



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL FRENTE A VIRUS Y ESPORAS

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

ALUMNO/A: ANTONIO GARCÍA LORENTE
TUTORES ACADÉMICOS: ÉDGAR PÉREZ ESTEVE
ISABEL FERNÁNDEZ SEGOVIA

Curso Académico: 2019/2020
VALENCIA, Diciembre 2020

ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL FRENTE A VIRUS Y ESPORAS

Antonio García Lorente¹, Édgar Pérez Esteve¹, Isabel Fernández Segovia¹

RESUMEN

Los antimicrobianos naturales son una de las principales alternativas al uso de antimicrobianos sintéticos, los cuales han sido recientemente relacionados como causantes de intoxicaciones alimentarias y del desarrollo de resistencias en los microorganismos. La capacidad de estos compuestos de inhibición del crecimiento de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, en su forma vegetativa ha sido ampliamente evaluada en los últimos años. Sin embargo, pocos son los estudios que han analizado sus efectos sobre otros contaminantes presentes en los alimentos como son las bacterias esporuladas o los virus. En este trabajo se ha revisado el efecto de los antimicrobianos naturales sobre estos dos contaminantes biológicos encontrando que una elevada parte de los compuestos analizados han presentado cierto efecto antiviral, así como la capacidad de inhibir la germinación de esporas de varias especies bajo unas determinadas condiciones. Estos resultados indican que el rango de acción de estos compuestos frente a los microorganismos es muy amplio y tienen gran potencial como alternativa al uso de antimicrobianos sintéticos.

PALABRAS CLAVE: aditivos, antimicrobianos naturales, antivirales, esporas, inhibición del crecimiento, seguridad alimentaria, virus

RESUM

Els antimicrobians naturals són una de les principals alternatives a l'ús d'antimicrobians sintètics, els quals han estat recentment relacionats com a causants d'intoxicacions alimentàries i de el desenvolupament de resistències en els microorganismes. La capacitat d'aquests compostos d'inhibició de l'creixement de bacteris, tant Gram positives com Gram negatives, en la seva forma vegetativa ha estat àmpliament utilitzada en els darrers anys. No obstant això, pocs són els estudis que han analitzat els seus efectes sobre altres contaminants presents en els aliments com són els bacteris esporulades o els virus. En aquest treball s'ha revisat l'efecte dels antimicrobians naturals

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

sobre aquests dos contaminants biològics trobant que una part elevada dels compostos analitzats han presentat cert efecte antiviral, així com la capacitat d'inhibir la germinació d'espores de diverses espècies sota unes determinades condicions. Aquests resultats indiquen que el rang d'acció d'aquests compostos enfront dels microorganismes és molt ampli i tenen gran potencial com a alternativa a l'ús d'antimicrobians sintètics.

PARAULES CLAU: Additius, antimicrobians naturals, antivirals, espores, inhibició del creixement, seguretat alimentària, virus

ABSTRACT

Natural antimicrobials are one of the main alternatives to the use of synthetic antimicrobials, which have recently been linked to cause food poisoning and the development of resistance in microorganisms. The ability of these compounds to inhibit the growth of bacteria, both Gram positive and Gram negative, in their vegetative form has been widely used in recent years. However, few are the studies that have analyzed its effects on other contaminants present in food such as sporulated bacteria or viruses. In this work, the effect of natural antimicrobials on these two biological pollutants has been reviewed, finding that a high part of the compounds analyzed have shown a certain antiviral effect, as well as the ability to inhibit the germination of spores of various species under certain conditions. These results indicate that the range of action of these compounds against microorganisms is very wide and they have great potential as an alternative to the use of synthetic antimicrobials.

KEY WORDS: Additives, natural antimicrobials, antivirals, spores, growth inhibition, food safety, viruses

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años ha aumentado el número de personas que exigen productos alimentarios inocuos, saludables, de calidad y mínimamente procesados que mantengan en muchas ocasiones las características propias de los ingredientes que los forman. La industria alimentaria es consciente de este auge e invierte cada año millones de euros en mejorar sus procesos y sacar al mercado productos alimentarios que cubran las necesidades de la población. Uno de los aspectos más importantes y donde mayor inversión se realiza es en asegurar la inocuidad de los alimentos.

Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que las intoxicaciones alimentarias afectan cada año a 600 millones de personas y son las responsables de aproximadamente unos 420.000 fallecimientos al año. El grupo de población más sensible a este tipo de intoxicaciones son los menores de 5 años, donde se estima que el 40% de la población total ha enfermado (WHO, 2020).

Un gran número de las enfermedades transmitidas por alimentos son ocasionadas por virus, siendo superior a los casos asociados a parásitos y otras infecciones derivadas de la presencia de toxinas, pero inferior a las de origen bacteriano, que lideran las listas de incidencia (Anderson, 2005). Entre los principales virus causantes de intoxicaciones alimentarias se encuentran norovirus, rotavirus, adenovirus, enterovirus y el virus de la hepatitis A (Fos-Claver et al., 2000).

Los virus son microorganismos que están compuestos principalmente por un ácido nucleico (DNA o RNA) y una cápside (formada por subunidades proteicas o capsómeros), presentando en algunos casos una cubierta de lipopolisacáridos que envuelve la cápside. Estos microorganismos requieren de la infección de una célula huésped para que esta sintetice los componentes necesarios para la generación de nuevas partículas víricas, permitiendo así su proceso de replicación. No se debe considerar la infección como un sinónimo de enfermedad, ya que no siempre se producen daños o alteraciones en el huésped, incluso ante patógenos que presentan un elevado potencial virulento (Alcamí et al., 2006).

La principal sintomatología asociada a una intoxicación alimentaria de origen vírico es la gastroenteritis aguda, que puede estar acompañada de náuseas, vómitos, diarrea acuosa, febrícula, cefalea y malestar general. En los casos más graves se han identificado casos de meningitis aséptica, encefalitis e incluso la muerte del enfermo. Dependiendo del tipo de virus el periodo de incubación y del episodio pueden variar, siendo lo más frecuente un periodo de incubación de 24-48 horas y un episodio de 3 a 5 días, que se puede prolongar a 7-10 días en infecciones causadas por adenovirus (Fos-Claver et al., 2000).

La gastroenteritis aguda es causa de una elevada mortalidad en niños y ancianos en países en vías de desarrollo. En países desarrollados se estima que actualmente son los virus los principales causantes de las gastroenteritis agudas por encima de las de origen bacteriano y parasitológicos. Existe un cierto temor a que los casos de morbilidad y mortalidad observados en personas mayores a causa de los virus en los países en vías de desarrollo se

reproduzcan en países desarrollados donde se observa una tendencia al incremento de la población mayor ([Fos-Claver et al., 2000](#)).

Las principales fuentes de contaminación de los alimentos por virus son a través de una contaminación ambiental producida en alguna etapa previa a su recolección o debido a una manipulación inadecuada a través de prácticas higiénicas deficientes. En consecuencia, los virus transmitidos por los alimentos se han convertido en una de las mayores preocupaciones tanto para la industria alimentaria, como para los organismos reguladores. La creación de métodos de detección para virus ha ayudado a vincular un número mayor de infecciones al consumo de alimentos contaminados ([Bosch et al., 2018](#)).

Los controles que se realizan en la industria alimentaria juegan un papel clave en el aseguramiento de la inocuidad de los productos que llegan a los consumidores. Los principales métodos utilizados para eliminar los microorganismos patógenos están enfocados principalmente a la aplicación de métodos físicos, químicos o la combinación de ambos, basándose en datos científicos que aseguran la eliminación de las formas de vida más resistentes ante condiciones externas adversas como son las esporas ([Huesca-Espitia et al., 2014](#)).

Algunos microorganismos presentan la capacidad de esporular, lo que les permite la supervivencia en medios hostiles mediante de la formación de una spora o endospora de alta resistencia a los agentes físico-químicos. Una vez se han establecido condiciones favorables para su desarrollo se produce la germinación de la spora dando lugar a una célula vegetativa. Según la procedencia de las esporas, estas presentan unas determinadas características propias. Las esporas procedentes de bacterias presentan función reproductora y protectora frente agentes externos, mientras que las esporas de origen fúngico únicamente presentan función reproductora ([Macedo y Vola, 2008](#)).

Los tratamientos térmicos en condiciones de esterilización son la metodología más utilizada para asegurar la eliminación total de las formas de vida presentes en los alimentos, incluidas las esporas. Pero estos tratamientos ocasionan a su vez, la pérdida de componentes bioactivos de gran interés nutricional y de prevención de algunos tipos de enfermedades, como son las vitaminas ([Marsanasco et al., 2011](#)) o componentes fenólicos ([Roy et. al., 2007](#); [De Paepe et al., 2014](#)), entre otros compuestos termolábiles.

Las pérdidas de componentes con efectos saludables, junto con la demanda de la población de la salida al mercado de productos seguros, pero con un menor contenido en conservantes químicos ha ocasionado un fuerte desarrollo de nuevas metodologías para el procesado de productos, así como, la sustitución de sustancias químicas sintéticas por otros compuestos inocuos, como pueden ser los antimicrobianos de origen natural ([Calo, 2015](#)).

[Abdelhamid y El-Dougdoug \(2020\)](#) consideraron que la aplicación de tecnologías físicas no térmicas (irradiación, altas presiones, ultrasonidos...) en conjunto con antimicrobianos naturales podría ocasionar una alta letalidad a la vez que podían preservar los compuestos termolábiles de los alimentos y sus propiedades sensoriales.

Existe un elevado número de estudios enfocados a demostrar los efectos de los antimicrobianos naturales sobre gran variedad de bacterias vegetativas presentes en los alimentos. Sin embargo, su efecto sobre otros microorganismos causantes de enfermedades no ha sido tan estudiado. Es por ello que su efecto antimicrobiano sobre otros contaminantes biológicos como son los virus o las bacterias esporuladas no es tan conocida y requiere de su análisis.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue recopilar información y analizar el efecto de los antimicrobianos naturales frente a contaminantes biológicos presentes en los alimentos como son las bacterias esporuladas y los virus, mediante la realización de una revisión bibliográfica de la documentación científica existente.

3. METODOLOGÍA

La metodología empleada para la realización de este trabajo se ha basado en la búsqueda de documentación científica presente en bases de datos científicas (Science Direct, Scopus y SciELO), buscadores académicos (Google Scholar y PoliformaT) o datos oficiales publicados por organizaciones, tanto a nivel nacional como internacional (WHO).

Los conceptos empleados como palabras clave en la búsqueda fueron los siguientes: “natural antimicrobial” “virus” “spores” “bacteria” “antimicrobial effect” “antimicrobial activity” “food poisoning” “enzymes” “additives” “polysaccharides” “peptides” “phenolic compounds” “essential oils” “bactericins” “aldehydes” “antiviral activity” y “antiviral effect”. Estos conceptos fueron utilizados tanto en inglés como en español según la fuente a consultar. Las búsquedas se realizaron mediante el uso de un solo concepto o la combinación de varios, según las necesidades de la búsqueda.

Posteriormente, los resultados obtenidos fueron sometidos a tres procesos de selección basados en el grado de relación con la temática a estudio, un análisis del resumen y conclusiones del mismo y para finalizar una evaluación del contenido total del artículo.

4. RESULTADOS

4.1 Antimicrobianos naturales

Se conocen como antimicrobianos naturales a las sustancias que presentan un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano y que se encuentran presentes por sí mismas en plantas, animales o pueden ser sintetizados por los propios microorganismos.

La gran mayoría de los antimicrobianos alimentarios presentan exclusivamente actividad como bacteriostáticos o fungistáticos (inhibiendo el desarrollo de los microorganismos), en lugar de bactericidas o fungicidas (destrucción de los microorganismos). Esto ocasiona que, para asegurar la correcta inocuidad de los microorganismos, se analice la posibilidad de combinar el efecto de varios antimicrobianos (generalmente dos) o combinar los antimicrobianos naturales con otras metodologías de conservación de los alimentos (este proceso ha sido denominado como “hurdle approach” o “enfoque de obstáculos”), asegurando así la inhibición de microorganismos resistentes a concentración de las dosis utilizadas, si se emplean por separado (Blanchard, 2000).

Los agentes antimicrobianos están clasificados dentro del grupo de aditivos alimentarios, por tanto, su utilización está en manos de las leyes establecidas en cada país en el uso de estas sustancias. La gran mayoría de antimicrobianos naturales están reconocidos como seguros (GRAS), teniendo en cuenta aspectos como su origen y la ausencia de efectos nocivos en forma concentrada, pudiendo establecer límites en función de estas condiciones, la posible modificación de los atributos sensoriales en los que se adiciona, así como determinar un valor de ingesta diaria admisible (IDA) (Raybaudi-Massinia et al., 2009).

La incorporación de estas sustancias requiere de un proceso previo de aislamiento, purificación, estabilización e inclusión en el alimento con una finalidad antimicrobiana demostrada científicamente (Sauceda, 2011).

La utilización de antimicrobianos naturales presenta varias ventajas en comparación con el uso de antimicrobianos sintéticos. El uso de determinadas sustancias químicas como benzoatos, nitratos y nitritos o el anhídrido sulfuroso (SO₂), entre otras sustancias utilizadas frecuentemente como conservantes, han sido relacionadas como causa de intoxicaciones alimentarias, enfermedades de tipo degenerativo o cáncer. Así mismo, se ha demostrado que ciertos microorganismos han sido capaces de adquirir resistencias a determinados compuestos antimicrobianos. Estos hechos han llevado a la búsqueda de alternativas que presenten alta efectividad como antimicrobianos y sean compatibles con una gran variedad de alimentos, siendo una de las alternativas más estudiadas la sustitución de conservantes sintéticos por otros de origen natural (Sauceda, 2011).

Otro aspecto importante es el aumento de consumidores que exigen alimentos saludables, frescos y seguros sin la necesidad de adicionar conservantes químicos sintéticos (Raybaudi-Massinia et al., 2009). Esto indica que la sustitución de aditivos sintéticos por compuestos naturales puede otorgar un valor añadido al producto, haciéndolo más atractivo para el consumidor.

4.2 Clasificación de los antimicrobianos naturales

4.2.1 ANTIMICROBIANOS NATURALES DE ORIGEN ANIMAL

Diversos estudios han indicado que ciertas sustancias procedentes de los animales y seres humanos presentan la capacidad para inhibir el crecimiento

bacteriano. Entre esas sustancias se pueden identificar enzimas (lisozima, lactoperoxidasa...), péptidos (pleurocidina, lactoferrina, defensinas...), polisacáridos (quitosano...), y ácidos grasos libres (ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico...), entre muchas otras sustancias (Tiwari et al., 2009).

La lisozima es una enzima que se puede extraer de la clara de huevo y que ha demostrado un efecto inhibitorio en un gran número de bacterias. Por ejemplo, Tribes et al. (2017) indicó un efecto inhibitorio sobre *Bacillus cereus* y *Geobacillus stearothermophilus* en conjunto a un tratamiento a alta presión.

Por lo que respecta a los péptidos, la lactoferrina presenta la capacidad de desestabilizar la membrana celular de los microorganismos. En bacterias Gram negativas incrementa la fragilidad de su membrana mediante la liberación de lipopolisacáridos, y en el caso de las bacterias Gram positivas, a través de la liberación de residuos catiónicos e hidrófobos. Además, la lactoferrina presenta la capacidad de inhibir competitivamente a patógenos virales y bacterianos mediante su unión a los lugares de adhesión de la célula huésped (Embleton et al., 2013).

El quitosano, es un polímero resultante de la desacetilación de la quitina, presente en exoesqueletos de artrópodos, insectos y pared celular de algunos hongos. Las características que aporta este polisacárido en cuanto a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y su abundancia (segundo biopolímero tras la celulosa) hace que sea un componente adecuado para su uso en la industria alimentaria (Valencia, 2015). Su actividad antimicrobiana ha sido estudiada en varios estudios, por ejemplo, Fernandes et al. (2008) observó la capacidad antimicrobiana del quitosano sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en distintas matrices alimentarias tanto sólidas como líquidas.

4.2.2 ANTIMICROBIANOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL

Existen multitud de compuestos producidos por las plantas asociados a la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos. Dentro de estos, las principales sustancias evaluadas por su poder inhibitorio han sido aceites esenciales, compuestos fenólicos, aldehídos, especias y hierbas.

Los **aceites esenciales** son compuestos volátiles extraídos de varias partes de las plantas aromáticas como cortezas, semillas, flores, cáscaras, frutos, raíces, hojas, madera, frutos o plantas enteras (Sharma et al., 2020).

Estos metabolitos se forman en el citoplasma y plastidios de las células vegetales mediante las vías del ácido malónico, ácido mevalónico, y metil-d-eritritol-4-fosfato, almacenándose en complejos secretores y llegando a estar en las hojas, tallos, flores y frutos, corteza y raíces de las plantas. Entre sus componentes destacan la presencia de componentes bioactivos como terpenos, terpenoides y fenilpropanoides (Wińska et al., 2019).

El efecto antimicrobiano de los aceites esenciales ha sido ampliamente estudiado. Oussalah et al. (2007) evaluó el efecto inhibitorio de 28 aceites esenciales sobre cuatro bacterias patógenas. Ribes et al. (2017) demostró actividad antifúngica de eugenol y timol sobre varias cepas de hongos. Arioli et al. (2018) observó actividad antimicrobiana del timol y carvacrol sobre

Listeria monocytogenes. Otro estudio destacó la capacidad del aceite esencial de poleo como biocida ante plagas y microorganismos (Domingues y Santos, 2019), además de otros muchos trabajos de investigación que han evidenciado el efecto antimicrobiano de este tipo de compuestos.

La capacidad de inhibición de estos compuestos está asociada a procesos de alteración celular de los microorganismos, así como a la fuga de iones y del contenido citoplasmático ocasionado por los componentes fenólicos presentes en los aceites esenciales (Ruiz-Rico et al., 2017). Además de su capacidad antimicrobiana, estos compuestos han sido relacionados con propiedades anticancerígenas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antimutagénicas y antioxidantes (Pateiro et al., 2021).

Los **compuestos fenólicos** son considerados como el grupo más amplio de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. Son originados por las propias plantas a través de su metabolismo secundario desempeñando en muchos casos una función esencial para la supervivencia de la misma. Su estructura molecular está caracterizada por la presencia de al menos un anillo fenólico. Estos compuestos se pueden clasificar en varios subgrupos en función del número de anillos fenólicos y de sus elementos estructurales. Los principales grupos de polifenoles son: los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones et al., 2012; Lima et al., 2019).

Su biosíntesis tiene lugar a través de dos rutas metabólicas: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La primera ruta ocasiona la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) y la síntesis de ácidos cinámicos y derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, ligninas...), mientras que la segunda ruta ocasiona la formación de quinonas y xantonas (Quiñones et al. 2012).

Estos compuestos han despertado un gran interés ocasionado por el gran número de artículos que determinan los efectos beneficiosos para la salud, relacionados a su elevada capacidad antioxidante. Además, la capacidad antimicrobiana de estos compuestos también ha sido ampliamente estudiada. Sorrentino et al. (2017) indicaron actividad antimicrobiana del ácido gálico sobre distintas especies de *Pseudomonas*. Bostanghadiri et al. (2017) recopilaron numerosos estudios en los que se establecían los efectos antimicrobianos del resveratrol sobre diversos microorganismos como *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, o *S. aureus* entre otros. Ma et al. (2019) observaron cómo los antocianos y las catequinas eran capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella*.

Los **aldehídos** son compuestos liberados por el tejido vegetal a través de la vía de la lipoxigenasa tras sufrir algún tipo de daño físico. Aunque su modo de acción no haya sido totalmente identificado, estos compuestos son buenos candidatos como agentes antimicrobianos al considerarse GRAS para su uso como aromatizante (Raybaudi-Massinia et al., 2009). Dentro de este grupo destacan compuestos como vainillina y cinamaldehído, metabolitos vegetales responsables de las propiedades aromatizantes de la vainilla y canela, respectivamente (Fache et al., 2015). Ribes et al. (2019) evaluaron el efecto antimicrobiano de la vainillina sobre *E. Coli*. Por otro lado, Shreaz et al. (2016) analizaron la actividad antifúngica del cinamaldehído.

4.2.3 ANTIMICROBINOS NATURALES DE ORIGEN MICROBIANO

El grupo más importante de antimicrobianos de origen biológico está compuesto por las bacterias del ácido láctico y sus metabolitos. La utilización de estas bacterias en alimentos permite la formación de ácido láctico que actúa como conservante mediante un proceso de acidificación controlada. Entre los metabolitos de las bacterias lácticas más importantes en cuanto a su capacidad antimicrobiana se encuentran el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el diacetilo, o un grupo de compuestos denominados bacteriocinas ([Abdelhamid y El-DougDoug, 2020](#)).

Un ejemplo de bacteriocina es la nisina, un péptido producido por *Lactococcus lactis* y que ha sido incluido por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) como un aditivo GRAS. Su inocuidad, en conjunto con su termoestabilidad y su disponibilidad para su uso en diferentes productos lo convierte en un aditivo de gran interés ([Santos et al., 2018](#)).

Además, su actividad antimicrobiana se ha demostrado sobre numerosas bacterias patógenas Gram positivas como *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Sin embargo, no se ha identificado acción antimicrobiana contra bacterias Gram negativas, hongos filamentosos o células de levadura ([Bahrami et al., 2019](#)). Esto es ocasionado por su mecanismo de acción, que se basa en la formación de poros en la membrana citoplasmática de los microorganismos, ocasionando la pérdida de moléculas e iones intracelulares. La membrana externa presente en las bacterias Gram negativas dificulta la entrada e interacción de la molécula con su lugar de actuación ocasionando una menor capacidad antimicrobiana ([Tiwari et al., 2009](#)).

Otro agente antimicrobiano a destacar es la reuterina (β -hidroxipropionaldehído). Este compuesto es un producto de la fermentación del glicerol producido por varias especies de *Lactobacillus* ([Dialé et al., 2010](#)). Este genera un gran interés como conservante alimentario debido a una alta solubilidad en agua, elevada termorresistencia y una estabilidad en un amplio rango de valores de pH ([Gyawali y Ibrahim, 2014](#)). La reuterina ha mostrado un efecto antimicrobiano en bacterias Gram positivas y negativas. Por ejemplo, [Bian et al. \(2010\)](#) indicaron una reducción significativa de la población de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. Typhimurium* al utilizar reuterina obtenida a partir de *L. reuteri*.

4.3 Estudio de la capacidad antiviral de los antimicrobianos naturales

4.3.1 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN ANIMAL

[Takahashi et al. \(2016\)](#) analizaron la capacidad de lisozima desnaturalizada para inhibir el crecimiento del norovirus murino (MNV-1) en cuatro tipos de ensaladas. La adición de lisozima desnaturalizada en una concentración del 1% ocasionó tras 5 días de almacenamiento un descenso en la infectividad de dos tipos de ensaladas (mil islas y vinagreta) en más de 4,0 log PFU/g de producto y de 3,0 log PFU/g en la ensalada de col, no observándose diferencias significativas en la última (ensalada de huevo).

Otro estudio analizó el uso de lisozima desnaturalizada como inhibidor del desarrollo de MNV-1 y el virus de la hepatitis A en bayas. Se realizaron dos ensayos, el primero indicó un efecto antiviral de la lisozima sobre tres cepas de virus de la hepatitis A. Este efecto aumentó a mayor concentración de lisozima y tiempo de tratamiento. El segundo ensayo incorporó lisozima al 1% sobre bayas introducidas en soluciones con los virus a estudio y se observó una reducción de al menos 3,1 log MPN/g para el virus de la hepatitis A y de 4,1 log MPN/g para MNV-1 (dependiendo de las bayas analizadas) (Takahashi et al., 2018).

Wakabayashi et al. (2014) realizaron una revisión sobre el efecto de la lactoferrina en el tratamiento o prevención de infecciones virales comunes. Su estudio estableció que la concentración inhibitoria media máxima de lactoferrina necesaria para inhibir el efecto citopático del rotavirus oscilaba entre valores de 12-58 µg/mL en estudios realizados *in vitro*. La administración vía oral de cantidades de lactoferrina de entre 50-100 mg/kg/día causó un descenso de la gravedad de las gastroenteritis ocasionadas por rotavirus y del volumen de diarrea, pero no se observó diferencias en su incidencia. Por lo que respecta a norovirus, la ingesta de al menos 100 mg/kg/día fue suficiente para observar un descenso de su incidencia.

Un estudio elaborado por Davis et al. (2012) analizó la efectividad del quitosano para inactivar sustitutos virales entéricos ante la imposibilidad de cultivar norovirus. Para ello, se utilizaron cuatro sustitutos (calicivirus felino (FCV), norovirus murino (MNV-1) y los bacteriófagos M2 y phiX174) y cinco moléculas de quitosano sintético purificado de distinto peso molecular (53, 222, 307, 421, ~1150 kDa) disueltos en agua, ácido clorhídrico o acético. La adición de quitosano ocasionó una reducción del número de unidades virales en los bacteriófagos M2, phiX174 y FCV. Este último compuesto, presentó el valor de reducción más elevado ($4,31 \pm 0,41$ log PFU/mL). No se observó ningún efecto significativo sobre MNV-1. Con excepción de los resultados obtenidos para el bacteriófago M2, el resto de resultados indicaron que el peso molecular no interfería en la actividad antiviral del quitosano.

Fuller et al. (2013) evaluaron la capacidad antiviral de la fracción lipídica presente en las membranas de los glóbulos de grasa en rotavirus. Para ello, realizaron una comparación entre el contenido presente en las membranas sin modificar (control) y dos muestras de suero de leche y queso a los que eliminaron sus componentes no lipídicos y añadieron lípidos polares procedentes de membranas de grasa bovinas para simular la fracción lipídica de las membranas. Los resultados mostraron una mayor actividad inhibitoria en las muestras control (asociada a glucoproteínas bioactivas y glucolípidos), obteniéndose valores de inhibición similares entre las otras muestras con porcentajes entre el 12%-70% dependiendo de la concentración de lípidos utilizada (0,2-10 mg/mL). Este resultado indica que la fracción lipídica de las membranas podría contener lípidos con actividad antiviral, aunque existen otros componentes dentro de las membranas que también presentan dicha actividad, como pueden ser glucoproteínas y glucolípidos.

4.3.2 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Elizaquível et al. (2013) evaluaron el efecto de tres aceites esenciales como son el clavo, el orégano y la zataria sobre la infectividad de los sustitutos del norovirus, como calicivirus felino (FCV) y norovirus murino (MNV). Las concentraciones de aceites esenciales utilizadas fueron de 0,5-2% para el orégano, entre 0,1-1% para el clavo y 0,01-0,1% para la zataria, siendo incubados durante 2 h a 4°C y 37°C. Los resultados indicaron que la adición de orégano, clavo y zataria ocasionó una reducción de la carga viral de FCV, siendo más efectiva en los tratamientos a mayor concentración (3,75; 3,75 y 4,51 log₁₀ TCID₅₀ /mL respectivamente). No se observó efecto inhibitorio de la carga en los tratamientos realizados a 4°C. Por lo que respecta al tratamiento en MNV, se obtuvo igualmente una reducción de la carga viral en todos los tratamientos a 37°C, pero esta reducción fue menor en comparación con el resultado anterior (1,62; 0,67 y 0,54 log₁₀ TCID₅₀ /mL, respectivamente). En el tratamiento a 4°C se observó una ligera reducción de la carga viral en los tratamientos con clavo y zataria, en concentraciones más altas.

Gandhi et al. (2016) realizaron una revisión bibliográfica sobre moléculas naturales con actividad *in vitro* e *in vivo* frente al rotavirus. Los resultados mostraron que determinadas especies de plantas, como *Theobroma cacao* (Malvaceae), *Aegle marmelos* (Linn.) *Correa* (Rutaceae), *Quillaja saponaria* Molina (Quillajaceae) o *Psidium guajava* (Myrtaceae), entre muchos otros, han sido relacionadas con cierta actividad antiviral contra la infección por rotavirus, interfiriendo con la absorción del virus e inhibiendo su replicación. Por otro lado, metabolitos secundarios de plantas como carvacrol, ácido abiético, determinadas proantocianinas o resveratrol, entre muchas otras, mostraron de forma generalizada una elevada capacidad de prevenir la infectividad del rotavirus mediante procesos que evitan la unión viral a la célula, inhiben la replicación viral, actividad inhibitoria hacia las proteínas de la cápside y presentan efectos supresores sobre la proliferación viral y la síntesis de ARN viral.

En un estudio realizado por Lipson et al. (2007) se evaluaron los efectos antivirales del zumo de arándanos, indicando que el rotavirus tratado con zumo de arándano no fue capaz de ocasionar una infección productiva en los cultivos de células, no observándose la presencia de unas determinadas partículas de rotavirus que sí eran visibles en las muestras control. Además, se identificó actividad antiviral del zumo de arándanos al inhibir las reacciones de hemaglutinación en concentraciones al 20% (diluido con tampón fosfato salino), reacción que sí se observaba en concentraciones de zumo inferiores. Este efecto fue asociado a modificaciones de la glicoproteína presente en los rotavirus, dificultando su unión a los receptores celulares. No se determinó qué compuestos presentes en el zumo de arándanos podrían estar relacionados a la actividad antiviral observada.

Tomhé et al. (2019) analizó el potencial antiviral del ácido ursólico en rotavirus mediante un ensayo del efecto virucida y citotóxico. Los resultados no mostraron ningún efecto virucida en ninguno de los tratamientos realizados (hasta 40 µM). Sin embargo, un estudio *in vitro* demostró que 10 µM de ácido ursólico era capaz de inhibir la replicación del rotavirus, observándose una

reducción significativa del número y tamaño de los viroplasmias, dificultando así la maduración de las partículas virales hasta 15 h después de la infección.

La capacidad antiviral de *Erodium glaucophyllum* mediante extractos obtenidos a partir de diferentes métodos de extracción (convencional vs extracción asistida por ultrasonido) y disolventes de extracción (acuoso e hidroetanólico) sobre el virus de la hepatitis A y MNV incubados a 25°C y 37°C, fue analizada por [Abdelkebir et al. \(2019\)](#). Los resultados mostraron una reducción de la infectividad de ambos virus en todas las combinaciones realizadas. El uso de disolventes hidroetanólicos permitió un efecto antagonista mayor con reducciones superiores a 4,88 log₁₀ TCID₅₀ /mL y 4,72 log₁₀ TCID₅₀ /mL para MNV y virus de la hepatitis A, respectivamente a 37°C. La actividad antiviral de *Erodium glaucophyllum* ha sido vinculada a su contenido en polifenoles.

4.3.3 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN MICROBIANO

[Kim et al. \(2018\)](#) estudiaron el efecto antiviral de los exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 en rotavirus, mediante un estudio *in vitro* e *in vivo*. Los resultados *in vitro* mostraron que la presencia de estos polisacáridos en una concentración de 1,95 mg/mL permitía una mayor reducción logarítmica del número de copias de ARN viral en comparación a las muestras control. Así mismo, el estudio *in vivo* mostró cómo la aplicación de 1 mg de exopolisacáridos por ratón durante 7 días disminuyó de manera significativa los casos de diarrea identificados en un 50%.

[Lange-Starke et al. \(2014\)](#) evaluaron el potencial antiviral de varios compuestos procedentes de bacterias como son sakacin A, nisina y ácido láctico en virus como el norovirus murino S99 (MNV), virus de influenza A y calicivirus felino (FCV). El ensayo se basó en la incubación de los virus en un sobrenadante libre de células que contenía los metabolitos procedentes de las bacterias al 10% durante tres días a 24°C. No se observó efecto antiviral del sakacin A ni de la nisina en ninguno de los virus objeto de estudio. Sin embargo, el ácido láctico sí que fue capaz de reducir el número de virus presentes en un máximo de 3,25 y 2,5 log₁₀ para MNV y virus de la influenza A respectivamente.

[Becker et al. \(2017\)](#) analizaron la capacidad virucida del peróxido de hidrógeno en combinación con ultrasonidos a través de tres métodos distintos, donde principalmente se modificaba la concentración (0,15-100%), el tiempo de exposición (30-300 s) y el medio donde se realizaba la prueba (agua, suero fetal bovino). Se demostró una reducción superior a 4 log₁₀ TCID₅₀/ mL con todos los métodos en los 3 tipos de virus utilizados (norovirus murino S99 (MNV), adenovirus y parvovirus murino).

Un estudio indicó que la concentración necesaria de nisina era inferior a otras cepas de *Lactobacillus* para inducir el gen de la β-glucuronidasa, que permite producir la principal proteína antigénica del virus Norwalk utilizada en vacunas ([Martin et al., 2014](#)). La administración de *Lactobacillus reuteri* fue capaz de producir de manera eficaz la colonización del tracto intestinal reduciendo de manera significativa la duración de la gastroenteritis aguda por

rotavirus. La causa de esta reducción fue asociada a la reuterina producida por *Lactobacillus reuteri* (Sung et al., 2002).

4.4 Estudio de la capacidad antimicrobiana sobre organismos esporulados

4.4.1 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN ANIMAL

Abdou et al. (2007) evaluaron la capacidad inhibitoria de péptidos de lisozima en un total de 11 especies del género *Bacillus*. Una concentración de 100 µg/mL ocasionó la inhibición completa de 9 especies de *Bacillus*, mostrando *B. cereus* y *B. stearothermophilus* una mayor resistencia a la lisozima. Por otro lado, se determinó que una concentración de al menos 10 µg/mL era capaz de inhibir el crecimiento de células vegetativas y esporas de *B. subtilis*. Uno de los aspectos positivos del uso de péptidos de lisozima es su elevada estabilidad tanto a altas temperaturas (95°C) como en amplios rangos de pH (4,5-7).

Liceaga-Gesuald et al. (2001) analizaron la capacidad de inhibición de la lactoferrina a una concentración de 5% p/v tras un proceso de digestión sobre esporas de *Penicillium sp.* La digestión con pepsina (3% p/p) ocasionó la formación de péptidos en el hidrolizado. Las dos concentraciones a estudio de la lactoferrina (60 y 300 µg/mL) inhibieron la germinación de esporas y el crecimiento del micelio durante 9 y 21 días respectivamente.

4.4.2 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Corthouts y Michiels (2016) realizaron un ensayo de inhibición de la germinación inducida por nutrientes y altas presiones (200 y 600 MPa) en esporas de *B. cereus* por parte de aceites esenciales. En primer lugar, se seleccionaron los 11 aceites esenciales del estudio en base a su concentración mínima inhibitoria (MIC), seleccionando aceites tanto de MIC bajo como alto. La gran mayoría de los aceites inhibieron la germinación por nutrientes, aunque se observó que una pequeña fracción de esporas sí que pudo germinar. Por lo que respecta a las pruebas con altas presiones, no se observó un efecto común en todos los aceites esenciales estudiados, por lo que la capacidad de inhibir a una presión u otra fue propia de cada aceite. En general, la gran mayoría de aceites esenciales presentó la capacidad de inhibir la germinación por nutrientes y en alguno de los tratamientos a altas presiones, pero esto puede ser un hecho contraproducente debido a la necesidad de germinación de las esporas para su eliminación mediante procesos de altas presiones.

Otro estudio basado en aceites esenciales fue realizado por Haberbeck et al. (2012), donde se evaluó la inactivación de esporas de *Bacillus coagulans* mediante la aplicación de aceite esencial de orégano en combinación con un tratamiento térmico. A las esporas presentes en caldo de cultivo a 4°Brix y pH 4,2 se les adicionó una concentración entre 250 y 1000 µg/g y fueron sometidas a un tratamiento térmico a aproximadamente 100°C. El tratamiento

combinado tardó significativamente menos tiempo en reducir las esporas en 6 niveles logarítmicos. Posteriormente, se observó que la realización de una emulsión de aceite de orégano mediante el uso de lecitina de soja, con la finalidad de incrementar la solubilidad, ocasionó un tiempo de inactivación menor en comparación con el aceite de orégano puro.

Cai et al. (2019) analizaron la actividad antibacteriana del timol mediante la estimación de la concentración mínima de inhibición (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) en células vegetativas y esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. El estudio estableció un valor de MIC de 0,5 mg/mL y un valor de MBC de 1 mg/mL en las esporas. Así mismo, posteriores pruebas de SDS-PAGE y microscopia electrónica mostraron una pérdida de proteínas solubles y un daño morfológico elevado, tanto en células como esporas.

Palop et al. (1997) evaluaron el efecto de la intensidad de los tratamientos térmicos sobre la capacidad del ácido láctico y cítrico para inhibir el crecimiento de esporas de *Bacillus coagulans*. Tras el periodo de incubación de 10 días a 35°C, en la mayoría de los casos se observó un descenso del número de supervivientes. Tanto la intensidad del tratamiento térmico previo (de 10 a 360 s) como el pH (rango 4,2-5,6) y el ácido utilizado (láctico o cítrico 5 M) influyeron en gran medida en la efectividad de la reducción de supervivientes. De forma general, el ácido cítrico fue más eficaz en las muestras con un tratamiento previo inferior o igual a los 2 min, siendo el ácido láctico más efectivo transcurrido ese tiempo.

Cetin-Karaca y Newman (2018) analizaron la eficacia antimicrobiana de tres fitoquímicos como son el trans-cinamaldehído, el galato de epigalocatequina y el [10]-gingerol (fitoquímicos derivados de la canela, el té verde y el jengibre, respectivamente) para inhibir el crecimiento de *B. cereus* y sus esporas en cereales infantiles reconstituidos con fórmula infantil. El trans-cinamaldehído mostró la mayor actividad antimicrobiana al establecer su MIC para las esporas en 125 ppm, obteniéndose un valor de 250 ppm para el resto de fitoquímicos contra *B. cereus* y sus esporas. Además, este fitoquímico fue el único en conseguir una completa inhibición del crecimiento de *B. cereus* a 23°C, observándose un retraso en su crecimiento a 37°C.

4.4.3 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN MICROBIANO

Avila et al. (2014), analizaron la cantidad de lisozima, reuterina y nisina necesaria para ocasionar la completa inhibición de cuatro tipos distintos de especies de *Clostridium* (*C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii*). El estudio se realizó sobre células vegetativas y esporas de las especies anteriormente nombradas cultivadas en medio reforzado y leche, obteniéndose los resultados tras 7 días de incubación a 37°C.

La aplicación de lisozima (antimicrobiano natural de origen animal) en concentraciones de 0,2 a 400 µg/mL no fue capaz de inhibir el crecimiento de ninguna cepa de *C. sporogenes*. Para el resto de sustancias estudiadas sí que se observó inhibición del crecimiento dependiendo de la cepa y del medio de cultivo, siendo por lo general, la concentración requerida para la inhibición menor en células vegetativas y en medio reforzado, en comparación con la

leche, donde en alguna de las cepas analizadas no se observó inhibición. Las esporas de *C. tyrobutyricum* fueron la más sensibles a la lisozima (1,57-400 µg/mL en medio y 50 µg/mL a >400 µg/mL en leche) y las esporas de *C. butyricum* las más resistentes (200 µg/mL a >400 µg/mL en suero y no produciéndose su inhibición en leche).

Por lo que respecta la reuterina, este compuesto en concentraciones de 0,06 a 32,5 mM ejerció actividad antimicrobiana contra todos los *Clostridium* analizados, dependiendo su eficacia de la cepa y medio de cultivo. La gran mayoría de las esporas objeto de estudio fueron inhibidas por una concentración de reuterina igual o inferior a 16,25 mM, a excepción de una cepa de *C. sporogenes* cultivada en leche (32,5 mM). En este caso, el medio de cultivo fue clave para obtener unos mejores resultados de inhibición dependiendo de la especie de *Clostridium* y cepa a estudio.

Por último, la nisina en concentración entre 0,03-25 µg/mL mostró su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias y esporas de *Clostridium*. En este caso, las esporas presentes en la leche necesitaron igual o mayor concentración (dependiendo de la cepa a estudio) para inhibir su crecimiento, en comparación con los resultados obtenidos en el medio de cultivo reforzado. Una concentración de nisina de 6,25 mM fue suficiente para inhibir el crecimiento de todas las cepas de esporas en medio reforzado, aumentando hasta los 25 mM para inhibir el crecimiento de una cepa de *C. beijerinckii* en leche.

Otro estudio llevado a cabo con nisina indicó que la adición en una concentración de 1,56 g/L de leche en combinación con 2 tratamientos a alta presión de 300 y 400 MPa, presentó un mayor efecto inhibitorio de esporas de *B. cereus* presentes en quesos elaborados con leche cruda. Este efecto no se observó en concentraciones menores de nisina (0,05 mg/L) ni en lisozima (22,4 mg/L) (Lopez-Pedemonte et al., 2003).

Fan et al. (2019) analizaron la eficacia inhibitoria de la nisina y el carvacrol (adición individual en concentraciones del 0,01% y 0,02% p/v) en combinación con un tratamiento con ultrasonidos (33 W/mL, 15 min) en esporas de *Bacillus subtilis* presentes en medio de laboratorio y leche. El estudio indicó que la combinación de los tratamientos fue efectiva a la hora de inhibir la germinación de las esporas presentes en el medio de laboratorio, obteniéndose un porcentaje de inhibición mayor en el tratamiento combinado de carvacrol con ultrasonidos (67,3% carvacrol y 30,5% nisina)

Por último, Meghrou et al. (1999) analizó las sensibilidades de varias especies de células vegetativas y dos especies capaces de esporular a tres bacteriocinas como la nisina A, nisina Z y pediocina. Los resultados indicaron que las MIC de las bacteriocinas variaron entre especies e incluso entre cepas de la misma especie. Concentraciones de 23 µg/mL y 69 µg/mL de nisina A y nisina Z respectivamente, inhibieron el crecimiento de esporas de *Bacillus* y *Clostridium* durante 10 días. En contraposición, la pediocina no fue capaz de evitar la germinación de las esporas de *B. subtilis*.

5. CONCLUSIONES

La realización de este estudio confirmó que la evidencia científica sobre la eficacia de los antimicrobianos naturales en virus o bacterias esporuladas es muy limitada, en comparación con la evidencia de su efecto sobre bacterias vegetativas. Sin embargo, las investigaciones publicadas han sido suficientes para evidenciar la capacidad de determinados antimicrobianos naturales frente a estos contaminantes biológicos.

Compuestos como lisozima, lactoferrina, quitosano, lípidos de membrana, determinados aceites esenciales, metabolitos secundarios (carvacrol, resveratrol...) y exopolisacáridos producidos por *Lactobacillus plantarum*, entre otros, han demostrado en mayor o menor medida poder actuar como agentes antivirales sobre virus como el norovirus o el rotavirus que presentan una alta incidencia en intoxicaciones alimentarias. Cabe destacar los resultados obtenidos con la nisina, que muchos autores catalogan como agente antiviral, pero su adición fue ineficaz para inhibir la proliferación de virus entéricos. Sería necesario la realización de más estudios para profundizar en el potencial antiviral de estos compuestos.

Por lo que respecta a las esporas, los estudios sobre su inhibición son muy reducidos en antimicrobianos naturales de origen animal. En cambio, existen bastantes estudios relacionados con la inhibición o eliminación de bacterias esporuladas para aceites esenciales, compuestos fenólicos y bacteriocinas como la nisina, por lo que en un futuro podría ser interesante realizar un análisis en profundidad de alguno de estos compuestos.

El estudio del efecto de los antimicrobianos naturales sobre contaminantes biológicos como virus y formas esporuladas ha identificado determinados compuestos naturales con un posible efecto antiviral, así como la capacidad de inhibir la germinación y reducir el contenido en esporas de un determinado medio. Este trabajo evidencia que muchos de los compuestos que se citan tienen un gran potencial en la inhibición de virus y esporas, y que se requieren de más estudios para poner a disposición de la industria compuestos naturales que permitan garantizar la seguridad de los alimentos frente a virus y bacterias esporuladas.

6. REFERENCIAS

- Abdelhamid, A. G., & El-Dougdoug, N. K. (2020). Controlling foodborne pathogens with natural antimicrobials by biological control and antivirulence strategies. *Heliyon*, 6(9), e05020.
- Abdelkebir, R., Alcántara, C., Falcó, I., Sánchez, G., Garcia-Perez, J. V., Neffati, M., ... & Collado, M. C. (2019). Effect of ultrasound technology combined with binary mixtures of ethanol and water on antibacterial and antiviral activities of *Erodium glaucophyllum* extracts. *Innovative food science & emerging technologies*, 52, 189-196.
- Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Aboueleinin, A. M., Kim, M., & Ibrahim, H. R. (2007). Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. *Food Control*, 18(2), 173-178.

- Alcamí, J., Bastero, J.J., Fernández, B., Gómez, J.M. et al. (2006) Ciencias de la naturaleza y de la salud: Biología 2. España: SM
- Anderson, P., & del Rosario, M. (2005). Enfermedades de origen alimentario. Ediciones Díaz de Santos.
- Arioli, S., Montanari, C., Magnani, M., Tabanelli, G., Patrignani, F., Lanciotti, R., ... & Gardini, F. (2019). Modelling of *Listeria monocytogenes* Scott A after a mild heat treatment in the presence of thymol and carvacrol: effects on culturability and viability. *Journal of Food Engineering*, 240, 73-82.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Garde, S. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International journal of food microbiology*, 172, 70-75.
- Bahrami, A., Delshadi, R., Jafari, S. M., & Williams, L. (2019). Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 94, 20-31.
- Becker, B., Bischoff, B., Brill, F. H., Steinmann, E., & Steinmann, J. (2017). Virucidal efficacy of a sonicated hydrogen peroxide system (trophon® EPR) following European and German test methods. *GMS hygiene and infection control*, 12.
- Bian, L., Molan, A.L., Maddox, I. et al. (2011). Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* DPC16 supernatants against selected food borne pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 991–998 (2011).
- Blanchard J., 2000. Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos.
- Bosch, A., Gkogka, E., Le Guyader, F. S., Loisy-Hamon, F., Lee, A., Van Lieshout, L., ... & Winkler, A. (2018). Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 110-128.
- Bostanghadiri, N., Pormohammad, A., Chirani, A. S., Pouriran, R., Erfanimanesh, S., & Hashemi, A. (2017). Comprehensive review on the antimicrobial potency of the plant polyphenol Resveratrol. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1588-1595.
- Cai, R., Zhang, M., Cui, L., Yuan, Y., Yang, Y., Wang, Z., & Yue, T. (2019). Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores. *LWT*, 105, 377-384.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Cetin-Karaca, H., & Newman, M. C. (2018). Antimicrobial efficacy of phytochemicals against *Bacillus cereus* in reconstituted infant rice cereal. *Food microbiology*, 69, 189-195.
- Corthouts, J., & Michiels, C. W. (2016). Inhibition of nutrient-and high pressure-induced germination of *Bacillus cereus* spores by plant essential oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34, 250-258.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria—Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, 21(4), 370-380.
- Davis, R., Zivanovic, S., D'Souza, D. H., & Davidson, P. M. (2012). Effectiveness of chitosan on the inactivation of enteric viral surrogates. *Food microbiology*, 32(1), 57-62.
- De Paepe, D., Valkenburg, D., Coudijzer, K., Noten B., Servaes, K., De Loose, M., Van Droogenbroeck, B. (2014). Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. *Food Chemistry*, 162, 176-185
- Domingues, P. M., & Santos, L. (2019). Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegium*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. *Industrial Crops and Products*, 139, 111534.
- Elizaquível, P., Azizkhani, M., Aznar, R., & Sánchez, G. (2013). The effect of essential oils on norovirus surrogates. *Food Control*, 32(1), 275-278.

- Embleton, N.D.; Berrington, J.E.; McGuire, W.; Stewart C.J; Cummings S.P. (2013). Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 18 (3): 143-149,
- Fache, M., Boutevin, B., & Caillol, S. (2015). Vanillin, a key-intermediate of biobased polymers. *European polymer journal*, 68, 488-502.
- Fan, L., Ismail, B. B., Hou, F., Muhammad, A. I., Ding, T., & Liu, D. (2019). Ultrasound pretreatment enhances the inhibitory effects of nisin/carvacrol against germination, outgrowth and vegetative growth of spores of *Bacillus subtilis* ATCC6633 in laboratory medium and milk: Population and single-cell analysis. *International journal of food microbiology*, 311, 108329.
- Fernandes, J.C.; Tavora, F.K.; Soares, J.C.; Ramos, O.S.; João Monteiro, M.; Pintado, M.E.; Xavier Malcata, F. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and chito oligosaccharides upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology*. 25, 922–928.
- Fos-Claver, S., Vendrell Blay, E., Minardi Mitre, R., Morales Suárez-Varela, M. M., & Llopis González, A. (2000). Enfermedades parasitarias de origen alimentario más frecuentes en España: incidencia y comparación con las de origen vírico y bacteriano. *Ars Pharm.* 41(3): 293-305.
- Fuller, K. L., Kuhlenschmidt, T. B., Kuhlenschmidt, M. S., Jiménez-Flores, R., & Donovan, S. M. (2013). Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus in vitro. *Journal of dairy science*, 96(6), 3488-3497.
- Gandhi, G. R., Barreto, P. G., dos Santos Lima, B., Quintans, J. D. S. S., de Souza Araujo, A. A., Narain, N., ... & Gurgel, R. Q. (2016). Medicinal plants and natural molecules with in vitro and in vivo activity against rotavirus: A systematic review. *Phytomedicine*, 23(14), 1830-1842.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429.
- Haberbeck, L. U., da Silva Riehl, C. A., Salomão, B. D. C. M., & De Aragao, G. M. F. (2012). *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 267-273.
- Huesca-Espitia, L. C., Sánchez-Salas, J. L., & Bandala, E. R. (2014). Métodos para la inactivación de esporas en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 8(1), 48-67.
- Kim, K., Lee, G., Thanh, H. D., Kim, J. H., Konkitt, M., Yoon, S., ... & Kim, W. (2018). Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *Journal of dairy science*, 101(7), 5702-5712.
- Lange-Starke, A., Petereit, A., Truyen, U., Braun, P. G., Fehlhaber, K., & Albert, T. (2014). Antiviral potential of selected starter cultures, bacteriocins and D, L-lactic acid. *Food and environmental virology*, 6(1), 42-47.
- Liceaga-Gesualdo, A., Li-Chan, E. C. Y., & Skura, B. J. (2001). Antimicrobial effect of lactoferrin digest on spores of a *Penicillium* sp. isolated from bottled water. *Food research international*, 34(6), 501-506.
- Lima, M. C., de Sousa, C. P., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J. D., & de Souza, E. L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 130, 259-270.
- Lipson, S. M., Sethi, L., Cohen, P., Gordon, R. E., Tan, I. P., Burdowski, A., & Stotzky, G. (2007). Antiviral effects on bacteriophages and rotavirus by cranberry juice. *Phytomedicine*, 14(1), 23-30.
- López-Pedemonte, T. J., Roig-Sagués, A. X., Trujillo, A. J., Capellas, M., & Guamis, B. (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3075-3081.

- Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H., & Fang, J. (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control*, *106*, 106712.
- Macedo, M., & Vola, M. (2008). Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios. *Temas de Bacterología y Virología Médica*, *20*, 339-353.
- Martín, M. C., Fernández, M., Martín-Alonso, J. M., Parra, F., Boga, J. A., & Alvarez, M. A. (2004). Nisin-controlled expression of Norwalk virus VP60 protein in *Lactobacillus casei*. *FEMS microbiology letters*, *237*(2), 385-391.
- Marsanasco, M; Márquez, A.L; Wagner, J.R; Alonso, S.D.V.; Chiaramoni, N.S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, *44* (9), 3039-3046.
- Meghrou, J., Lacroix, C., & Simard, R. E. (1999). The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, *16*(2), 105-114.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, *18*(5), 414-420.
- Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F. J., & Condón, S. (1997). Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *International journal of food microbiology*, *38*(1), 25-30.
- Pateiro, M., Munekata, P. E., Sant'Ana, A. S., Domínguez, R., Rodríguez-Lázaro, D., & Lorenzo, J. M. (2020). Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 108966.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A (2012) Los polifenoles compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, *27*, 76-89
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *8*(3), 157-180.
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., Talens, P., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2017). Eugenol and thymol immobilised on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: Application in strawberry jam. *Food Control*, *81*, 181-188.
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., & Barat, J. M. (2019). Enhancing the antimicrobial activity of eugenol, carvacrol and vanillin immobilised on silica supports against *Escherichia coli* or *Zygosaccharomyces rouxii* in fruit juices by their binary combinations. *LWT*, *113*, 108326.
- Roy, M. K., Takenaka, M., Isobe, S., & Tsushida, T. (2007). Antioxidant potential, anti-proliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry*, *103* (1), 106–114
- Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Marcos, M. D., & Barat, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food chemistry*, *233*, 228-236.
- Santos, J. C., Sousa, R. C., Otoni, C. G., Moraes, A. R., Souza, V. G., Medeiros, E. A., ... & Soares, N. F. (2018). Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *48*, 179-194.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: Revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, *7*(1), 153-170.

- Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2020). Essential Oils as Additives in Active Food Packaging. *Food Chemistry*, 128403.
- Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., ... & Hun, L. T. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116-131.
- Sorrentino, E., Succi, M., Tipaldi, L., Pannella, G., Maiuro, L., Sturchio, M., ... & Tremonte, P. (2018). Antimicrobial activity of gallic acid against food-related *Pseudomonas* strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. *International journal of food microbiology*, 266, 183-189.
- Sung, H. W., Chen, C. N., Chang, Y., & Liang, H. F. (2002). Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri*. *Biomaterials*, 23(15), 3203-3214.
- Takahashi, H., Tsuchiya, T., Takahashi, M., Nakazawa, M., Watanabe, T., Takeuchi, A., ... & Kimura, B. (2016). Viability of murine norovirus in salads and dressings and its inactivation using heat-denatured lysozyme. *International Journal of Food Microbiology*, 233, 29-33.
- Takahashi, M., Okakura, Y., Takahashi, H., Imamura, M., Takeuchi, A., Shidara, H., ... & Kimura, B. (2018). Heat-denatured lysozyme could be a novel disinfectant for reducing hepatitis A virus and murine norovirus on berry fruit. *International journal of food microbiology*, 266, 104-108.
- 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
- Tribst, A.A.L., Ribeiro, L.R., Cristianini, M. (2017). Comparison of the effects of high pressure homogenization and high pressure processing on the enzyme activity and antimicrobial profile of lysozyme. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43 (Suppl. C): 60-67
- Tohmé, M. J., Giménez, M. C., Peralta, A., Colombo, M. I., & Delgui, L. R. (2019). Ursolic acid: A novel antiviral compound inhibiting rotavirus infection in vitro. *International journal of antimicrobial agents*, 54(5), 601-609.
- Valencia, G. A. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Revista Scientia Agroalimentaria*, 2. 32-38
- Wakabayashi, H., Oda, H., Yamauchi, K., & Abe, F. (2014). Lactoferrin for prevention of common viral infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(11), 666-671.
- WHO. (2020). Inocuidad de los alimentos. Visto el 4 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Wińska, K.; Mączka, W.; Łyczko, J.; Grabarczyk, M.; Czubaszek, A.; Szumny, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* 2019, 24 (11), 2130.