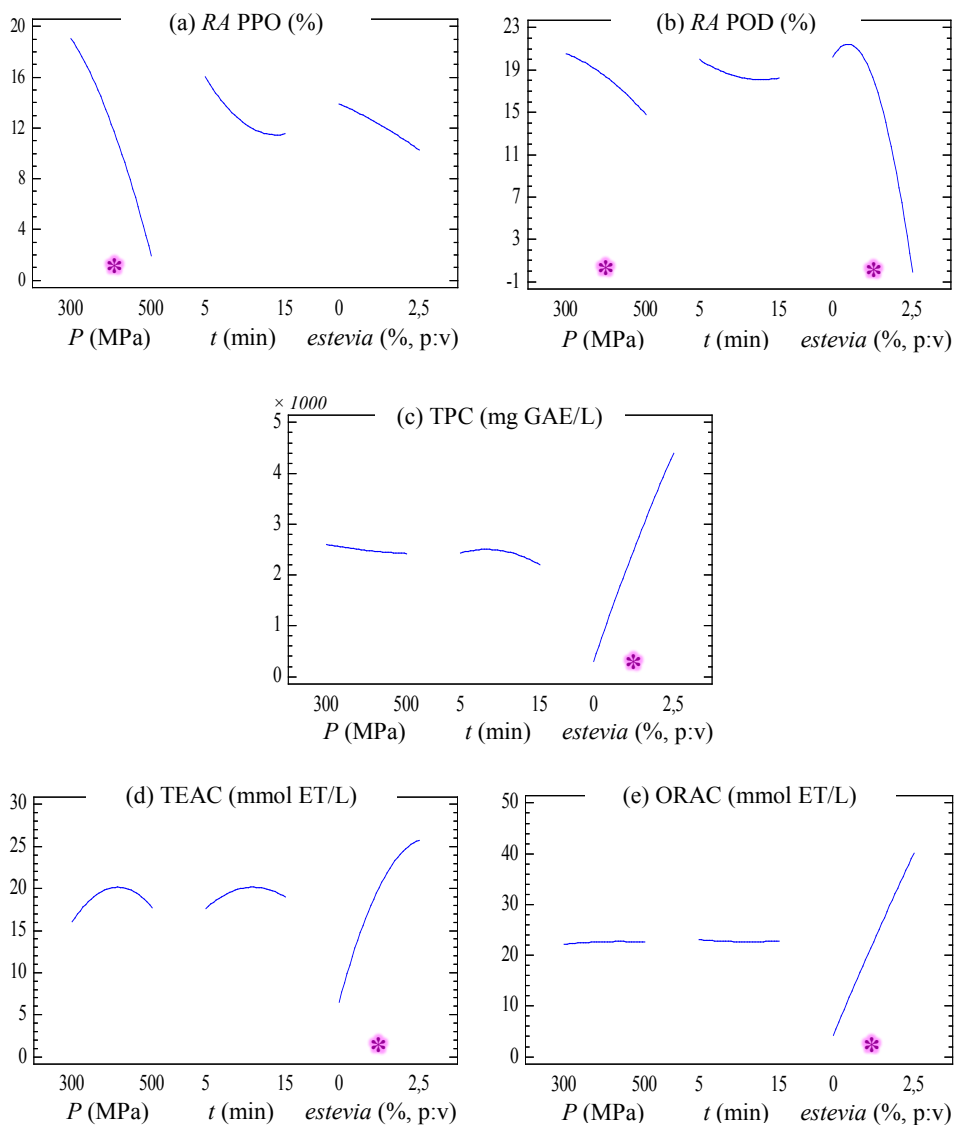


Figura D.7 Efecto del nivel de presión (P), del tiempo de tratamiento por HHP (t) y de la concentración de estevia (*estevia*) sobre la actividad relativa (RA) polifenoloxidasa (PPO) y peroxidasa (POD), el contenido total de compuestos fenólicos (TPC) y la capacidad antioxidante total del extracto estudiado (TEAC y ORAC). El asterisco señala las influencias que fueron estadísticamente significativas ($p_{valor} \leq 0,05$).

Conclusiones

Del conjunto de resultados que se han incluido en la presente tesis pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- En medios de referencia, carvacrol, citral, asaí y estevia fueron capaces de causar la muerte, inhibir o ralentizar el crecimiento de bacterias sustitutas de patógenos de transmisión alimentaria. La capacidad antimicrobiana resultó dependiente del tipo y de la concentración de antimicrobiano, del microorganismo y de la temperatura. A 37 °C, la CMI de carvacrol, citral y asaí para *L. innocua* fue 0,02; 0,03 y 1 % (p:v), respectivamente. Sin embargo, en las mismas condiciones la concentración máxima ensayada y sensorialmente admisible de hojas de estevia (2,5 %, p:v) no resultó inhibitoria.
- Carvacrol y citral fueron capaces de ralentizar el crecimiento de *E. coli* K12 y de *L. innocua*, a 37, 30 y 15 °C, incrementando λ y, en términos generales, reduciendo $\mu_{m\acute{a}x}$. Comparando ambos compuestos, el carvacrol resultó más efectivo ya que sus valores de CMI fueron en general más bajos. De acuerdo con estos valores, para cualquiera de las temperaturas ensayadas se observó que carvacrol y citral fueron más efectivos frente *E. coli* K12 que frente a *L. innocua*.
- Por otro lado, el asaí fue capaz de inhibir o controlar el crecimiento de *L. innocua* bajo las condiciones ensayadas, pudiendo incrementar λ hasta un valor máximo de más de 30 h, a 10 °C y, por lo tanto, si se produce un ligero abuso de la temperatura de refrigeración.

- En el caso de la estevia, la actividad antimicrobiana de la infusión fue mayor que la de los extractos estudiados, demostrándose que la infusión ralentizó el crecimiento de *L. innocua*, aumentando λ y disminuyendo $\mu_{m\acute{a}x}$ con independencia de la concentración de estevia y de la temperatura de incubación.
- En una bebida a base de zumos, la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia demostró ser una medida de control adicional de la supervivencia de *L. monocytogenes*, aumentando la proporción total de células muertas y dañadas durante el almacenamiento a distintas temperaturas. Además, con respecto a la bebida sin estevia, la transformación de células intactas a dañadas y de dañadas a muertas fue más rápida.
- La aplicación de HHP en la bebida con y sin estevia (2,5 %, p:v) redujo la concentración de *L. monocytogenes* en más de 5 ciclos logarítmicos, hasta niveles seguros de acuerdo con la legislación vigente para bebidas similares.
- La adición de un 2,5 % (p:v) de estevia aumentó la eficacia antimicrobiana de las HHP, durante el procesado, produciendo más muerte para un mismo tratamiento en ausencia de estevia. Además, combinar la adición de estevia con el procesado por HHP tuvo un efecto sinérgico, tal como se deduce de la velocidad de inactivación durante el almacenamiento posprocesado.
- El tratamiento por HHP en presencia de un 2,5 % (p:v) de estevia produjo que la transformación de células intactas a dañadas y de dañadas a muertas fuera más rápida, con respecto a la bebida tratada sin estevia, y a la bebida sin tratar conteniendo estevia.
- En un extracto obtenido a partir de zumos de fruta, la aplicación de HHP junto con la adición de un 2,5 % (p:v) de estevia redujo la actividad de

enzimas oxidativas implicadas en el deterioro de los alimentos e incrementó la capacidad antioxidante.

- Las condiciones óptimas de procesado mediante HHP para maximizar la inactivación de *L. monocytogenes*, la estabilidad enzimática y la capacidad antioxidante del extracto estudiado fueron: 453 MPa, 5 min y un 2,5 % (p:v) de estevia.

En resumen, los antimicrobianos ensayados mostraron actividad frente a bacterias sustitutas de patógenos de transmisión alimentaria, así como frente a *L. monocytogenes*. Por consiguiente, se podrían considerar medidas de control adicionales en caso de que se produzca un fallo en la cadena de frío. En el caso particular de la estevia, su uso conjunto con el procesado mediante HHP podría garantizar la seguridad microbiológica, aumentar la estabilidad enzimática y mejorar la calidad funcional de bebidas vegetales mínimamente procesadas, listas para el consumo, sin azúcares ni edulcorantes añadidos.

Bibliografía

- Ackers, M.-L.; Mahon, B.E.; Leahy, E.; Goode, B.; Damrow, T.; Hayes, P.S.; Bibb, W.F.; Rice, D.H.; Barrett, T.J.; Hutwagner, L.; Griffin, P.M.; Slutsker, L. (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *The Journal of Infectious Diseases* 177(6), 1588-1593.
- Ahmad, M.M.; Salim-Ur-Rehman; Iqbal, Z.; Anjum, F.M.; Sultan, J.I. (2006) Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pakistan Journal of Botany* 38(2), 319-324.
- Ait-Ouazzou, A.; Cherrat, L.; Espina, L.; Lorán, S.; Rota, C.; Pagán, R. (2011) The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12(3), 320-329.
- Al-Baarri, A.N.; Hayashi, M.; Ogawa, M.; Hayakawa, S. (2011) Effects of mono- and disaccharides on the antimicrobial activity of bovine lactoperoxidase system. *Journal of Food Protection* 74(1), 134-139.
- Al-Nabulsi, A.A.; Holley, R.A. (2006) Enhancing the antimicrobial effects of bovine lactoferrin against *Escherichia coli* O157:H7 by cation chelation, NaCl and temperature. *Journal of Applied Microbiology* 100(2), 244-255.
- Alonso, J.R. (2012) El fruto de asaí (*Euterpe oleracea*) como antioxidante. *Revista de Fitoterapia* 12(2), 149-157.
- Alpas, H.; Kalchayanand, N.; Bozoglu, F.; Ray, B. (2000) Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 60(1), 33-42.
- Alpas, H.; Kalchayanand, N.; Bozoglu, F.; Sikes, A.; Dunne, C.P.; Ray, B. (1999) Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65(9), 4248-4251.
- Ammerman, N.C.; Beier-Sexton, M.; Azad, A.F. (2008) Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology* Appendix-4E, 4 pp.
- Ananta, E.; Knorr, D. (2009) Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiology* 26(5), 542-546.
- Arroyo-López, F.N.; Bautista-Gallego, J.; Garrido-Fernández, A. (2012) Role of predictive microbiology in food preservation. En: Bhat, R.; Alias, A.K.; Paliyath, G. (Eds.) *Progress in food preservation*. Wiley-Blackwell: Reino Unido, pp. 389-404.
- Aureli, P.; Fiorucci, G.C.; Caroli, D.; Marchiaro, G.; Novara, O.; Leone, L.; Salmaso, S. (2000) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine* 342(17), 1236-1241.

- Banga, J.R.; Balsa-Canto, E.; Moles, C.G.; Alonso, A.A. (2003) Improving food processing using modern optimization methods. *Trends in Food Science & Technology* 14(4), 131-144.
- Bansode, D.S.; Chavan, M.D. (2013) Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of papaya and pineapple fruit juices against selected enteric pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4(2), 1176-1184.
- Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frígola, A. (2010) Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(18), 10070-10075.
- Basak, S.; Ramaswamy, H.S.; Piette, J.P.G. (2002) High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3(3), 223-231.
- Behling, R.G.; Eifert, J.; Erickson, M.C.; Gurtler, J.B.; Kornacki, J.L.; Line, E.; Radcliff, R.; Ryser, E.T.; Stawick, B.; Yan, Z. (2010) Selected pathogens of concern to industrial food processors: Infectious, toxigenic, toxico-infectious, selected emerging pathogenic bacteria. En: Kornacki, J.L. (Ed.) *Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment*. Springer: EE. UU., pp. 5-61.
- Belda-Galbis, C.M.; Leufvén, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. (2014) Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. *Journal of Food Engineering* 141, 37-43.
- Ben Arfa, A.B.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43(2), 149-154.
- Benito, A.; Ventoura, G.; Casadei, M.; Robinson, T.; Mackey, B. (1999) Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4), 1564-1569.
- Benlloch-Tinoco, M.; Igual, M.; Rodrigo, D.; Martínez-Navarrete, N. (2015) Superiority of microwaves over conventional heating to preserve shelf-life and quality of kiwifruit puree. *Food Control* 50, 620-629.
- Besser, R.E.; Lett, S.M.; Weber, J.T.; Doyle, M.P.; Barrett, T.J.; Wells, J.G.; Griffin, P.M. (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269(17), 2217-2220.
- Black, E.P.; Huppertz, T.; Fitzgerald, G.F.; Kelly, A.L. (2007) Baroprotection of vegetative bacteria by milk constituents: A study of *Listeria innocua*. *International Dairy Journal* 17(2), 104-110.
- Blais, B.; Deschênes, M.; Huszczyński, G.; Gauthier, M. (2014) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colony check assay for the identification of serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 colonies isolated on plating media. *Journal of Food Protection* 77(7), 1212-1218.
- Blanco, C.; Stashenko, E.E.; Combariza, M.Y.; Martinez, J.R. (1995) Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 697(1-2), 501-513.
- Bonomo, L. de F.; Silva, D.N.; Boasquivis, P.F.; Paiva, F.A.; Guerra, J.F. da C.; Martins, T.A.F.; Torres, Á.G. de J.; Paula, I.T.B.R. de; Caneschi, W.L.; Jacolot, P.; Grossin, N.; Tessier, F.J.; Boulanger, E.; Silva, M.E.; Pedrosa, M.L.; Oliveira, R. de P. (2014) Açai (*Euterpe*

- oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. *PLOS ONE* 9(3), 1-15.
- Botelho, M.A.; Nogueira, N.A.P.; Bastos, G.M.; Fonseca, S.G.C.; Lemos, T.L.G.; Matos, F.J.A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V.S.; Brito, G.A.C. (2007) Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40(3), 349-356.
- Box, G.E.P.; Draper, N.R. (1959) A basis for the selection of a response surface design. *Journal of the American Statistical Association* 54(287), 622-654.
- Box, G.E.P.; Wilson, K.B. (1951) On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 13(1), 1-45.
- Brandle, J.E.; Telmer, P.G. (2007) Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68(14), 1855-1863.
- Brett, M.S.Y.; Short, P.; McLaughlin, J. (1998) A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *International Journal of Food Microbiology* 43(3), 223-229.
- Brul, S.; Coote, P. (1999) Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50(1-2), 1-17.
- Brul, S.; Rommens, A.J.M.; Verrips, C.T. (2000) Mechanistic studies on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1(2), 99-108.
- Burdock, G.A. (2009) *Fenaroli's handbook of flavor ingredients* (6.^a ed.). CRC Press: EE. UU.
- Burt, S. (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3), 223-253.
- Burt, S.A.; Vlieland, R.; Haagsman, H.P.; Veldhuizen, E.J.A. (2005) Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection* 68(5), 919-926.
- Burt, S.A.; Zee, R. van der; Koets, A.P.; Graaff, A.M. de; Knapen, F. van; Gastra, W.; Haagsman, H.P.; Veldhuizen, E.J.A. (2007) Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 73(14), 4484-4490.
- Buzrul, S.; Alpas, H.; Bozoglu, F. (2005) Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. *Food Research International* 38(2), 151-157.
- Cao, G.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine* 14(3), 303-311.
- Carakostas, M.C.; Curry, L.L.; Boilea, A.C.; Brusick, D.J. (2008) Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* 46(7), S1-S10.
- Carlez, A.; Rosec, J.-P.; Richard, N.; Cheftel, J.-C. (1993) High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *LWT - Food Science and Technology* 26(4), 357-363.
- Carrasco, E.; Pérez-Rodríguez, F.; Valero, A.; García-Gimeno, R.M.; Zurera, G. (2007) Survey of temperature and consumption patterns of fresh-cut leafy green salads: Risk factors for listeriosis. *Journal of Food Protection* 70(10), 2407-2412.
- CCFH (2009) *Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de Listeria monocytogenes en los alimentos (CAC/GL 61 - 2007)*. Codex Alimentarius Commission, 30 pp.

- CDC (2011) *Strategies to prevent obesity and other chronic diseases: The CDC guide to strategies to increase the consumption of fruits and vegetables*. U.S. Department of Health and Human Services, 68 pp.
- CDC (2015) *Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 2013: Annual report*. U.S. Department of Health and Human Services, 20 pp.
- Chakraborty, S.; Kaushik, N.; Rao, P.S.; Mishra, H.N. (2014) High-pressure inactivation of enzymes: A review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4), 578-596.
- Chami, N.; Chami, F.; Bennis, S.; Trouillas, J.; Remmal, A. (2004) Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 8(3), 217-226.
- Chan, P.; Tomlinson, B.; Chen, Y.-J.; Liu, J.-C.; Hsieh, M.-H.; Cheng, J.-T. (2000) A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology* 50(3), 215-220.
- Char, C.D.; Guerrero, S.N.; Alzamora, S.M. (2010) Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food and Bioprocess Technology* 3(5), 752-761.
- Chatsudthipong, V.; Muanprasat, C. (2009) Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics* 121(1), 41-54.
- Cheftel, J.C. (1995) Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International* 1(2-3), 75-90.
- Chen, H.; Hoover, D.G. (2003) Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4(1), 25-34.
- Chin, Y.-W.; Chai, H.-B.; Keller, W.J.; Kinghorn, A.D. (2008) Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (açai) with antioxidant and cytoprotective activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(17), 7759-7764.
- Comisión Europea (2005) Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 338, 1-26.
- Comisión Europea (2007) Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 322, 12-29.
- Comisión Europea (2010) Reglamento (UE) n° 365/2010 de la Comisión de 28 de abril de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriáceas en la leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 107, 9-11.
- Comisión Europea (2011) Reglamento (UE) n° 1131/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los glucósidos de esteviol. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 295, 205-211.

- Considine, K.M.; Kelly, A.L.; Fitzgerald, G.F.; Hill, C.; Sleator, R.D. (2008) High-pressure processing – Effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters* 281(1), 1-9.
- Corbo, M.R.; Bevilacqua, A.; Campaniello, D.; D'Amato, D.; Speranza, B.; Sinigaglia, M. (2009) Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches – A review. *International Journal of Food Science and Technology* 44(2), 223-241.
- Coroller, L.; Leguerinel, I.; Mettler, E.; Savy, N.; Mafart, P. (2006) General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology* 72(10), 6493-6502.
- Cosentino, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F. (1999) *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29(2), 130-135.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4), 564-582.
- Crammer, B.; Ikan, R. (1986) Sweet glycosides from the stevia plant. *Chemistry in Britain* 22, 915-917.
- Criado, M.N.; Barba, F.J.; Frígola, A.; Rodrigo, D. (2014) Effect of *Stevia rebaudiana* on oxidative enzyme activity and its correlation with antioxidant capacity and bioactive compounds. *Food and Bioprocess Technology* 7(5), 1518-1525.
- Croxen, M.A.; Law, R.J.; Scholz, R.; Keeney, K.M.; Wlodarska, M.; Finlay, B.B. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4), 822-880.
- Daglia, M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23(2), 174-181.
- Dalton, C.B.; Austin, C.C.; Sobel, J.; Hayes, P.S.; Bibb, W.F.; Graves, L.M.; Swaminathan, B.; Proctor, M.E.; Griffin, P.M. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine* 336(2), 100-105.
- Davidson, P.M.; Bozkurt, H.; Monu, E.A.; Techathuvanan, C. (2015) The use of natural antimicrobials in food: An overview. En: Taylor, T.M. (Ed.) *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality*. Woodhead Publishing: Reino Unido, pp. 1-27.
- Davidson, P.M.; Critzer, F.J.; Taylor, T.M. (2013) Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. *Annual Review of Food Science and Technology* 4, 163-190.
- Davies, K.W. (1993) Design of experiments for predictive microbial modeling. *Journal of Industrial Microbiology* 12(3), 295-300.
- Debnath, M. (2008) Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2(2), 45-51.
- Denny, J.; Bhat, M.; Eckmann, K. (2008) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathogens and Disease* 5(3), 321-328.
- Devlieghere, F. (2000) *Predictive modelling of the spoilage and the microbial safety of modified atmosphere packaged cooked meat products*. Tesis doctoral – Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent: Bélgica.
- Devlieghere, F.; Vermeulen, A.; Debevere, J. (2004) Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21(6), 703-714.

- Donsì, F.; Annunziata, M.; Sessa, M.; Ferrari, G. (2011) Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology* 44(9), 1908-1914.
- Dorman, H.J.D.; Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88(2), 308-316.
- Doyle, M.P. (2006) Dealing with antimicrobial resistance. *Food Technology* 60(8), 22-29.
- Doyle, M.P.; Zhao, T.; Meng, J.; Zhao, S. (1997) *Escherichia coli* O157:H7. En: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (Eds.) *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y fronteras*. Acirbia: España, pp. 177-198.
- EFSA (2010) Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal* 8(4), 1537 (84 pp.).
- EFSA; ECDC (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13(1), 3991 (162 pp.).
- Escobar, A.; Márquez, C.J.; Restrepo, C.E.; Cordoba, L.J.P. (2014) Aplicación de tecnología de barreras para la conservación de mezclas de vegetales mínimamente procesados. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 67(1), 7237-7245.
- Espitia, P.J.P.; Otoni, C.G.; Soares, N.F.F. (2016) Pediocin applications in antimicrobial food packaging systems. En: Barros-Velázquez, J. (Ed.) *Antimicrobial food packaging*. Academic Press: EE. UU., pp. 445-454.
- Esquenazi, D.; Wigg, M.D.; Miranda, M.M.F.S.; Rodrigues, H.M.; Tostes, J.B.F.; Rozental, S.; Silva, A.J.R. da; Alviano, C.S. (2002) Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology* 153(10), 647-652.
- Esser, D.S.; Leveau, J.H.J.; Meyer, K.M. (2015) Modeling microbial growth and dynamics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(21), 8831-8846.
- Esteban, M.-D.; Aznar, A.; Fernández, P.S.; Palop, A. (2013) Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*. *Food Science and Technology International* 19(4), 357-364.
- Fakruddin, M.; Mazumder, R.M.; Mannan, K.S.B. (2011) Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)* 40(2), 121-131.
- FDA (2016) 21CFR120.24 – Title 21: Food and drugs (Volume 2). Chapter I: Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Subchapter B: Food for human consumption. Part 120: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) systems. Subpart B: Pathogen reduction. §120.24: Process controls. *Code of Federal Regulations*. U.S. Department of Health and Human Services: EE. UU. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action> (último acceso: 28/10/2016).
- Feio, C.A.; Izar, M.C.; Ihara, S.S.; Kasma, S.H.; Martins, C.M.; Feio, M.N.; Maués, L.A.; Borges, N.C.; Moreno, R.A.; Póvoa, R.M.; Fonseca, F.A. (2012) *Euterpe oleracea* (açai) modifies sterol metabolism and attenuates experimentally-induced atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 19(3), 237-245.
- Ferens, W.A.; Hovde, C.J. (2011) *Escherichia coli* O157:H7: Animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(4), 465-487.
- Fernandes, P.M.B.; Farina, M.; Kurtenbach, E. (2001) Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology* 32(1), 42-46.

- Ferrante, S.; Guerrero, S.; Alzamora, S.M. (2007) Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection* 70(8), 1850-1856.
- Ferrer, C.; Ramón, D.; Muguerza, B.; Marco, A.; Martínez, A. (2009) Effect of olive powder on the growth and inhibition of *Bacillus cereus*. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(1), 33-37.
- Feyaerts, J.; Rogiers, G.; Corthouts, J.; Michiels, C.W. (2015) Thiol-reactive natural antimicrobials and high pressure treatment synergistically enhance bacterial inactivation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 27, 26-34.
- Frye, D.M.; Zweig, R.; Sturgeon, J.; Tormey, M.; LeCavalier, M.; Lee, I.; Lawani, L.; Mascola, L. (2002) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases* 35(8), 943-949.
- Galvagno, M.A.; Gil, G.R.; Iannone, L.J.; Cerrutti, P. (2007) Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process. *Revista Argentina Microbiología* 39(3), 170-176.
- Gandhi, M.; Chikindas, M.L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113(1), 1-15.
- Gänzle, M.G.; Weber, S.; Hammes, W.P. (1999) Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* 46(3), 207-217.
- García, D.; Gómez, N.; Mañas, P.; Condón, S.; Raso, J.; Pagán, R. (2005) Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology* 99(1), 94-104.
- Garcia, R.; Alves, E.S.S.; Santos, M.P.; Aquije, G.M.F.V.; Fernandes, A.A.R.; Santos, R.B. dos; Ventura, J.A.; Fernandes, P.M.B. (2008) Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(1), 163-168.
- García, R.M.; Zurera, G. (2004) Modelización predictiva de desarrollo bacteriano en los alimentos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 17(1), 61-78.
- García-Graells, C.; Opstal, I. van; Vanmuysen, S.C.M.; Michiels, C.W. (2003) The lactoperoxidase system increases efficacy of high-pressure inactivation of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 81(3), 211-221.
- Garcia-Palazon, A.; Suthanthangjai, W.; Kajda, P.; Zabetakis, I. (2004) The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria* \times *ananassa*). *Food Chemistry* 88(1), 7-10.
- Garrido, V.; García-Jalón, I.; Vitas, A.I. (2010) Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control* 21(6), 896-901.
- Geeraerd, A.H.; Valdramidis, V.P.; Impe, J.F. van (2005) GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102(1), 95-105.
- Georgé, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M.J. (2005) Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5), 1370-1373.

- Gervilla, R.; Capellas, M.; Ferragut, V.; Guamis, B. (1997) Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *Journal of Food Protection* 60(1), 33-37.
- Ghosh, S.; Subudhi, E.; Nayak, S. (2008) Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *International Journal of Integrative Biology* 2(1), 27-31.
- Gibson, A.M.; Bratchell, N.; Roberts, T.A. (1988) Predicting microbial growth: Growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology* 6(2), 155-178.
- Giner, J.; Gimeno, V.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Martín, O. (2001) Effects of pulsed electric field processing on apple and pear polyphenoloxidases. *Food Science and Technology International* 7(4), 339-345.
- González-Cebrino, F.; Durán, R.; Delgado-Adámez, J.; Contador, R.; Ramírez, R. (2013) Changes after high-pressure processing on physicochemical parameters, bioactive compounds, and polyphenol oxidase activity of red flesh and peel plum purée. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 20, 34-41.
- Gordon, A.; Cruz, A.P.G.; Cabral, L.M.C.; Freitas, S.C. de; Taxi, C.M.A.D.; Donangelo, C.M.; Mattietto, R. de A.; Friedrich, M.; Matta, V.M. da; Marx, F. (2012) Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food Chemistry* 133(2), 256-263.
- Gospavic, R.; Kreyenschmidt, J.; Bruckner, S.; Popov, V.; Haque, N. (2008) Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology* 127(3), 290-297.
- Goulet, V.; Rocourt, J.; Rebiere, I.; Jacquet, C.; Moyses, C.; Dehaumont, P.; Salvat, G.; Veit, P. (1998) Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *The Journal of Infectious Diseases* 177(1), 155-160.
- Goyal, S.K.; Samsher, Goyal, R.K. (2010) *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61(1), 1-10.
- Granato, D.; Calado, V.M. de A. (2014) The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. En: Granato, D.; Ares, G. (Eds.) *Mathematical and statistical methods in food science and technology*. Wiley-Blackwell: Reino Unido, pp. 3-18.
- Gupta, E.; Purwar, S.; Sundaram, S.; Rai, G.K. (2013) Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(46), 3343-3353.
- Gupta, S.; Cox, S.; Rajauria, G.; Jaiswal, A.K.; Abu-Ghannam, N. (2012) Growth inhibition of common food spoilage and pathogenic microorganisms in the presence of brown seaweed extracts. *Food and Bioprocess Technology* 5(5), 1907-1916.
- Gurtler, J.B.; Rivera, R.B.; Zhang, H.Q.; Gevecke, D.J. (2010) Selection of surrogate bacteria in place of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium for pulsed electric field treatment of orange juice. *International Journal of Food Microbiology* 139(1-2), 1-8.
- Gutiérrez, Á.; Ledesma, L.; García, I.; Grajalas, O. (2007) Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública* 33(1), 1-7.
- Gutiérrez-Larraínzar, M.; Rua, J.; Caro, I.; Castro, C. de; Arriaga, D. de; García-Arместo, M.R.; Valle, P. del (2012) Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control* 26(2), 555-563.

- Hashizume, C.; Kimura, K.; Hayashi, R. (1995) Kinetic analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperatures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59(8), 1455-1458.
- Hauben, K.J.A.; Bernaerts, K.; Michiels, C.W. (1998) Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *Journal of Applied Microbiology* 85(4), 678-684.
- Hayes, A.J.; Markovic, B. (2002) Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 40(4), 535-543.
- Helander, I.M.; Alakomi, H.-L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; Gorris, L.G.M.; Wright, A. von (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9), 3590-3595.
- Hendrickx, M.; Ludikhuyze, L.; Broeck, I. van den; Weemaes, C. (1998) Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology* 9(5), 197-203.
- Hernández, P.E. (2010) Bacterias patógenas emergentes transmisibles por los alimentos. En: Sanz, B. (Ed.) *Monografía XXXI: Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros*. Real Academia Nacional de Farmacia: España, pp. 147-179.
- Hite, B.H. (1899) The effect of pressure in the preservation of milk. *Bulletin of the West Virginia University Agricultural Experiment Station* 58, 15-35.
- Hite, B.H.; Giddings, N.J.; Weakley, C.E., Jr. (1914) The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *Bulletin of the West Virginia University Agricultural Experiment Station* 146, 1-67.
- Holley, R.A.; Patel, D. (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22(4), 273-292.
- Honish, L.; Predy, G.; Hislop, N.; Chui, L.; Kowalewska-Grochowska, K.; Trotter, L.; Kreplin, C.; Zazulak, I. (2005) An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health* 96(3), 182-184.
- Horiguchi, T.; Ishiguro, N.; Chihara, K.; Ogi, K.; Nakashima, K.; Sada, K.; Hori-Tamura, N. (2011) Inhibitory effect of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp on IgE-mediated mast cell activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(10), 5595-5601.
- Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. (2012) Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3(12), 1-24.
- INFOSAN (2006) *Prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos: Las cinco claves para la inocuidad de los alimentos*. OMS/FAO, 4 pp.
- İşcan, G.; Kirimer, N.; Kürkcüoğlu, M.; Başer, K.H.C.; Demirci, F. (2002) Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(14), 3943-3946.
- Jadhav, S.; Shah, R.; Bhave, M.; Palombo, E.A. (2013) Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control* 29(1), 125-130.
- Jayaraman, S.; Manoharan, M.S.; Illanchezian, S. (2008) *In-vitro* antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(4), 1143-1149.
- JECFA (2009) *Safety evaluation of certain food additives*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Suiza.

- Jeppesen, P.B.; Gregersen, S.; Poulsen, C.R.; Hermansen, K. (2000) Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K^+ -channel activity. *Metabolism* 49(2), 208-214.
- Jia, H.; Gao, Z.; Ma, Y.; Zhong, C.; Xie, Y.; Zhou, H.; Wei, P. (2013) Optimization of phenoxazinone synthase production by response surface methodology and its application in Congo red decolourization. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(5), 1-13.
- Johnsen, B.O.; Lingaas, E.; Torfoss, D.; Strøm, E.H.; Nordøy, I. (2010) A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital. *Journal of Infection* 61(6), 465-470.
- Jung, L.-S.; Lee, S.H.; Kim, S.; Ahn, J. (2013) Effect of high hydrostatic pressure on the quality-related properties of carrot and spinach. *Food Science and Biotechnology* 22(S), 189-195.
- Junttila, J.; Brander, M. (1989) *Listeria monocytogenes* septicemia associated with consumption of salted mushrooms. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 21(3), 339-342.
- Kabuki, T.; Nakajima, H.; Arai, M.; Ueda, S.; Kuwabara, Y.; Dosako, S. (2000) Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry* 71(1), 61-66.
- Kalemba, D.; Kunicka, A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10(10), 813-829.
- Karatzas, A.K.; Kets, E.P.W.; Smid, E.J.; Bennik, M.H.J. (2001) The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology* 90(3), 463-469.
- Kim, J.; Marshall, M.R.; Wei, C.-i. (1995) Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(11), 2839-2845.
- Kiskó, G.; Roller, S. (2005) Carvacrol and *p*-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiology* 5(1), 36 (9 pp.).
- Knowles, J.R.; Roller, S.; Murray, D.B.; Naidu, A.S. (2005) Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2), 797-803.
- Köksal, E.; Gülçin, İ. (2008) Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) buds. *Protein & Peptide Letters* 15(4), 320-326.
- Kooper, G. (2009) Estudio de caso – Enfermedades transmitidas por alimentos en Costa Rica. En: Rosell, C.; Mejía, D. (Eds.) *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. FAO: Italia, pp. 13-66.
- Koyama, E.; Kitazawa, K.; Otori, Y.; Izawa, O.; Kakegawa, K.; Fujino, A.; Ui, M. (2003) In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology* 41(3), 359-374.
- Kraska, R.C.; McQuate, R.S.; Kapp, R.W., Jr (2012) *GRAS Notice (GRN) No. 448*. FDA, 63 pp.
- Lado, B.H.; Yousef, A.E. (2002) Alternative food-preservation technologies: Efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection* 4(4), 433-440.
- Laguerre, O.; Derens, E.; Palagos, B. (2002) Study of domestic refrigerator temperature and analysis of factors affecting temperature: A French survey. *International Journal of Refrigeration* 25(5), 653-659.

- Laguerre, O.; Hoang, H.M.; Flick, D. (2013) Experimental investigation and modelling in the food cold chain: Thermal and quality evolution. *Trends in Food Science & Technology* 29(2), 87-97.
- Laidler, M.R.; Tourdjman, M.; Buser, G.L.; Hostetler, T.; Repp, K.K.; Leman, R.; Samadpour, M.; Keene, W.E. (2013) *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. *Clinical Infectious Diseases* 57(8), 1129-1134.
- Lanciotti, R.; Gianotti, A.; Patrignani, F.; Belletti, N.; Guerzoni, M.E.; Gardini, F. (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology* 15(3-4), 201-208.
- Larraín, D.; Abarzúa, F.; Jourdan, F. de; Merino, P.; Belmar, C.; García, P. (2008) Infecciones por *Listeria monocytogenes* en mujeres embarazadas: Experiencia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. *Revista Chilena de Infectología* 25(5), 336-341.
- Leistner, L. (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55(1-3), 181-186.
- Leistner, L.; Gorris, L.G.M. (1995) Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology* 6(2), 41-46.
- Lian, P.Y.; Maseko, T.; Rhee, M.; Ng, K. (2012) The antimicrobial effects of cranberry against *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Technology International* 18(2), 179-186.
- Lim, J.Y.; Yoon, J.W.; Hovde, C.J. (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(1), 5-14.
- Lim, S.-W.; Kim, S.-W.; Lee, S.-C.; Yuk, H.-G. (2013) Exposure of *Salmonella* Typhimurium to guava extracts increases their sensitivity to acidic environments. *Food Control* 33(2), 393-398.
- Linscott, A.J. (2011) Food-borne illnesses. *Clinical Microbiology Newsletter* 33(6), 41-45.
- Lis-Balcin, M.; Ochocka, R.J.; Deans, S.G.; Asztemborska, M.; Hart, S. (1999) Differences in bioactivity between the enantiomers of α -pinene. *Journal of Essential Oil Research* 11(3), 393-397.
- Liu, Y.; Zhao, X.Y.; Zou, L.; Hu, X.S. (2013) Effect of high hydrostatic pressure on overall quality parameters of watermelon juice. *Food Science and Technology International* 19(3), 197-207.
- Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C.A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira, P. (2008) *Molecular cell biology* (6.^a ed.). W.H. Freeman and Company: EE. UU.
- MacDonald, D.M.; Fyfe, M.; Paccagnella, A.; Trinidad, A.; Louie, K.; Patrick, D. (2004) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiology & Infection* 132(2), 283-289.
- Machado, T. de B.; Leal, I.C.R.; Amaral, A.C.F.; Santos, K.R.N. dos; Silva, M.G. da; Kuster, R.M. (2002) Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13(5), 606-610.
- Mafart, P.; Couvert, O.; Gaillard, S.; Leguerinel, I. (2002) On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72(1-2), 107-113.
- Manzoor, M.; Naseer, S.; Jabeen, R.; Manzoor, M. (2013) Antibacterial activity of fruits against *Escherichia coli*. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science* 8(3), 258-263.

- Mañas, P.; Mackey, B.M. (2004) Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: Relationship with cell death. *Applied and Environmental Microbiology* 70(3), 1545-1554.
- Mateus, T.; Silva, J.; Maia, R.L.; Teixeira, P. (2013) Listeriosis during pregnancy: A public health concern. *ISRN Obstetrics and Gynecology* 2013, 1-6.
- McKellar, R.C.; Lu, X. (2004) Primary models. En: McKellar, R.C.; Lu, X. (Eds.) *Modeling microbial responses in food*. CRC Press: EE. UU., pp. 21-62.
- McMeekin, T.A.; Olley, J.N.; Ross, T.; Ratkowsky, D.A. (1993) *Predictive microbiology: Theory and application*. Research Studies Press/John Wiley & Sons: Reino Unido.
- Mead, P.S.; Dunne, E.F.; Graves, L.; Wiedmann, M.; Patrick, M.; Hunter, S.; Salehi, E.; Mostashari, F.; Craig, A.; Mshar, P.; Bannerman, T.; Sauders, B.D.; Hayes, P.; Dewitt, W.; Sparling, P.; Griffin, P.; Morse, D.; Slutsker, L.; Swaminathan, B. (2006) Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology & Infection* 134(4), 744-751.
- Melhorança Filho, A.L.; Pereira, M.R.R. (2012) Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. *Bioscience Journal* 28(4), 598-603.
- Membré, J.-M.; Lambert, R.J.W. (2008) Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 128(1), 10-15.
- Mendes, G.C.; Brandão, T.R.S.; Silva, C.L.M. (2011) Modeling the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by ethylene oxide processing. *Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology* 38(9), 1535-1543.
- Mertens-Talcott, S.U.; Rios, J.; Jilma-Stohlawetz, P.; Pacheco-Palencia, L.A.; Meibohm, B.; Talcott, S.T.; Derendorf, H. (2008) Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açaí juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(17), 7796-7802.
- Metrick, C.; Hoover, D.G.; Farkas, D.F. (1989) Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science* 54(6), 1547-1549.
- Michino, H.; Araki, K.; Minami, S.; Takaya, S.; Sakai, N.; Miyazaki, M.; Ono, A.; Yanagawa, H. (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology* 150(8), 787-796.
- Miettinen, M.K.; Siitonen, A.; Heiskanen, P.; Haajanen, H.; Björkroth, K.J.; Korkeala, H.J. (1999) Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *Journal of Clinical Microbiology* 37(7), 2358-2360.
- Montgomery, D.C. (2004) *Diseño y análisis de experimentos* (2.ª ed.). Limusa Wiley: México.
- Morgan, S.M.; Ross, R.P.; Beresford, T.; Hill, C. (2000) Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology* 88(3), 414-420.
- Moura, R.S. de; Ferreira, T.S.; Lopes, A.A.; Pires, K.M.P.; Nesi, R.T.; Resende, A.C.; Souza, P.J.C.; Silva, A.J.R. da; Borges, R.M.; Porto, L.C.; Valença, S.S. (2012) Effects of *Euterpe*

- oleracea* Mart. (AÇÁÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine* 19(3-4), 262-269.
- Moussa, M.; Perrier-Cornet, J.-M.; Gervais, P. (2007) Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 73(20), 6508-6518.
- Muanda, F.N.; Soulimani, R.; Diop, B.; Dicko, A. (2011) Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology* 44(9), 1865-1872.
- Muñoz-Cuevas, M.; Guevara, L.; Aznar, A.; Martínez, A.; Periago, P.M.; Fernández, P.S. (2013) Characterisation of the resistance and the growth variability of *Listeria monocytogenes* after high hydrostatic pressure treatments. *Food Control* 29(2), 409-415.
- Muriel-Galet, V.; Cerisuelo, J.P.; López-Carballo, G.; Lara, M.; Gavara, R.; Hernández-Muñoz, P. (2012) Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology* 157(2), 195-201.
- Mussio, P.; Martínez, I.; Soumastre, M.; Maquieira, A.M. (2014) Validación de la detección de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) en hamburguesas crudas mediante el uso de PCR a tiempo real (BAX[®] System Q7, DuPont) utilizando «WET POOLS». *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay* 9, 75-83.
- NACMCF (2006) Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *Journal of Food Protection* 69(5), 1190-1216.
- NACMCF (2010) Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. *Journal of Food Protection* 73(1), 140-202.
- Neida, S.; Elba, S. (2007) Caracterización del acai o manaca (*Euterpe olerácea* Mart.): Un fruto del Amazonas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(1), 94-98.
- Newell, D.G.; Koopmans, M.; Verhoef, L.; Duizer, E.; Aidara-Kane, A.; Sprong, H.; Opsteegh, M.; Langelaar, M.; Threfall, J.; Scheutz, F.; Giessen, J. van der; Kruse, H. (2010) Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology* 139(Supplement), S3-S15.
- Nørrung, B. (2000) Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. *International Journal of Food Microbiology* 62(3), 217-221.
- OMS; FAO (2003) *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases – Report of a joint WHO/FAO expert consultation*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Suiza.
- Onawunmi, G.O. (1989) Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology* 9(3), 105-108.
- Ortuño, C.; Martínez-Pastor, M.T.; Mulet, A.; Benedito, J. (2012) Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *The Journal of Supercritical Fluids* 63, 8-15.
- Osada, N.; Kohara, A.; Yamaji, T.; Hirayama, N.; Kasai, F.; Sekizuka, T.; Kuroda, M.; Hanada, K. (2014) The genome landscape of the African green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Research* 21(6), 673-683.
- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10), 4619-4626.
- Oxen, P.; Knorr, D. (1993) Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *LWT - Food Science and Technology* 26(3), 220-223.

- Pacheco-Palencia, L.A.; Mertens-Talcott, S.; Talcott, S.T. (2008) Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(12), 4631-4636.
- Pagán, R.; Mackey, B. (2000) Relationship between membrane damage and cell death in pressure-treated *Escherichia coli* cells: Differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7), 2829-2834.
- Park, S.W.; Sohn, K.H.; Shin, J.H.; Lee, H.J. (2001) High hydrostatic pressure inactivation of *Lactobacillus viridescens* and its effects on ultrastructure of cells. *International Journal of Food Science and Technology* 36(7), 775-781.
- Parsayee, S.A.; Zonuz, A.A.; Zadeh, B.G.; Ayase, A. (2013) Low calorie sour cherry jam: Optimization of ingredient levels using response surface methodology. *International Journal of Applied Science and Engineering Research* 2(1), 35-43.
- Patterson, M.F. (2005) Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* 98(6), 1400-1409.
- Patterson, M.F.; Kilpatrick, D.J. (1998) The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection* 61(4), 432-436.
- Patterson, M.F.; Linton, M. (2010) "Pasteurización" de alimentos por altas presiones. En: Instituto Tomás Pascual Sanz para la Nutrición y la Salud; Universidad de Burgos (Eds.) *Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos*. International Marketing and Communication: España, pp. 59-72.
- Peleg, M. (2000) Microbial survival curves – The reality of flat "shoulders" and absolute thermal death times. *Food Research International* 33(7), 531-538.
- Peleg, M.; Cole, M.B. (1998) Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(5), 353-380.
- Pérez-Rodríguez, F.; Valero, A. (2013) *Predictive microbiology in foods*. Springer: EE. UU.
- Periago, P.M.; Conesa, R.; Delgado, B.; Fernández, P.S.; Palop, A. (2006) *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology* 44(1), 17-23.
- Periago, P.M.; Delgado, B.; Fernández, P.S.; Palop, A. (2004) Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions. *Journal of Food Protection* 67(7), 1408-1416.
- Periago, P.M.; Palop, A.; Fernández, P.S. (2001) Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science and Technology International* 7(6), 487-492.
- Perrier-Cornet, J.-M.; Hayert, M.; Gervais, P. (1999) Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: Occurrence of cell membrane permeabilization. *Journal of Applied Microbiology* 87(1), 1-7.
- Perrier-Cornet, J.-M.; Tapin, S.; Gaeta, S.; Gervais, P. (2005) High-pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* at subzero temperatures. *Journal of Biotechnology* 115(4), 405-412.
- Pilavtepe-Çelik, M. (2013) High hydrostatic pressure (HHP) inactivation of foodborne pathogens in low-acid juices. *International Journal of Food Science and Technology* 48(4), 673-677.
- Pina-Pérez, M.C.; García-Fernández, M.M.; Rodrigo, D.; Martínez-López, A. (2010) Monte Carlo simulation as a method to determine the critical factors affecting two strains of *Escherichia*

- coli* inactivation kinetics by high hydrostatic pressure. *Foodborne Pathogens and Disease* 7(4), 459-466.
- Pina-Pérez, M.C.; Martínez-López, A.; Rodrigo, D. (2012) Cinnamon antimicrobial effect against *Salmonella typhimurium* cells treated by pulsed electric fields (PEF) in pasteurized skim milk beverage. *Food Research International* 48(2), 777-783.
- Pina-Pérez, M.C.; Silva-Angulo, A.B.; Muguera-Marquinez, B.; Rodrigo, D.; Martínez, A. (2009) Synergistic effect of high hydrostatic pressure and natural antimicrobials on inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a liquid whole egg and skim milk mixed beverage. *Foodborne Pathogens and Disease* 6(6), 649-656.
- Pol, I.E.; Smid, E.J. (1999) Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 29(3), 166-170.
- Pomerleau, J.; Lock, K.; Knai, C.; McKee, M. (2005) Effectiveness of interventions and programmes promoting fruit and vegetable intake. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Suiza.
- Ponce, E.; Pla, R.; Sendra, E.; Guamis, B.; Mor-Mur, M. (1999) Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: Comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology* 16(4), 357-365.
- Pozo-Insfran, D. del; Percival, S.S.; Talcott, S.T. (2006) Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(4), 1222-1229.
- Quaglia, G.B.; Gravina, R.; Paperi, R.; Paoletti, F. (1996) Effect of high pressure treatments on peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green peas. *LWT - Food Science and Technology* 29(5-6), 552-555.
- RAE (2014) *Diccionario de la lengua española* (23.^a ed.). Espasa Libros: España.
- Ramos-Villarreal, A.Y.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. (2011) Natural antimicrobials for food processing. En: Hemming, D. (Ed.) *Animal science reviews 2010*. CABI: Reino Unido, pp. 211-227.
- Rao, L.; Guo, X.; Pang, X.; Tan, X.; Liao, X.; Wu, J. (2014) Enzyme activity and nutritional quality of peach (*Prunus persica*) juice: Effect of high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Properties* 17(6), 1406-1417.
- Raso, J.; Barbosa-Cánovas, G.V. (2003) Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(3), 265-285.
- Rastogi, N.K.; Raghavarao, K.S.M.S.; Balasubramaniam, V.M.; Niranjana, K.; Knorr, D. (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(1), 69-112.
- Rattanachaiyapong, P.; Phumkhachorn, P. (2010) Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110(5), 614-619.
- Raventós, M. (2005) *Industria alimentaria: Tecnologías emergentes*. Edicions UPC: España.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26(9-10), 1231-1237.
- Rendueles, E.; Omer, M.K.; Alvseike, O.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R.; Prieto, M. (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology* 44(5), 1251-1260.

- Riley, L.W.; Remis, R.S.; Helgerson, S.D.; McGee, H.B.; Wells, J.G.; Davis, B.R.; Hebert, R.J.; Olcott, E.S.; Johnson, L.M.; Hargrett, N.T.; Blake, P.A.; Cohen, M.L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine* 308(12), 681-685.
- Rivalain, N.; Roquain, J.; Demazeau, G. (2010) Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. *Biotechnology Advances* 28(6), 659-672.
- Rocourt, J.; Cossart, P. (1997) *Listeria monocytogenes*. En: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (Eds.) *Microbiología de los alimentos*. Acirbia: España, pp. 355-370.
- Rodrigo, C.; Rodrigo, M.; Alvarruiz, A.; Frígola, A. (1996) Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase. *Journal of Food Protection* 59(10), 1065-1071.
- Rodríguez, M.E.; López, A. (2013) Stevia: Una planta de hojas dulces. *La Unión de Morelos*, p. 39. Disponible en: <http://www.acmor.org.mx/?q=content/stevia-una-planta-de-hojas-dulces> (último acceso: 28/10/2016).
- Rojano, B.A.; Zapata, I.C.; Alzate, A.F.; Mosquera, A.J.; Cortés, F.B.; Gamboa, L. (2011) Polifenoles y actividad antioxidante del fruto liofilizado de palma naidi (açai colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 64(2), 6213-6220.
- Ross, T. (1996) Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81(5), 501-508.
- Ross, T.; McMeekin, T.A. (1994) Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 23(3-4), 241-264.
- Saddiq, A.A.; Khayyat, S.A. (2010) Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98(1), 89-93.
- Sakanaka, S.; Juneja, L.R.; Taniguchi, M. (2000) Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90(1), 81-85.
- Salamina, G.; Donne, E.D.; Niccolini, A.; Poda, G.; Cesaroni, D.; Bucci, M.; Fini, R.; Maldini, M.; Schuchat, A.; Swaminathan, B.; Bibb, W.; Rocourt, J.; Binkin, N.; Salmaso, S. (1996) A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology & Infection* 117(3), 429-436.
- Sampath, P.B.; Hegde, M.N.; Hegde, P. (2011) Assessment of antibacterial properties of newer dentin bonding agents: An *in vitro* study. *Contemporary Clinical Dentistry* 2(3), 165-169.
- San Martín, M.F.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Swanson, B.G. (2002) Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42(6), 627-645.
- Sartz, L.; De Jong, B.; Hjertqvist, M.; Plym-Forshell, L.; Alsterlund, R.; Löfdahl, S.; Osterman, B.; Ståhl, A.; Eriksson, E.; Hansson, H.-B.; Karpman, D. (2008) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology & Infection* 136(3), 370-380.
- Savita, S.M.; Sheela, K.; Sunanda, S.; Shankar, A.G.; Ramakrishna, P. (2004) *Stevia rebaudiana* – A functional component for food industry. *Journal of Human Ecology* 15(4), 261-264.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30(12), 3875-3883.

- Scallan, E.; Griffin, P.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Hoekstra, R.M. (2011a) Foodborne illness acquired in the United States – Unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases* 17(1), 16-22.
- Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe, R.V.; Widdowson, M.-A.; Roy, S.L.; Jones, J.L.; Griffin, P.M. (2011b) Foodborne illness acquired in the United States – Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17(1), 7-15.
- Schauss, A.G.; Wu, X.; Prior, R.L.; Ou, B.; Huang, D.; Owens, J.; Agarwal, A.; Jensen, G.S.; Hart, A.N.; Shanbrom, E. (2006a) Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(22), 8604-8610.
- Schauss, A.G.; Wu, X.; Prior, R.L.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J.P. (2006b) Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(22), 8598-8603.
- Schlech, W.F., III; Lavigne, P.M.; Bortolussi, R.A.; Allen, A.C.; Haldane, E.V.; Wort, A.J.; Hightower, A.W.; Johnson, S.E.; King, S.H.; Nicholls, E.S.; Broome, C.V. (1983) Epidemic listeriosis – Evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medicine* 308(4), 203-206.
- Seema, T. (2010) *Stevia rebaudiana*: A medicinal and nutraceutical plant and sweet gold for diabetic patients. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences* 1(8), 451-457.
- Sergelidis, D.; Abraham, A.; Sarimvei, A.; Panoulis, C.; Karaioannoglou, P.; Genigeorgis, C. (1997) Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 34(2), 171-177.
- Shah, B.; Davidson, P.M.; Zhong, Q. (2012) Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. *Applied and Environmental Microbiology* 78(23), 8448-8453.
- Shan, B.; Cai, Y.-Z.; Brooks, J.D.; Corke, H. (2007) The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117(1), 112-119.
- Shimada, S.; Andou, M.; Naito, N.; Yamada, N.; Osumi, M.; Hayashi, R. (1993) Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40(1), 123-131.
- Shinagawa, F.B.; Deliza, R.; Rosenthal, A.; Zarur, M.A. (2013) Pressão hidrostática nos atributos sensoriais do néctar de mamão. *Ciência Rural* 43, 1898-1904.
- Sim, J.; Hood, D.; Finnie, L.; Wilson, M.; Graham, C.; Brett, M.; Hudson, J.A. (2002) Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology* 35(5), 409-413.
- Simha, B.V.; Sood, S.K.; Kumariya, R.; Garsa, A.K. (2012) Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research* 167(9), 544-549.
- Simpson, R.K.; Gilmour, A. (1997) The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology* 83(2), 181-188.
- Singh, P.; Shukla, R.; Prakash, B.; Kumar, A.; Singh, S.; Mishra, P.K.; Dubey, N.K. (2010) Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima*

- Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology* 48(6), 1734-1740.
- Siroli, L.; Patrignani, F.; Serrazanetti, D.I.; Tabanelli, G.; Montanari, C.; Tappi, S.; Rocculi, P.; Gardini, F.; Lanciotti, R. (2015) Potential of natural antimicrobials for the production of minimally processed fresh-cut apples. *Journal of Food Processing & Technology* 6(2), 1-9.
- Sivaram, L.; Mukundan, U. (2003) *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 39(5), 520-523.
- Smelt, J.P.P.M.; Rijke, A.G.F.; Hayhurst, A. (1994) Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research* 12(4-6), 199-203.
- Somolinos, M.; García, D.; Condón, S.; Mackey, B.; Pagán, R. (2009) Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology* 108(6), 1928-1939.
- Somolinos, M.; García, D.; Pagán, R.; Mackey, B. (2008) Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or *tert*-butyl hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology* 74(24), 7570-7577.
- Sun, X.; Seeberger, J.; Alberico, T.; Wang, C.; Wheeler, C.T.; Schauss, A.G.; Zou, S. (2010) Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Experimental Gerontology* 45(3), 243-251.
- Sutton, S. (2011) Accuracy of plate counts. *Journal of Validation Technology* 17(3), 42-46.
- Tadhani, M.B.; Subhash, R. (2006) *In vitro* antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5(1), 557-560.
- Tarr, P.I.; Gordon, C.A.; Chandler, W.L. (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* 365(9464), 1073-1086.
- Techathuvanan, C.; Reyes, F.; David, J.R.D.; Davidson, P.M. (2014) Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection* 77(2), 269-275.
- Télliz-Luis, S.J.; Ramírez, J.A.; Pérez-Lamela, C.; Vázquez, M.; Simal-Gándara, J. (2001) Aplicación de alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3(2), 66-80.
- Tennant, D.R.; Davidson, J.; Day, A.J. (2014) Phytonutrient intakes in relation to European fruit and vegetable consumption patterns observed in different food surveys. *British Journal of Nutrition* 112(7), 1214-1225.
- Tholozan, J.L.; Ritz, M.; Jugiau, F.; Federighi, M.; Tissier, J.P. (2000) Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology* 88(2), 202-212.
- Ting, E.; Balasubramaniam, V.M.; Raghubeer, E. (2002) Determining thermal effects in high-pressure processing. *Food Technology* 56(2), 31-35.
- Tiwari, B.K.; Valdramidis, V.P.; O'Donnell, C.P.; Muthukumarappan, K.; Bourke, P.; Cullen, P.J. (2009) Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(14), 5987-6000.
- TNS (2007) *Consumer attitudes to food standards (Wave 7)*. FSA/COI, 124 pp.
- Tomás-Barberán, F.; Espín, J.C. (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(9), 853-876.
- Tsigarida, E.; Skandamis, P.; Nychas, G.-J.E. (2000) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere

- packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology* 89(6), 901-909.
- Udani, J.K.; Singh, B.B.; Singh, V.J.; Barrett, M.L. (2011) Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. *Nutrition Journal* 10, 45 (7 pp.).
- Ultee, A.; Bennik, M.H.J.; Moezelaar, R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4), 1561-1568.
- Ultee, A.; Gorris, L.G.M.; Smid, E.J. (1998) Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 85(2), 211-218.
- Ultee, A.; Kets, E.P.W.; Smid, E.J. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(10), 4606-4610.
- Ultee, A.; Slump, R.A.; Steging, G.; Smid, E.J. (2000) Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection* 63(5), 620-624.
- Valero, A.; Carrasco, E.; Pérez-Rodríguez, F.; García-Gimeno, R.M.; Zurera, G. (2006) Growth/no growth model of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid. *European Food Research & Technology* 224(1), 91-100.
- Valero, A.; Rodríguez, M.; Carrasco, E.; Pérez-Rodríguez, F.; García-Gimeno, R.M.; Zurera, G. (2010) Studying the growth boundary and subsequent time to growth of pathogenic *Escherichia coli* serotypes by turbidity measurements. *Food Microbiology* 27(6), 819-828.
- Valero, M.; Giner, M.J. (2006) Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 106(1), 90-94.
- Velázquez-Nuñez, M.J.; Avila-Sosa, R.; Palou, E.; López-Malo, A. (2013) Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control* 31(1), 1-4.
- Veldhuizen, E.J.A.; Bokhoven, Bokhoven, J.L.M.T.-van; Zwijsen, C.; Burt, S.A.; Haagsman, H.P. (2006) Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(5), 1874-1879.
- Veldhuizen, E.J.A.; Creutzberg, T.O.; Burt, S.A.; Haagsman, H.P. (2007) Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in steak tartare. *Journal of Food Protection* 70(9), 2127-2132.
- Vera, L.; Zan, M.M. de; Cámara, M.S.; Goicoechea, H.C. (2014) Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods
- Walker, S.J.; Jones, J.E. (1993) Protocols for data generation for predictive modeling. *Journal of Industrial Microbiology* 12(3), 273-276.
- Walters, D.E. (2013) *The sweetener book*. Gale Walters Publishing: EE. UU.
- Wang, C.-Y.; Huang, H.-W.; Hsu, C.-P.; Shyu, Y.-T.; Yang, B.B. (2013) Inactivation and morphological damage of *Vibrio parahaemolyticus* treated with high hydrostatic pressure. *Food Control* 32(2), 348-353.
- Wang, R.; Wang, T.; Zheng, Q.; Hu, X.; Zhang, Y.; Liao, X. (2012) Effects of high hydrostatic pressure on color of spinach purée and related properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(7), 1417-1423.
- Wen, A.; Delaquis, P.; Stanich, K.; Toivonen, P. (2003) Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology* 20(3), 305-311.

- Wesche, A.M.; Gurtler, J.B.; Marks, B.P.; Ryser, E.T. (2009) Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 72(5), 1121-1138.
- Whiting, R.C.; Buchanan, R.L. (1993) A classification of models in predictive microbiology - A reply to K. R. Davey. *Food Microbiology* 10(2), 175-177.
- Wilkinson, J.M.; Hipwell, M.; Ryan, T.; Cavanagh, H.M.A. (2003) Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(1), 76-81.
- Wölwer-Rieck, U. (2012) The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(4), 886-895.
- Wouters, P.C.; Glaasker, E.; Smelt, J.P.P.M. (1998) Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2), 509-514.
- Wu, V.C.H. (2008) A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology* 25(6), 735-744.
- Wu, X.; Beecher, G.R.; Holden, J.M.; Haytowitz, D.B.; Gebhardt, S.E.; Prior, R.L. (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(12), 4026-4037.
- Xiong, R.; Xie, G.; Edmondson, A.E.; Sheard, M.A. (1999) A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 46(1), 45-55.
- Yadav, S.K.; Guleria, P. (2012) Steviol glycosides from Stevia: Biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(11), 988-998.
- Yaldagard, M.; Mortazavi, S.A.; Tabatabaie, F. (2008) The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology* 7(16), 2739-2767.
- Youseif, S.H.; El-Halwagi, A.; Sayed, H.A.; El-Itriby, H.A. (2014) Chemical analyses, antibacterial activity and genetic diversity assessment of some Egyptian *Citrus* spp. cultivars. *African Journal of Biotechnology* 13(26), 2626-2636.
- Zulueta, A.; Esteve, M.J.; Frígola, A. (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114(1), 310-316.
- Zwietering, M.H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F.M.; Riet, K. van't (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6), 1875-1881.

Publicaciones

Este listado recoge los artículos y capítulos de libro no derivados de congresos que se han publicado hasta la fecha de depósito de la tesis, con los resultados que se incluyen en la misma.

Artículos

Barba, F.J.; Criado, M.N.; Belda-Galbis, C.M.; Esteve, M.J.; Rodrigo, D. (2014) *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food Chemistry* 148:261-267.

Belda-Galbis, C.M.; Leufvén, A.; Rodrigo, D.; Martínez, A. (2014) Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. *Journal of Food Engineering* 141:37-43.

Belda-Galbis, C.M.; Pina-Pérez, M.C.; Espinosa, J.; Marco-Celdrán, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. (2014) Use of the modified Gompertz equation to assess the *Stevia rebaudiana* Bertoni antilisterial kinetics. *Food Microbiology* 38:56-61.

Belda-Galbis, C.M.; Jiménez-Carretón, A.; Pina-Pérez, M.C.; Martínez, A.; Rodrigo, D. (2015) Antimicrobial activity of açai against *Listeria innocua*. *Food Microbiology* 50:5-10.

Capítulos de libro

Belda-Galbis, C.M.; Leufvén, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. (2013) Quantitative assessment of citral antimicrobial potential at different temperatures. En: Méndez-Vilas, A. (Ed.) *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education (Volumen 2)*. Formatex Research Center: España, pp. 1257-1264.

Belda-Galbis, C.M.; Criado, N.M.; Martínez, A.; Rodrigo, D. (2015) *Stevia rebaudiana* Bertoni antimicrobial potential. En: Betancur-Ancona, D.; Segura-Campos, M. (Eds.) *Stevia rebaudiana: Chemical composition, uses and health promoting aspects*. Nova Science Publishers: EE. UU., pp. 117-130.

Criado, N.M.; Belda-Galbis, C.M.; Martínez, A.; Rodrigo, D. (2015) *Stevia rebaudiana* Bertoni antioxidant activity and its preservative potential combined with high hydrostatic pressure. En: Betancur-Ancona, D.; Segura-Campos, M. (Eds.) *Stevia rebaudiana: Chemical composition, uses and health promoting aspects*. Nova Science Publishers: EE. UU., pp. 77-94.