



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



Estudio del efecto antimicrobiano del açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre *Listeria innocua*



MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Autor: Antonio Jiménez Carretón

Directores: Dolores Rodrigo Aliaga, Antonio Martínez López

Codirector Experimental: Clara Miracle Belda Galbis

Centro: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)
Valencia, 2011

RESUMEN

Existe un gran interés en el uso de compuestos naturales que ayuden a garantizar la inocuidad de los alimentos, manteniendo al máximo todas las propiedades del producto fresco. En este estudio se evaluó el efecto del açai sobre el crecimiento de *Listeria innocua* a distintas temperaturas. Los resultados demuestran que un aumento en la concentración de açai, y/o un descenso en la temperatura, enlentecen el crecimiento bacteriano estableciéndose una relación lineal inversa entre la duración de fase de la latencia y la concentración del açai. Así pues, el açai podría llegar a emplearse, además de cómo ingrediente en la formulación del alimento, como antimicrobiano, sólo o en combinación con otras técnicas de conservación no agresivas.

ABSTRACT

There is an increased interest in the use of natural compounds that ensure food safety, while the properties of the product are maintained. This study evaluated the effect of açai on *Listeria innocua* growth at different temperatures. The results show that an increase in the concentration of açai, and/or a decrease in temperature, slows bacterial growth. An inverse linear relationship between the duration of the lag phase and the concentration of the açai was established. So, açai could be used as a natural ingredient in the food formulation, as well as an antimicrobial, alone or in combination with other non-aggressive preservation techniques.

RESUM

Existeix un gran interès en l'ús de compostos naturals que garantisquen la innocuïtat dels aliments, mantenint al màxim les propietats del producte fresc. En aquest estudi s'evaluà l'efecte de l'açai sobre el creixement de *Listeria innocua* a diferents temperatures. Els resultats obtinguts demostren que un augment en la concentració d'açai i/o un descens de la temperatura, ralenteixen el creixement bacterià. A més s'establí una relació lineal inversa entre la durada de fase de la latència i la concentració del açai. En conseqüència, l'açai podria arribar a emprar-se, a més de com ingredient en la formulació de certs aliments, com antimicrobià, sol o en combinació amb altres tècniques de conservació no agressives.

PALABRAS CLAVE: Açai (*Euterpe oleracea*, Mart.) antimicrobianos naturales, *Listeria innocua*, parámetros cinéticos de crecimiento microbiano, microbiología predictiva.

INTRODUCCIÓN

El consumidor actual demanda alimentos mínimamente procesados que además de sanos y seguros, tengan apariencia de frescos y sean sabrosos, tengan un periodo de vida útil prolongado y estén exentos de aditivos químicos. Tradicionalmente, la conservación e inocuidad de los alimentos se conseguía sobretodo mediante conservantes químicos y tratamientos térmicos intensos, cuya aplicación provoca en ellos alteraciones organolépticas y nutricionales más que considerables (Barbosa-Cánovas. *et al.*, 1997). Teniendo en cuenta las exigencias del mercado, ninguna de estas dos estrategias interesa hoy en día y por ello, desde hace algún tiempo, se están desarrollando nuevas técnicas de procesado que respeten las características del producto fresco, y que aseguren su inocuidad por eliminación y/o inactivación efectiva de microorganismos y enzimas (Tiwari *et al.*, 2009).

Frente al uso de conservantes artificiales, la aplicación de conservantes naturales derivados de plantas, animales o microorganismos, es una buena alternativa; sobre todo teniendo en cuenta que este tipo de compuestos pueden actuar sinérgicamente con un gran número de métodos de conservación (Burt, 2004). Entre todos ellos, destacan los de origen vegetal ya que muchos son considerados GRAS (*Generally Recognized As Safe*). En la mayor parte de los casos se han utilizado aceites esenciales o extractos, que si bien se muestran efectivos en el control de la flora microbiana, su uso no siempre está legalizado para cualquier alimento o en cualquier concentración. En este sentido se está despertando el interés por el uso de las sustancias que además de actuar como ingredientes en la formulación del alimento aporten un cierto carácter bioactivo (antimicrobiano, por ejemplo). La gran ventaja de su uso es su estatus legal ya que su utilización en alimentación está autorizada y aunque los fines muchas veces no son los de contribuir a la inocuidad del alimento, sí que es interesante aprovechar su capacidad antimicrobiana, convirtiéndose de esa forma en medidas de control adicionales (Pina-Pérez *et al.*, 2009a y 2009b).

El açai (*Euterpe oleracea* Mart), también conocido como assaí, palmito o manaca, es una palma de la familia *Arecaceae*, muy abundante en las llanuras de inundación amazónica de Brasil. Se trata de un árbol que puede alcanzar entre 15-30 m de altura, cuyas hojas pinnadas pueden llegar a medir hasta 3 m de largo (Figura 1A). Su fruto, conocido con el mismo nombre, es una baya de forma redonda u ovalada con un diámetro de entre 10 y 12 mm. Cada baya de açai contiene una semilla de color marrón claro. Ésta representa el 90% del diámetro de la fruta y supone más del 90% de su

peso. Cada semilla está cubierta con una capa de fibras brutas y sobre ésta aparece una fina capa de pulpa violácea comestible. En la planta, los frutos se agrupan por racimos de color violáceo cuando están maduros (Figura 1B), aunque también existe una variedad blanca, menos conocida (Lichtenthäler *et al.*, 2005).



Figura 1. Palma de açaí creciendo en una zona de inundación amazónica (A) (www.cuidadoysalud.com). Fruto açaí en racimos (B) (www.findmeacure.com).

El açaí se consume mucho en Brasil, Colombia y Surinam. Con el fruto se preparan zumos, batidos y postres, aparte del famoso vino de açaí (Neida y Elba, 2007). En cuanto a su valor nutricional, contiene una gran cantidad de polifenoles (Gallori *et al.*, 2004) que le otorgan una marcada capacidad antioxidante (Lichtenthäler *et al.* 2005; Schauss *et al.*, 2006a) superior a la de fresas, arándanos, frambuesas y otros vegetales (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004; Schauss *et al.*, 2006a). En la actualidad, el açaí es considerado una “superfruta”, como lo son los arándanos, la granada o el mango (Kang *et al.*, 2011), y por ello además, resulta comercialmente interesante para norteamericanos y europeos, dada la buena aceptación que tienen hoy los productos naturales con cierta funcionalidad, máxime teniendo en cuenta que ésta se manifiesta *in vitro* e *in vivo* incluso a dosis muy bajas (Schauss *et al.*, 2006b; Mertens-Talcott *et al.*, 2008).

El planteamiento del uso de açaí como antimicrobiano viene justificado porque ciertos componentes polifenólicos presentes en alimentos pueden afectar al crecimiento bacteriano y su metabolismo, aunque este efecto depende del compuesto ensayado junto con la cepa de microorganismo usada (Wen *et al.*, 2003; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007; Percival *et al.*, 2006; Gañan *et al.*, 2008; Almajano *et al.*, 2007). Este efecto se ha atribuido a la capacidad de los compuestos fenólicos para alterar la permeabilidad de la membrana de las células microbianas, lo que produce la pérdida de macromoléculas desde el interior, afectando de igual modo al transporte de electrones, la absorción de nutrientes, la síntesis de ácidos nucleicos y las

proteínas de membrana, provocando una deformación en la estructura y la funcionalidad (Tiwari *et al.*, 2009).

En cuanto a su efecto sobre la flora microbiana, las sustancias antimicrobianas pueden manifestar su comportamiento de modo bactericida, es decir inactivando el microorganismo o bacteriostático, retrasando o impidiendo el crecimiento del mismo (FAO, 2001).

Entre los principales patógenos de alimentos procesados destaca *Listeria monocytogenes*, causante de listeriosis, una zoonosis poco frecuente pero de muy graves consecuencias en ancianos, personas inmunodeprimidas y mujeres embarazadas por provocar abortos, meningitis, etc. En 2008 se detectaron en la Unión Europea 1381 casos confirmados de listeriosis con una tasa de mortalidad del 20,5% (EFSA, 2010). La bacteria presenta una gran capacidad para crecer en entornos de pH bajo, en presencia de altas concentraciones de sal, a temperaturas de refrigeración, y tras el desecado o calentamiento de la matriz en la que se encuentre. En el presente estudio, para determinar la actividad antimicrobiana del açai, se utiliza *Listeria innocua* como un sustituto no patógeno de *Listeria monocytogenes*, con características muy similares en términos de fisiología y metabolismo y que ha sido aceptado internacionalmente como modelo en múltiples estudios (Wouters *et al.*, 1999 y Fitzgerald *et al.*, 2004). El uso de microorganismos no patógenos como sustitutos de patógenos está ampliamente reconocido para evaluar los efectos y las respuestas de microorganismos frente a tratamientos de procesado o de contaminación (IFT, 2002).

Existen numerosos métodos descritos en bibliografía para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de una sustancia (Burt, 2004). Entre éstos destaca el basado en la comparación de los valores de velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x.}$) y duración de la fase de latencia (λ) del microorganismo obtenidos a partir de la modelización matemática de los datos de crecimiento del microorganismo (Burt, 2004). Los modelos microbianos son valiosas herramientas para la planificación de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) y la toma de decisiones, ya que nos proporcionan estimaciones de los cambios previstos en las poblaciones microbianas cuando se exponen a un conjunto específico de condiciones (Whiting, 1995). Estos modelos pueden ser clasificados como primarios, secundarios y terciarios (Whiting, 1995). Los modelos primarios describen cómo el número de microorganismos de una población varía con el tiempo bajo condiciones específicas y constantes. Pueden ser de crecimiento, inactivación, supervivencia o combinados (Marks, 2008). Los secundarios describen cómo varían los parámetros de crecimiento de los modelos primarios con cambios en uno o más factores ambientales (Whiting, 1995). Permiten la interpolación en la región comprendida entre dos condiciones ambientales extremas y son fundamentales para el diseño y optimización de

procesos de conservación. Los modelos terciarios combinan primarios y secundarios con un programa informático, dando una herramienta de predicción completa (Marks, 2008).

El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana del açáí frente a *L. innocua* a diferentes temperaturas. Para ello, el crecimiento del microorganismo fue monitorizado y modelizado en presencia de distintas concentraciones de açáí a 12, 22 y 37°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo bacteriano

A partir de un liófilo procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo, se preparó un stock de *L. innocua* (CECT 910T) siguiendo el método previamente descrito por Saucedo-Reyes *et al.* (2009). Las células obtenidas fueron almacenadas en crioviales glicerizados, a -80 °C, hasta su utilización. Su concentración promedio se determinó por recuento en placa y fue de 9.5×10^9 UFC mL⁻¹.

Açaí

Como se ha comentado anteriormente, la capacidad antimicrobiana está relacionada con el contenido en polifenoles (Wen *et al.*, 2003; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2007; Percival *et al.*, 2006; Gañan *et al.*, 2008; Almajano *et al.*, 2007) y dicho contenido en la fruta es variable en función del grado de madurez. Por lo tanto, con el fin de trabajar con una materia prima uniforme, se eligió un extracto comercial en polvo, estandarizado al 10% de contenido en polifenoles, obtenido de bayas liofilizadas (Nature's Way® Products, Inc. Springville, Utah USA).

Ensayo antimicrobiano

Para la determinación de la capacidad antimicrobiana del Açaí se obtuvieron curvas de crecimiento de *L. innocua* utilizando diferentes concentraciones del extracto en polvo medidas en base al contenido de polifenoles.

En primer lugar se probaron a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (37°C) un amplio intervalo de concentraciones (desde 0,165 a 1‰), para caracterizar el efecto antimicrobiano del açaí (ya sea bacteriostático o bactericida). Tras esto, se eligieron tres concentraciones no bactericidas para llevar a cabo los ensayos a distintas temperaturas. Las concentraciones escogidas, expresadas como porcentaje de polifenoles, fueron las siguientes: 0, 0,33‰; 0,5‰ y 0,66‰.

Para la obtención de las curvas se prepararon viales con de 20 mL de TSB (Scharlab Chemie S. A., Barcelona, España) estéril a los que se añadió la concentración deseada de açaí. Todos fueron inoculados con *L. innocua* a concentración de 10^5 UFC mL⁻¹. Una vez inoculados los viales se incubaron a temperatura óptima de crecimiento (37°C); a temperatura ambiente (22°C) y a 12°C (temperatura de cierto abuso de refrigeración), con el fin de conocer cuál sería el efecto del açaí en función de la temperatura de incubación.

El crecimiento de *L. innocua* se cuantificó mediante el recuento de viables en placa. Para ésto se tomaron dos muestras de cada vial a intervalos de tiempo regulares, hasta que se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo. Cada muestra se diluyó en agua de peptona al 1 ‰ (Scharlau Chemie, S. A., Barcelona, Spain) y se sembró por duplicado en placas con agar triptona soja (TSA) (Scharlau Chemie, S. A., Barcelona, Spain). Los recuentos se efectuaron tras 48 h de incubación a 37°C.

Los resultados obtenidos se representaron como el logaritmo decimal de las células viables frente al tiempo. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Modelización

Las curvas de crecimiento obtenidas para las diferentes combinaciones de concentración de açai y temperatura se ajustaron a un modelo primario de crecimiento con el fin de determinar en cada caso los parámetros cinéticos: la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$) y la duración de la fase de latencia (λ). El modelo escogido fue la ecuación modificada de Gompertz, dada su amplia aplicación para el modelaje de curvas sigmoidales (Marks, 2008), caracterizadas por representar el crecimiento microbiano en cuatro fases (fase *Lag* o de adaptación, fase de crecimiento exponencial o logarítmica, fase estacionaria y fase muerte). La aplicación de la función modificada de Gompertz para describir este tipo de comportamiento ha quedado demostrada en diversos estudios (McKellar y Lu, 2004).

La ecuación modificada de Gompertz (Eq. 1) (Gibson *et al.*, 1988) está descrita por la siguiente ecuación:

$$\text{LOG}_{10}(N) = A + Ce^{-e^{-B(t-M)}} \quad [1]$$

donde: N es el número de células a tiempo t , en términos de $\text{LOG}_{10}(\text{UFC mL}^{-1})$; A el valor asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente, con valor aproximado al logaritmo del número inicial de células, expresado como $\text{LOG}_{10}(\text{UFC mL}^{-1})$; C es la diferencia entre el valor superior e inferior de la asíntota (número de ciclos de crecimiento) $\text{LOG}_{10}(\text{UFC mL}^{-1})$; B es la velocidad de crecimiento cuando $t = M(h^{-1})$; y M es el tiempo requerido para alcanzar la velocidad de crecimiento máxima.

A partir de esta ecuación, $\mu_{\text{máx.}}$ y λ se calculan por combinación de los parámetros A, C, B y M (Gibson *et al.*, 1988; McMeekin *et al.*, 1993) (Eq. 2 y 3).

$$\mu_{\text{max}} = \frac{BC}{e} \quad [2]$$

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B}\right) + \frac{\log_{10}(N_0) - A}{BC/e} \quad [3]$$

donde: $e = 2.718$ y N_0 hace referencia al tamaño inicial de la población en $LOG_{10}(UFC \text{ ml}^{-1})$.

La bondad del ajuste de los datos experimentales al modelo primario se estableció mediante el coeficiente de determinación (R^2 ajustado) y el valor del cuadrado medio del error (CME).

Una vez obtenidos ambos parámetros cinéticos de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$ y λ), su relación con la concentración de açai se estableció por ajuste de los parámetros primarios a modelos secundarios lineales basados en el modelo de Bigelow (Bigelow, 1921).

Estos ajustes se realizaron con el programa Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) y con el programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA). Para analizar la bondad de los ajustes se calculó el coeficiente de determinación ajustado (R^2) y CME asociados a cada caso.

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico consistió en un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos de $\mu_{\text{máx.}}$ y λ para cada una de las diferentes concentraciones de açai testadas, en función de la temperatura de incubación ($p\text{-valor} \leq 0.05$). Para comprobar entre qué niveles de cada factor existían diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} \leq 0.05$), se aplicó la prueba de rangos múltiples. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios preliminares del efecto de la concentración de açai sobre el crecimiento de *L. innocua*

El efecto del açai sobre *L. innocua* fue evaluado mediante el seguimiento del comportamiento (crecimiento o inactivación) del microorganismo a 37°C, en presencia de distintas concentraciones del compuesto. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones ensayadas.

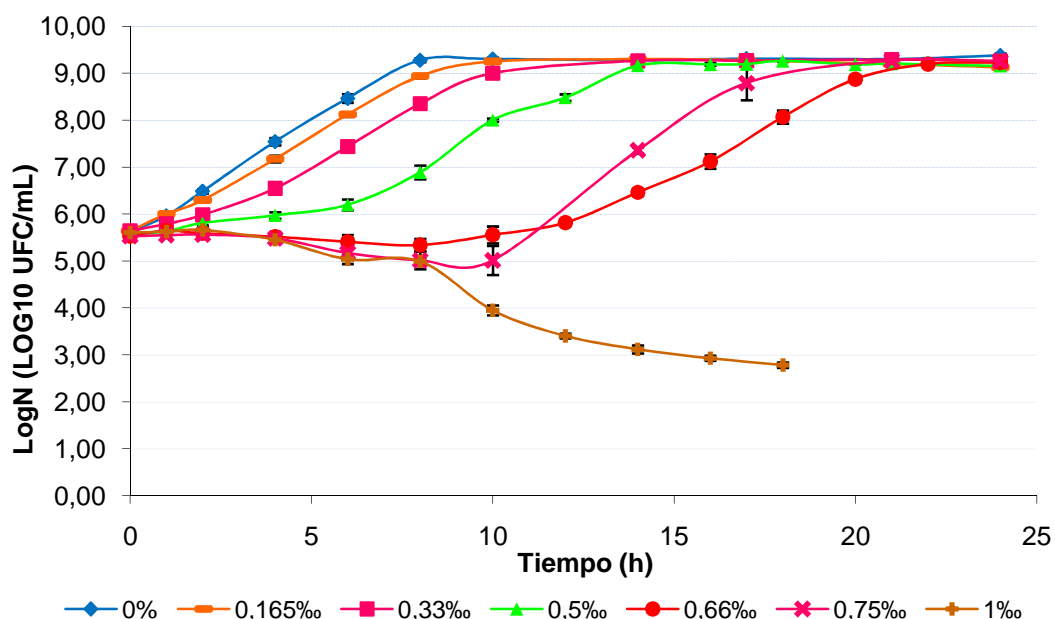


FIGURA 2. Curvas de crecimiento de *L. innocua* para las diferentes concentraciones probadas de açai a 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada valor promedio.

En la figura 2 se observa que el comportamiento del microorganismo depende de la concentración de açai ensayada. Concentraciones de hasta 0,75‰ retrasan el crecimiento del microorganismo, es decir tienen efecto bacteriostático (FAO, 2001), mientras que concentraciones superiores tienen efecto bactericida.

A partir de estos datos se estableció que los estudios posteriores del efecto de la concentración del compuesto a distintas temperaturas se efectuarían para tres concentraciones, no bactericidas, capaces de modificar el crecimiento de *L. innocua* de forma significativa. Se escogieron estas concentraciones porque se trata de utilizar el antimicrobiano natural como

técnica complementaria a otras tecnologías que sí que consigan el efecto bactericida, como se ha hecho en casos similares (Pina-Pérez, 2009a), de modo que la aplicación conjunta de tecnologías permita reducir la intensidad de los tratamientos aplicados y minimizar la concentración de antimicrobiano aplicada (Burt, 2004). Así, las concentraciones escogidas fueron: 0,33, 0,5 y 0,66‰.

Estudio del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *L. innocua*

Antes de conocer el efecto del açaí, en función de la concentración y la temperatura de forma conjunta, se modelizó el efecto que ésta última tiene sobre el microorganismo escogido, en ausencia de açaí (Figura 3).

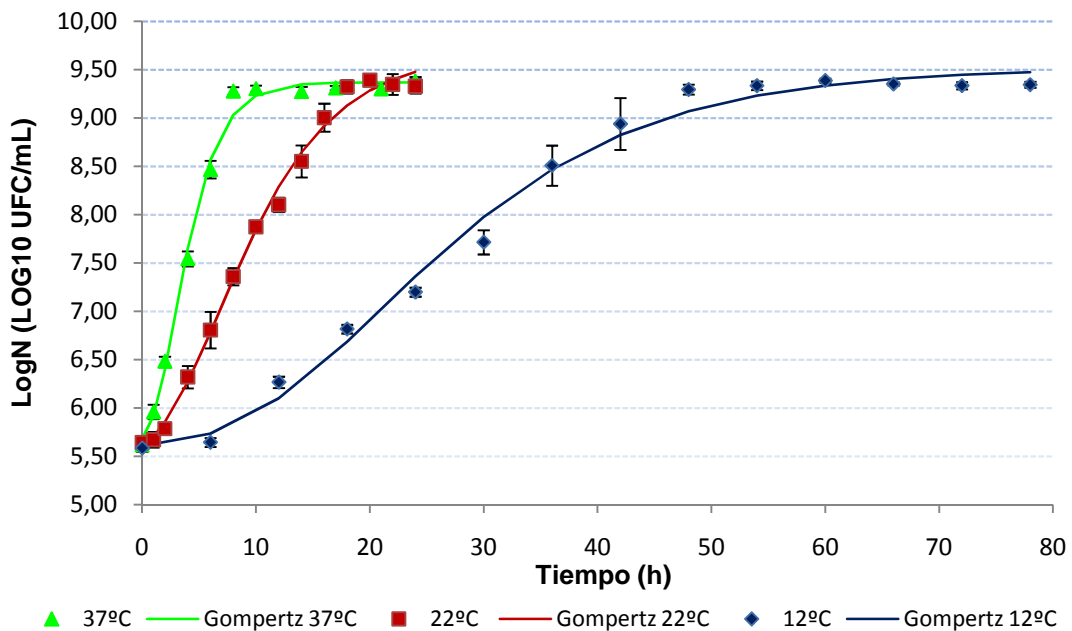


FIGURA 3. Curvas de crecimiento de *L. innocua* a 37, 22 y 12°C junto con el correspondiente ajuste al modelo de Gompertz. Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada valor promedio.

Los datos experimentales obtenidos, en este ensayo y en los sucesivos, fueron ajustados a la ecuación modificada de Gompertz.

Tal y como se observa en la figura 3, y está descrito en numerosas referencias bibliográficas (Walker *et al.*, 1990; Duh y Schaffner, 1993; Whiting y Bagi, 2002; Gospavic *et al.* 2008; Juneja *et al.*, 2009), la temperatura tiene un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *L. innocua*. En la tabla 1 se presentan los valores de $\mu_{\text{máx.}}$ y λ obtenidos junto con la desviación estándar (DS). Así como también se presentan los datos estadísticos del R^2 ajustado (obteniéndose valores superiores al 98%) y el

valor de CME (más buenos cuanto más próximos a 0 sean) que nos determinan la calidad del ajuste.

Se realizó un ANOVA para determinar diferencias significativas entre los valores de $\mu_{\text{máx.}}$ y λ .

TABLA 1. Promedio y desviación estándar (DS) de $\mu_{\text{máx.}}$ y λ en función de la temperatura.

T (°C)	Açaí (% Polifenoles)	$\mu_{\text{máx.}} \pm \text{DS}$ (UFC mL ⁻¹ h ⁻¹)	$\lambda \pm \text{DS}$ (h)	R ² ajustado	CME
37	0	0,65 ± 0,03	0,82 ± 0,07	99,28	0,02
	0,33	0,51 ± 0,03	2,35 ± 0,22	99,62	0,01
	0,5	0,53 ± 0,03	5,35 ± 0,71	99,24	0,02
	0,66	0,47 ± 0,01	12,32 ± 0,26	99,37	0,01
22	0	0,3 ± 0,00	2,12 ± 0,59	99,39	0,01
	0,33	0,24 ± 0,02	6,01 ± 0,81	99,59	0,01
	0,5	0,25 ± 0,01	10,57 ± 0,21	99,05	0,02
	0,66	0,3 ± 0,09	13,99 ± 2,97	98,66	0,02
12	0	0,11 ± 0,01	8,12 ± 1,37	98,78	0,03
	0,33	0,18 ± 0,03	16,86 ± 3,34	98,14	0,05
	0,5	0,11 ± 0,02	30,38 ± 0,76	98,82	0,02
	0,66	0,14 ± 0,01	31,01 ± 2,24	99,50	0,01

Los valores obtenidos nos confirman lo analizado en la figura 3; en ausencia de açaí los valores de $\mu_{\text{máx.}}$ disminuyen ($p\text{-valor} \leq 0,05$), llegando a ser seis veces menores a 12°C en comparación con la temperatura óptima, y de la mitad para temperatura de 22°C. Por otro lado, λ se duplica y cuadriplica para 22 y 12°C, respectivamente con relación al valor obtenido a 37°C.

Modelización del efecto de la concentración de açaí sobre el crecimiento de *L. innocua* a temperatura óptima de crecimiento.

Se modelizó de forma aislada el efecto de las tres concentraciones de açaí elegidas del estudio anterior sobre el crecimiento de *L. innocua* a su temperatura óptima de crecimiento (37°C) con objeto de deducir los parámetros cinéticos en estas condiciones de referencia (Figura 4).

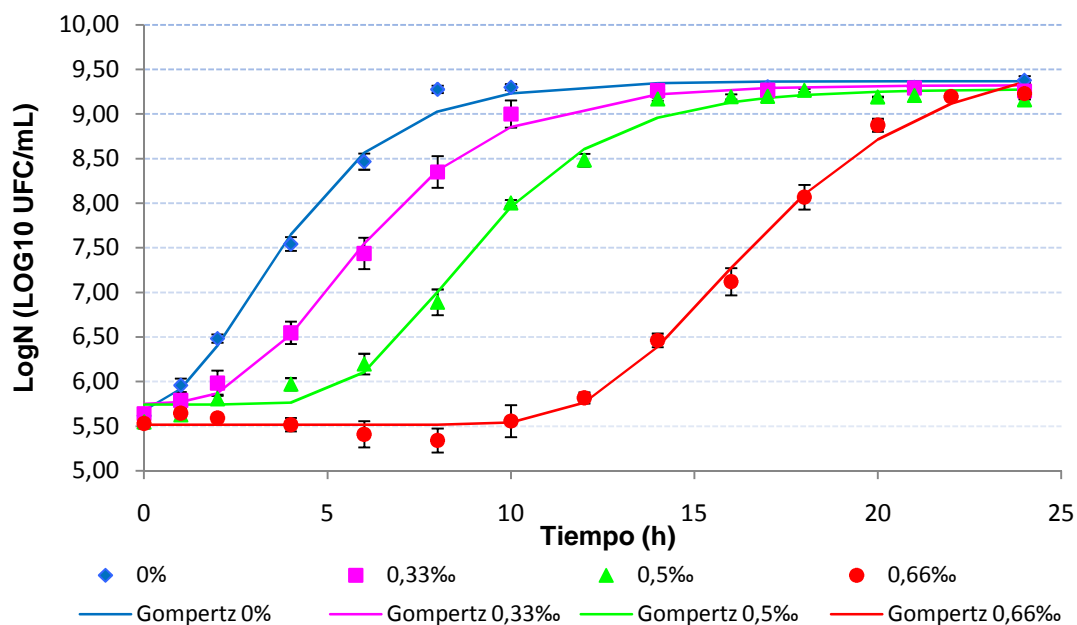


FIGURA 4. Curvas de crecimiento de *L. innocua* a 37°C, en presencia de distintas concentraciones de açai. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos al modelo de Gompertz. Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada valor promedio.

A 37°C, el recuento final de microorganismos es similar, sea cual sea la concentración de açai pero el crecimiento se ve modificado claramente en función de ésta. Tal y como se observa en la figura 4 y en la tabla 1, a mayor concentración de açai, mayor λ , llegando incluso a alargarse hasta 11 veces para la concentración mayor de açai testada ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Desde el punto de vista fisiológico parece que la presencia de açai supone un mayor tiempo de adaptación del microorganismo al medio de crecimiento.

Estudio del efecto combinado de la temperatura y de la concentración de açai sobre el crecimiento de *L. innocua*

El efecto combinado de la temperatura de incubación y la concentración de açai sobre el crecimiento de *L. innocua* también fue evaluado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

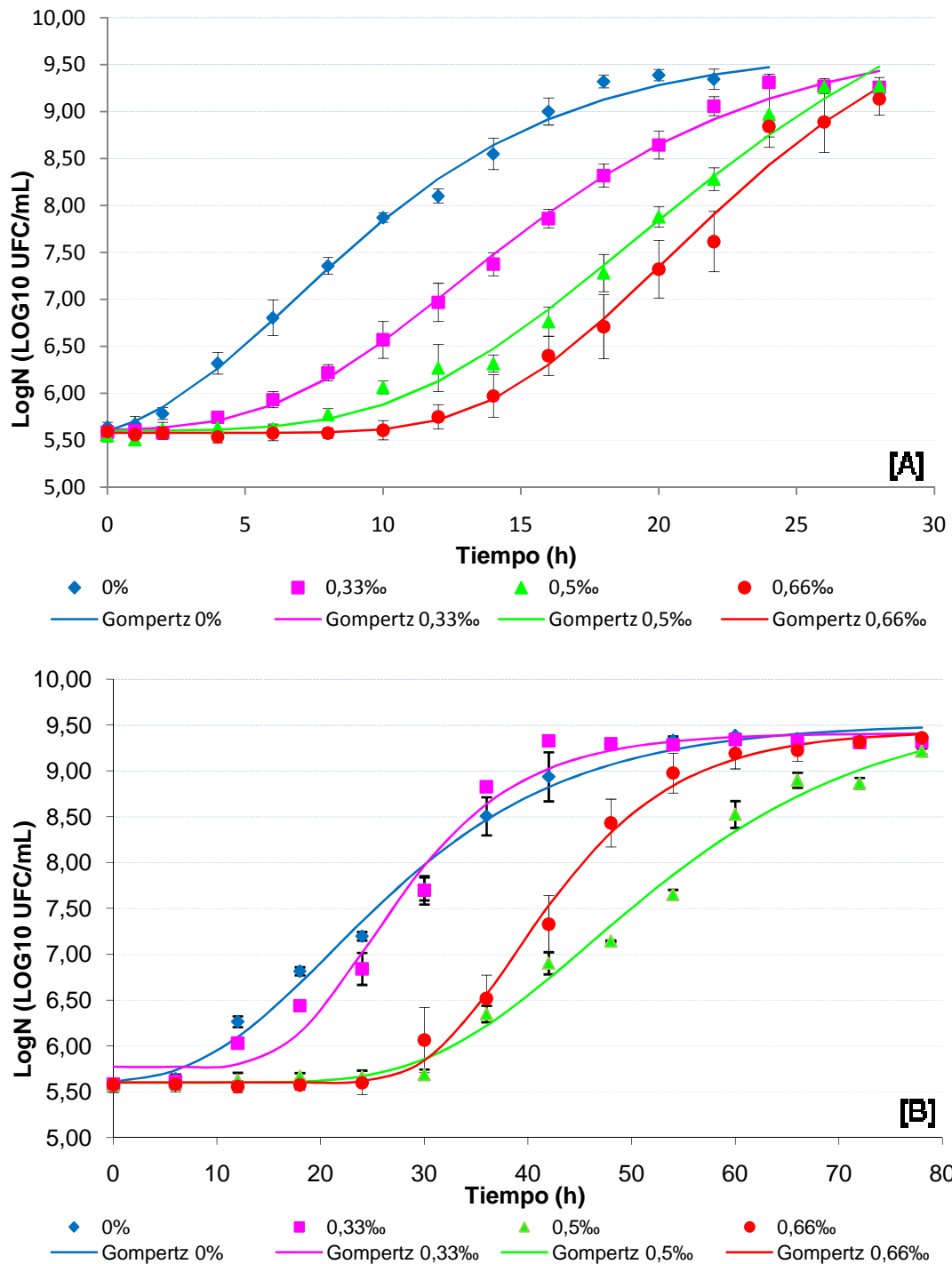


FIGURA 5. Curvas de crecimiento de *L. innocua* a 22°C (A) y a 12°C (B) para las concentraciones de açai 0%, 0,33‰, 0,5‰ y 0,66‰ junto con el correspondiente ajuste al modelo primario de Gompertz. Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada valor promedio.

Al comparar estos datos (Figura 5) con los obtenidos a 37°C, con y sin açai (Figura 4), se observa que la combinación de ambos factores enlentece el crecimiento de la bacteria. A 22°C, por ejemplo, la adición un 0.66 ‰ de açai consigue aumentar en casi 2 horas λ , con respecto al valor obtenido a 37°C. Para descensos de temperatura mayores (12°C), el aumento de λ a esa concentración es de hasta 19 horas superior al dato referente a 37°C.

Además, si evaluamos a 12°C el efecto de la adición de açai, se observa que la fase de latencia aumenta de 8 a 31 horas, multiplicando en casi 4 veces el tiempo que necesita *L. innocua* para comenzar a crecer. Si este análisis lo hacemos a 22°C, es decir en caso de rotura total de la cadena de frío, la duración de la fase de latencia se alarga de 2 a 14 horas. Por lo tanto, en este caso la presencia de açai alarga en más de 7 veces la duración de la fase de latencia suponiendo una barrera extra al desarrollo de *L. innocua* en el alimento.

El uso de este tipo de sustancias antimicrobianas naturales está pensado como complemento a otras tecnologías de conservación también respetuosas con las propiedades del alimento, como por ejemplo las altas presiones hidrostáticas. En la actualidad existen aplicaciones comerciales de esta tecnología en la pasteurización de alimentos y que por lo tanto conllevan su distribución y venta en la cadena de frío. En estos casos la existencia de este tipo de ingredientes naturales con capacidad antimicrobiana supone una barrera extra para garantizar la seguridad del alimento en el momento de consumo si hubiera rotura durante un tiempo limitado (hasta 12h) de la cadena de frío.

Ajuste de los parámetros cinéticos obtenidos a modelos secundarios

Con el objetivo de determinar el efecto de la temperatura y la concentración de açai sobre los parámetros primarios de crecimiento obtenidos, éstos se ajustaron a un modelo secundario lineal basado en el modelo de Bigelow (Bigelow, 1921).

El $\ln \lambda$ mostró una correlación lineal positiva con la concentración de açai (Figura 6). Las ecuaciones obtenidas para cada temperatura quedan recogidas en la Tabla 2. En ella se adjunta además el valor de R^2 asociado en cada caso.

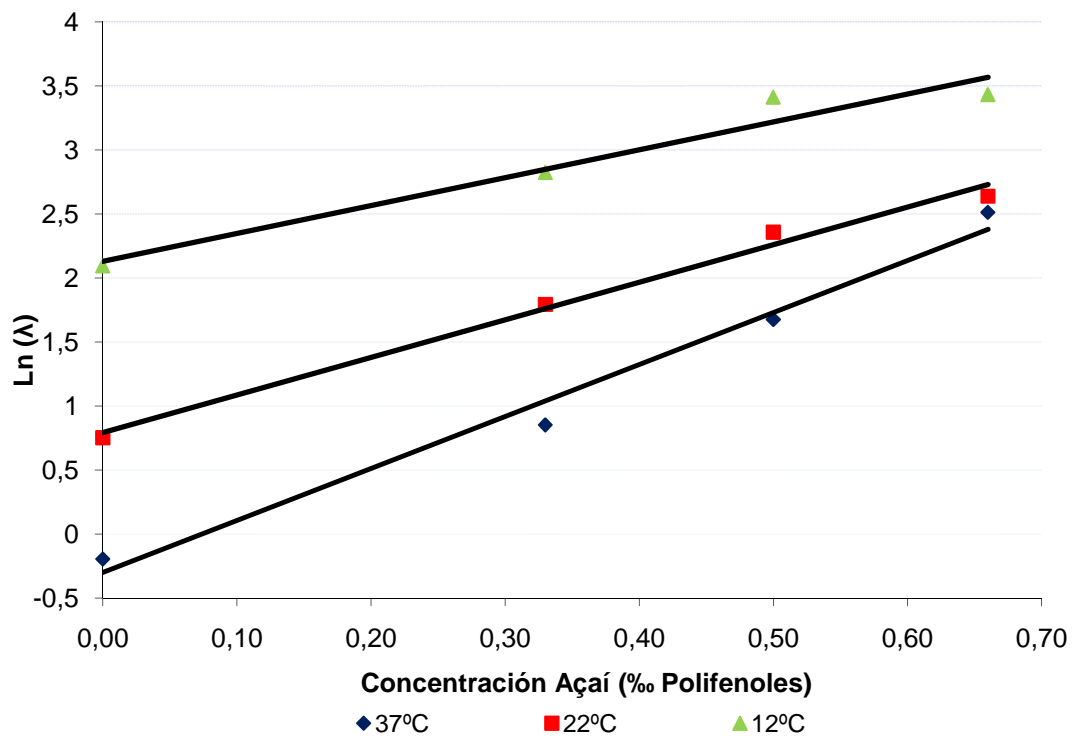


FIGURA 6. Ajuste a modelo secundario basado en la ecuación de Bigelow, representando $\ln \lambda$ frente a concentración de açai para las diferentes temperaturas utilizadas (37, 22 y 12°C).

TABLA 2. Relaciones lineales encontradas en el ajuste de parámetros cinéticos a modelos secundarios.

Representación	T (°C)	Ecuación	R ²
<i>Ln λ vs. concentración Açai (% Polifenoles)</i>	37	$y = 4,0626x - 0,3016$	R ² = 0,983
	22	$y = 2,9359x + 0,7919$	R ² = 0,990
	12	$y = 2,1809x + 2,1296$	R ² = 0,952

La relación establecida es en todos los casos estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

El hecho de que el valor de la pendiente de la ecuación sea elevado indica una fuerte dependencia entre el parámetro y la condición ambiental a la que se enfrenta. En nuestro caso, la pendiente más elevada se encuentra a 37°C; eso implica que el efecto sobre λ al aumentar la concentración de açai a 37°C es mayor que a 22 y 12°C. Probablemente, a temperaturas no óptimas de crecimiento se activan mecanismos generales de respuesta a estrés que permiten que la bacteria resista mejor el incremento de açai a bajas temperaturas. A 37°C estos mecanismos están inactivados y *L. innocua* es más sensible a cambios en la concentración del agente.

CONCLUSIONES

La adición de açáí en diferentes concentraciones modifica la pauta de crecimiento de *Listeria innocua* presentando un efecto bacteriostático para concentraciones de hasta 0,75‰ y bactericida para concentraciones superiores.

La adición de las diferentes concentraciones establecidas y el almacenamiento a temperaturas de refrigeración afectan negativamente al crecimiento de esta bacteria, sobre todo alargando el tiempo que requiere para adaptarse al entorno y empezar a crecer, pues el valor del parámetro λ aumenta de forma significativa a medida que aumenta la concentración de açáí y disminuye la temperatura.

Este estudio pone de manifiesto que existe un efecto sinérgico entre ambos factores (temperatura de almacenamiento y concentración de açáí), lo que supone una medida adicional de control a utilizar por la industria para ayudar a garantizar la inocuidad de alimentos mínimamente procesados con la adición de un ingrediente vegetal que aporta, además, beneficios para la salud del consumidor, lo cual proporciona un valor añadido al producto, sin alterar negativamente sus propiedades, y ayudando a su conservación incluso aunque se produzca un cierto abuso en temperatura de almacenamiento o una rotura de la cadena de frío.

AGRACEDIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Dña Dolores Rodrigo Aliaga y al Dr. D. Antonio Martínez López, directores de esta tesis final de máster, su continua ayuda y apoyo, pues sin ellos este trabajo no hubiera podido salir adelante. Muchas gracias por acogerme un vuestro laboratorio.

Muy especial a Clara Miracle Belda Galbis por estar siempre ahí cuando la he necesitado y por formar parte de esto.

A mis compañeros de laboratorio: Nieves, Ángela, Josepa, Chelo, María, Carmen y Cheche, por hacer muy agradable mi estancia en el IATA. Siempre os recordaré.

A mis compañeros y amigos del Máster y de Biología porque hemos pasado muy buenos momentos juntos y les deseo lo mejor en este incierto futuro profesional. Muy especial a Andrea.

A mis amigos y amigas de toda la vida por apoyarme y formar parte de mí, en especial a Miguel.

A mis padres, a mi hermano y a mi familia por apoyarme en esta carrera.

BIBLIOGRAFÍA

- Almajano, M.P.; Carbó, R.; López Jiménez, J.A.; Gordon, M.H. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.
- Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.H.; Palou, E.; Swanson, B.G. (1997) *Nonthermal Preservation of Foods*, Marcel Dekker: New York, p 304.
- Bigelow W.D. (1921) The logarithmic nature of thermal death time curves. *The Journal of Infectious Diseases*, 29, 528-536.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Del Pozo-Insfran, D.; Brenes, C. H.; Talcott, S. T. (2004) Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1539-1545.
- Duh, Y. y Schaffner, D.W. (1993). Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. Vol. 56, 205-210.
- EFSA 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and foodborne outbreaks on the European Union in 2008.
- FAO (2001). Glossary of Biotechnology for Food and Agriculture.
- Fitzgerald, D.J.; Stratford, M.; Gasson, M.J.; Ueckert, J.; Bos, A.; Narbad, A. (2004) Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 104-113.
- Gallori, S.; Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Barbosa, W. L. R.; Vincieri, F. F. (2004) Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai palm). *Chromatographia*, 59, No. 11/12.
- Gañan, M.; Martínez-Rodríguez, A.; J, Carrascosa, A.V. (2008). Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control* 20, 739-742.
- 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, 155-178.
- Gospavic, R.; Kreyenschmidt, J.; Brucker, S.; Popov, V; Haque, N. (2008) Mathematical modeling for predicting the growth of *Pseudomonas spp.* in poultry under variable temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 290-297.
- Institute of Food Technologist (IFT). Emerging Microbiological Food Safety Issues: Implication for Control in the 21th Century. IFT's International Food Safety and Quality Conference and Expo in Atlanta. 2002.
- Juneja, V.K.; Valenzuela, M.; Huang, L; Subbiah, J.; Thippareddi, H. (2009) Mathematical modeling of growth of *Salmonella* in raw ground beef under isothermal conditions from 10 to 45°C. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 106-111.
- Kang, J.; Xie, C.; Li, Z.; Nagarajan, S.; Schauss, A. G.; Wu, T.; Wu, X. (2011) Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, 128, 152-157.
- Lichtenthäler, R.; Belandrinio, R.; Guilherme, J.; Papagiannopoulos, M.; Fabricius, H.; Marx, F. (2005) Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) fruits. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 53-64.
- Marks, B.P. (2008) Status of microbial modelin in food process models. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 7.
- McKellar, R.C. y Lu X. (2004) Modeling microbial responses in food. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- McMeekin T. A.; Olley J.; Ross T.; Ratkowsky D. A. (1993). Predictive Microbiology: Theory and application. John Wiley & Sons. New York.

- 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 Açai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7796-7802.
- Neida, S., y Elba, S. (2007) Caracterización del Açai o manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): un fruto del Amazonas. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, Vol. 57, N° 1.
- Percival, R.S.; Devine, D.A.; Duggal, M.S.; Chartron, S.; Marsh, P.D. (2006) The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *European Journal of Oral Science*, 114, 343–348.
- Pina-Pérez, M.C.; Silva-Angulo, A.B.; Rodrigo, D.; Martínez, A. (2009a) Synergistic effect of Pulsed Electric Fields and CocoonOX 12% on the inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 196-204.
- Pina-Pérez, M.C.; Rodrigo, D.; Martínez, A. (2009b) Sub-lethal damage in *Cronobacter sakazakii* subsp. *Sakazakii* cells after difference pulsed electric field treatments in infant formula milk. *Food Control*, 20: 1145-1159.
- Rodríguez-Vaquero, M.J.; Alberto, M.R.; Manca de Nadra, M.C. (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 587–593.
- Saucedo-Reyes, D.; Marco-Celdrán, A.; Pina-Pérez, M.C.; Rodrigo, D.; Martínez, A. (2009) Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary – and exponential – phase *Listeria innocua* cells. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 10, 135-141.
- 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 oleracea* Mart. (Açai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 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 freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Açai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8598-8603.
- 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, 5987-6000.
- Walker, S.J.; Archer, P.; Banks, J.G. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 68. 157-162.
- Wen, A.; Delaquis, P.; Stanich, K.; Toivonen, P. (2003). Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, 20, 305–311.
- Whiting, R.C. (1995). Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 467–94.
- Whiting, R.C. y Bagi, L.K. (2002) Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 291-295.
- Wouters, P.C.; Dutreus, N.; Smelt, J.P.P.M.; Lelieveld, H.L.M. (1999) Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65 No. 12, p. 5364-5371.

Recursos web:

- <http://www.cuidadoysalud.com> (Accedido el 07-06-11).
- <http://www.findmeacure.com> (Accedido el 07-06-11).