



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Nuevas metodologías de análisis basadas en E-Nose para detectar el deterioro microbiológico en emulsiones de alimentos conservados naturalmente

D. Juan de Dios Hernández Cánovas
2021

Contenido

1. SUMARIO	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. OBJETIVOS	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>CITRUS SPP.</i> Y COMPONENTES <i>ANETHUM GRAVEOLENS</i> CONTRA <i>CANDIDA METAPSILOSIS</i> EN SALSA RANCHERA	23
4.1.1. Introducción	23
4.1.2. Materiales y métodos.....	25
4.1.3. Resultados y discusión.....	32
4.2. CROMATOGRAFÍA DE GAS HEAD-SPACE ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE MAYONESA POR LEVADURAS.	44
4.2.1. Introducción	44
4.2.2. Materiales y métodos.....	49
4.2.3. Resultados y discusión	55
5. CONCLUSIONES.....	73
6. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	75
7. EQUIPOS.....	78
8. BIBLIOGRAFÍA.....	79

1. SUMARIO

Se llevó a cabo un estudio para probar el efecto inhibidor de un compuesto alimentario natural (NFC), basado en flavonoides de cítricos y eneldo, en la industria alimentaria. El efecto inhibidor de NFC se comparó con una mezcla común de conservantes químicos utilizados en este tipo de salsas: sorbato de potasio y benzoato de sodio (S/B). Se realizó una prueba *in vitro* mediante el ensayo en placa de microtitulación (microtiter) a 10, 25 y 37 °C durante 24 h en Caldo de Triptona de Soja modificado. Se observó un efecto antimicrobiano aditivo en la combinación de ácido acético y NFC. Los resultados del ensayo de microtiter fueron validados en una prueba en salsa ranchera a 5, 25 y 37 °C durante 10 semanas. NFC mostró un efecto fungicida parcial contra *Candida metapsilosis*

Se propone la cromatografía de gases (GC) del espacio de cabeza (HS) acoplada a la espectrometría de masas (MS) para la evaluación de la contaminación de diferentes salsas como alternativa al recuento en placa de Petri, que es la técnica comúnmente utilizada para evaluar la contaminación microbiana. Más específicamente, este método se aplicó en la detección de *C. metapsilosis* y *Zygosaccharomyces bailii*, ambas levaduras de gran importancia en términos de deterioro en la industria alimentaria ya que son resistentes a muchos de los métodos habituales de conservación de dichos alimentos.

Se investigaron diferentes modelos quimiométricos utilizando los datos obtenidos por GC-MS (perfil m/z, área de los picos cromatográficos y perfil cromatográfico completo), con el fin de obtener el mayor éxito de detección del deterioro de origen microbiano en salsas alimentarias debido a las especies de levaduras estudiadas.

2. INTRODUCCIÓN

Salsas

Las salsas, aderezos y mayonesas son de uso habitual en la vida diaria de muchos consumidores. Por lo general se envasan en recipientes pequeños, desechables y fáciles de usar, hechos de materiales ligeros y, por lo tanto, podrían considerarse alimentos preparados listos para su consumo (Sikora y col., 2008). Las palabras “salsas y aderezos” se refieren a emulsiones como helado, leche, margarina, mayonesa, aderezos para ensaladas y salsas condimentadas, como salsa barbacoa, ketchup y salsa para espaguetis. En general, estos productos son emulsiones ajustadas a un pH bajo, que contienen un aceite vegetal o un sucedáneo de aceite sin grasa y una fase acuosa que contiene sal. Los aceites vegetales y los sucedáneos de aceite sin grasa no contribuyen al bajo pH de estos productos (Pourkomialian, 2000). El ácido predominante en la fase acuosa es el acético y en menor medida, dependiendo de la formulación, el ácido láctico, cítrico o ambos. Además, pueden estar aromatizadas con ingredientes que contienen ácidos como suero de leche, crema agria, queso azul, queso parmesano y otros productos lácteos fermentados (ácido láctico), jugo de limón (ácido cítrico), condimentos de pepinillos (ácidos láctico y acético), y sólidos de tomate (ácidos cítrico, ascórbico y málico) solo por mencionar algunos (Smittle, 2000). Todos estos productos alimenticios son gotitas líquidas o sólidas (fase dispersa) suspendidas en otra fase (continua). Una emulsión es un tipo común de dispersión (Pourkomialian, 2000). Las emulsiones constan de dos líquidos inmiscibles (generalmente aceite y agua), con uno de los líquidos disperso como pequeñas gotas esféricas en el otro. En una emulsión de dos fases,

un líquido se dispersa en otro en forma de gotas grandes ($\geq 0,3 \mu\text{m}$) (Friberg y col., 2004; Sikora y col., 2008). Un sistema que se compone de gotitas de aceite dispersas en fase acuosa se denomina emulsión oleo-acuosa (O/A) y la disposición opuesta (agua en aceite) se denomina emulsión acuo-oleosa (A/O). Los aderezos para ensaladas cubren un amplio espectro de composición de aceite en agua (O/A) y algunos productos se definen según su contenido de aceite. La mayoría de los aderezos para ensaladas no tienen una identidad estándar y se componen de un 10–45% de aceite (Hoeﬂer, 2004; Sikora y col., 2008). Las partículas hidrocoloides ayudan a estabilizar las emulsiones cuando forman recubrimientos de película delgada y/o estabilizan burbujas de aire y glóbulos de agua o aceite. Las partes hidrófilas de los polímeros están unidas por agua y son hidrófobas, por aire o aceite. En el caso de las espumas, esto conduce a la fácil formación de burbujas de aire que se dispersan en agua y, en el caso de emulsiones, a glóbulos acuosos u oleosos. La película hidrocoloide que rodea a las burbujas o glóbulos los protege de la reagregación, ya que todas las gotas recubiertas tienen la misma carga y provocan repulsión. La formación de redes de alta viscosidad disminuye la movilidad de las partículas dispersas y protege el contacto y la agregación de burbujas o glóbulos, estabilizando así todo el sistema (Sikora y col., 2008).

Historia de las salsas

Los babilonios usaron aceite y vinagre para aderezar verduras hace casi 2.000 años. Los egipcios preferían una ensalada aderezada con aceite, vinagre y especias asiáticas. Posiblemente, la salsa europea más antigua registrada es el *garum*, la salsa de pescado utilizada por los antiguos romanos; mientras que el *doubanjiang*, la pasta de soja china se

menciona en los Ritos de Zhou en el siglo III a. C. Se dice que la mayonesa hizo su debut en la mesa de un noble francés hace más de 200 años (Smith, 1998).

Más cerca en el tiempo tenemos ejemplos de los pasos iniciales dados en la industrialización de las salsas de la mano de dos pioneros ambos en EEUU. En 1896, Joe Marzetti abrió un restaurante en Columbus, Ohio (EE. UU.) Empezó sirviendo con las comidas una amplia variedad de aderezos, lo que le hizo ganar popularidad entre los estudiantes de la Ohio State University, llegando a convertirse en un restaurante de primer nivel. En 1919, Joe comenzó a envasar y vender sus salsas a los clientes del restaurante. (Association for Dressings and Sauces, 2021).

En 1912, Richard Hellmann, propietario de una tienda de delicatessen en Nueva York empezó a vender su mayonesa *Blue Ribbon* en recipientes de madera. Un año después, en respuesta a una demanda muy fuerte de los consumidores, Hellmann comenzó a comercializar la mayonesa en frascos de vidrio. (Association for Dressings and Sauces, 2021).

En 1925, la Kraft Cheese Company entró en el negocio de los productos para ensaladas con la compra de varios fabricantes regionales de mayonesa y la Milani Company (lo que dio a Kraft la puerta de entrada al negocio de los aderezos vertibles con *French Dressing*, su primera variedad de salsa). (Association for Dressings and Sauces, 2021).

Importancia de las salsas en el mundo. Análisis del mercado global de 2020: condimentos, aderezos y salsas

Definición de categorías

a. Salsas para condimentar: salsas comestibles que se agregan como ingredientes a diversos alimentos para realzar su sabor. Incluye salsas de soja, p. Ej. Salsa de soja de

Colman.

- b. Salsas para mojar o bañar: un condimento típicamente espesado con crema de tomate u otra crema base que se usa para añadir sabor o textura a los alimentos. Se usa principalmente para bocadillos que se bañan en la salsa, a diferencia de las salsas anteriores.
- c. Aderezos: Salsa servida como acompañamiento de comidas y ensaladas. Incluye mayonesa, aderezos cremosos, vinagreta, salsa de tomate, entre otros.
- d. Salsas para cocinar: Incluye todas las salsas para pasta y otras salsas que se adicionan en una receta antes de someterlas a cocción. Las recetas pueden incluir carne y/o verduras. También son conocidas como “salsas para verter”. Por ejemplo, Homepride Cook-in Sauces, Knorr's Cantonese Sweet & Sour Sauce.

Visión global y pronóstico de crecimiento del mercado de Condimentos, Aderezos y Salsas (CAS)

El sector mundial de CAS se valoró en 107.654,6 millones de dólares en 2017 y se prevé que alcance los 141.473,8 millones de dólares en 2022, registrando una tasa de crecimiento anual compuesto del 5,6%.

Región	Valor 2017 (Mill. de \$)	TCAC Valor (2017-2022)	Volumen 2017 (Mill. de Kg)	TCAC Volumen (2017-2022)	Consumo per cápita (Kg) 2017	Gasto per cápita (\$) 2017
Global	107.654,6	5,6%	25.206,5	2,7%	4,8	20,7
Américas	34.875,4	4,2%	3.369,1	2,1%	3,9	40,1
Asia-Pacífico	40.869,5	7,3%	3.185,2	2,1%	0,9	12,2
Europa del Oeste	21.517,2	4,8%	10.204,2	2,7%	24,7	52,0
Europa del Este	8.068,5	5,2%	6.267,9	3,7%	17,5	22,5
Oriente Medio y África	2.324,0	5,3%	2.180,1	1,3%	10,9	11,6

Tabla 1. Descripción general del mercado global y regional de CAS: tamaño del mercado, crecimiento y análisis per cápita, 2017-2022*. GlobalData (2018). *Opportunities in the Seasonings, Dressings & Sauces Sector.*

Las salsas por regiones/continentes. Panorama regional del mercado de CAS

Asia-Pacífico representa actualmente el mercado regional de CAS más grande del mundo, seguido de América. Europa Occidental representó una participación de valor del 20% en el sector mundial de CAS en 2017 y se espera que crezca desde los 21.517,2 millones de dólares en 2017 hasta los 27.169,5 millones de dólares en 2022, registrando una tasa anual de incremento del 4.8%.

La creciente demanda de los consumidores de productos convenientes, como salsas para cocinar y purés de tomate que reducen el tiempo de cocción y el creciente interés en sabores étnicos como el tailandés, indio y mexicano, están impulsando el crecimiento en el sector CAS, (GlobalData, 2018).

Las Américas, entendiendo por esta denominación al conjunto del Continente Americano fue la segunda región más grande en el mercado de CAS con una participación de valor del 32,4% en 2017 y se prevé que registre una tasa anual compuesta de incremento del 4,2% durante el periodo 2017-2022.

El aumento de los ingresos disponibles, la creciente demanda de opciones étnicas con nuevos sabores más intensos y el crecimiento de la popularidad de los productos naturales/orgánicos está impulsando la demanda de condimentos, aderezos y salsas en América (GlobalData, 2018).

Se pronostica que Europa del Este, que tenía una participación de valor del 7.5% en el sector mundial de CAS en 2017, registrará una tasa anual compuesta de incremento del 5,2% durante el periodo 2017-2022 para alcanzar 10.407,8 millones de dólares en 2022 desde los 8.068,5 millones de dólares en 2017. El aumento de los consumidores que demandan productos y sabores diferentes y el crecimiento de la demanda de productos y salsas de conveniencia impulsará el crecimiento del sector de CAS en la región (GlobalData, 2018).

Descripción general del mercado de CAS por regiones

Las salsas para cocinar* fue la categoría más importante en las Américas y Europa Occidental, mientras que las salsas para condimentar dominaron la región de Asia-Pacífico. Las salsas para cocinar son el mercado más grande, representando el 21,9% del valor total de ventas de CAS en 2017. Se espera que la categoría crezca desde los 4.715,4 millones de

dólares en 2017 a 5.540,5 millones de dólares en 2022, a una tasa anual compuesta del 3,3%. Las salsas para condimentar es el segundo mercado más grande, con ventas por valor de 3.145,6 millones de dólares en 2017, seguido por hierbas, especias y condimentos y aderezos, que registraron ventas por valor de 2.797 millones de dólares y 2.654,6 millones de dólares, respectivamente, en 2017 (GlobalData, 2018).

En las Américas, las salsas para cocinar constituyeron la categoría más grande de CAS en 2017, con un monto de 6.489 millones de dólares (18,6% del sector general de condimentos, aderezos y salsas en las Américas). Se espera que la categoría alcance los 8.126,7 millones de dólares en 2022, creciendo a una tasa anual compuesta del 4,6%. Los aderezos y salsas para condimentar son las otras categorías principales en la región, que representan una participación de valor del 17,7% y 16,6%, respectivamente, en 2017. Según pronostica GlobalData (2018), la categoría de chutneys (condimentos agridulces originarios de La India) y otros condimentos relacionados producirá la tasa de crecimiento más alta con un 4,9% durante 2017-2022.

En la región Asia-Pacífico, las salsas para condimentar fueron también la categoría más grande en volumen de comercio en 2017, representando 18,243.5 millones de dólares (44.6% del sector general de condimentos, aderezos y salsas en Asia-Pacífico) y se espera que alcance 26.868,9 millones de dólares en 2022, creciendo a una tasa anual compuesta del 8.1%. Las hierbas, especias y condimentos por una parte y aderezos por otra, son las otras dos categorías de CAS principales en la región, que representan cuotas de valor del 12,5% y 11,4%, respectivamente, en 2017 (GlobalData, 2018).

En la región de Europa del Este, los aderezos representaron la categoría más grande, con 2.278,8 millones de dólares (28.2% del sector CAS) en 2017 y se espera que alcancen los 2.789,4 millones de dólares en 2022, creciendo a una tasa anual compuesta del 4.1%. A escala de países, solo Rusia representó el 49% del valor del sector en 2017, seguida de Polonia (19,2%) y Turquía (11%) (GlobalData, 2018).

Visión general de países con alto potencial de crecimiento en el mercado CAS

Se ha observado un significativo incremento de la popularidad de productos sin conservantes y etiquetas tipo "sin sodio/sal añadida" en Europa Occidental.

Con base en el desempeño relativo de países en múltiples métricas, Dinamarca, los Países Bajos, España y Austria fueron preseleccionados como países de alto potencial de crecimiento del mercado de CAS, principalmente debido al gran valor del actual sector CAS, las tasas de crecimiento proyectadas de alto valor y los niveles de crecimiento previstos en la renta per cápita.

Entre los países preseleccionados de alto potencial, España es el mercado más grande con un valor en ventas de 2.146,6 millones de dólares en 2017, seguido de los Países Bajos y Austria. En términos de crecimiento, durante 2017-2022 se espera que el sector de CAS danés crezca más rápido, registrando una TCAC del 6,7%, seguido de España, que se espera que crezca a una TCAC del 6,6%. Además de la creciente demanda de productos de conveniencia y sabores étnicos/exóticos, una mayor conciencia de los beneficios percibidos de los productos naturales sin conservantes y la creciente popularidad de los productos con

declaraciones como 'sin grasa', 'sin sodio/sal añadidos' y 'sin azúcar añadido' impulsan las ventas en estos países (GlobalData, 2018).

En lo referente a la Américas, según el análisis relativo de los países en múltiples métricas, EE. UU., Canadá, México y Chile fueron preseleccionados como países de alto potencial de crecimiento del comercio de CAS, principalmente debido al gran tamaño del sector de condimentos, aderezos y salsas, las tasas de crecimiento del sector CAS y las proyecciones de crecimiento de la renta per cápita. Se prevé que Canadá registre el mayor crecimiento entre los países de alto potencial con una tasa anual compuesta del 6.7% durante el periodo 2017-2022. Así mismo se espera que EE. UU. y Chile produzcan un CAGR de alto volumen del 2.9% cada uno durante el mismo período (GlobalData, 2018).

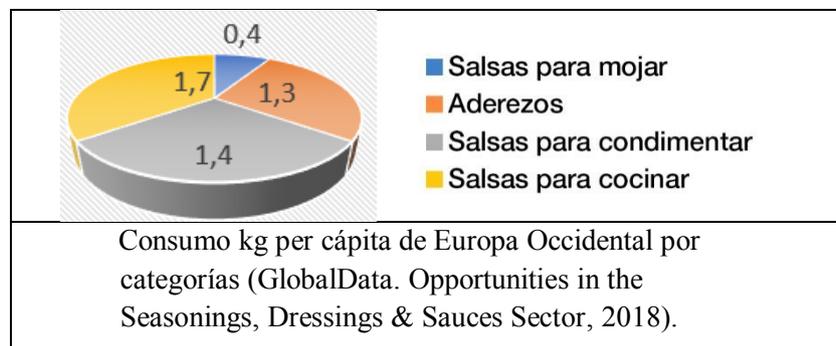
En la región Asia-Pacífico, el análisis de los diversos valores comerciales del sector CAS muestran a Nueva Zelanda, China, Corea del Sur e Indonesia como países de alto potencial de crecimiento comercial en CAS, principalmente debido al gran tamaño actual de este sector, las elevadas tasas de crecimiento proyectadas y el mayor aumento general de la renta per cápita previsto. Asimismo, se considera que China va a registrar el mayor crecimiento de valor entre los países de alto potencial de la región Asia-Pacífico, con una tasa anual compuesta del 10% durante el periodo 2017–2022.

Se espera que Indonesia y China experimenten el mayor crecimiento de volumen de CAS con unas tasas de crecimiento anual compuesto del 5.2% y 4.7%, respectivamente, durante el mismo período (GlobalData, 2018).

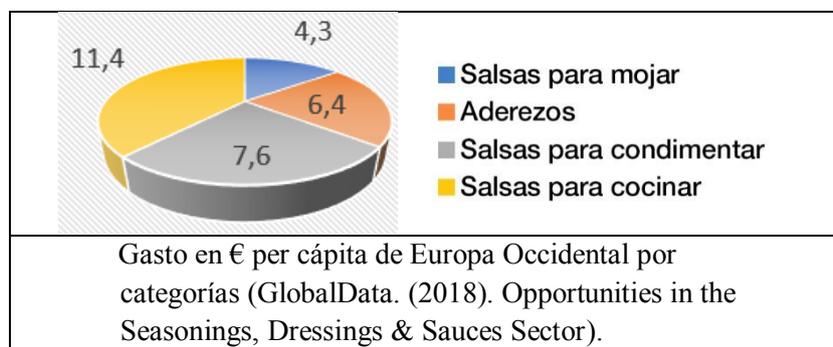
En Europa del Este, Polonia ocupó el segundo puesto en volumen de ventas con 1.550,6 millones de dólares y se prevé que registre una tasa de crecimiento anual compuesta del 8,1% durante el periodo 2017-2022. Se espera que Rumanía registre el CAGR más alto con un 11,1% durante 2017-2022 en términos de valor. También se espera que Rumanía lidere el crecimiento de volumen con un CAGR del 5,7% durante el mismo período (Global Data, 2018).

Resumen detallado del consumo y gasto per cápita por categorías: Europa Occidental. Países con un potencial de crecimiento medio y alto, 2017

Las salsas para cocinar registraron el mayor consumo per cápita en Europa Occidental con 1,7 kg. en 2017, seguidas de las salsas condimentadas con 1,4 kg. El predominio de las salsas para cocinar refleja la gran demanda de productos alimenticios convenientes o de consumo cómodo (*convenience foods*) y a la vez saludables en Europa occidental, especialmente en las regiones muy urbanizadas. Por otro lado, un número considerable de consumidores europeos están abiertos a experimentar con cocinas únicas y exóticas, lo que está impulsando la demanda de salsas más condimentadas en la región. (GlobalData, 2018).



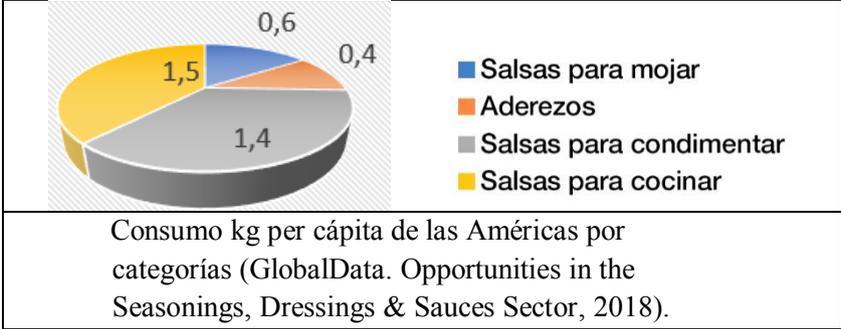
Las salsas para cocinar registraron el mayor gasto per cápita (11,4 \$) en 2017, seguidas de las salsas condimentadas (7,6 \$). Especialmente los adultos jóvenes (de 18 a 24 años), que no quieren dedicar mucho tiempo a la cocina, buscan productos alimenticios como salsas para cocinar que ayudan a reducir el tiempo de preparación. El alto gasto en salsas condimentadas se debe a la dieta de la región, que incluye alimentos a base de pan que facilitan el uso elevado de salsas como salsas de chile, ketchup y mostazas (GlobalData, 2018).



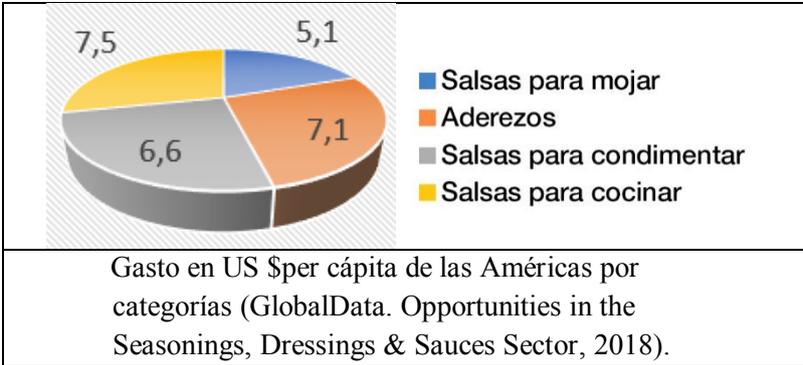
Resumen detallado del consumo y gasto per cápita por categorías: Américas*. Países con un potencial de crecimiento medio y alto, 2017

En la región de las Américas, las salsas para cocinar registraron el mayor consumo per cápita en el año 2018, con 1,5 kg, seguidas de las salsas condimentadas con 1,4 kg. El aumento de la demanda de salsas especiales con varios sabores e ingredientes exóticos ha impulsado el crecimiento de las salsas para cocinar. Con la nueva generación del siglo XXI (*millennials*),

más receptiva a probar y apreciar los sabores propios de la gastronomía de otros países y culturas, las mezclas no convencionales de especias y condimentos están experimentando una mayor demanda en el sector CAS (GlobalData, 2018).

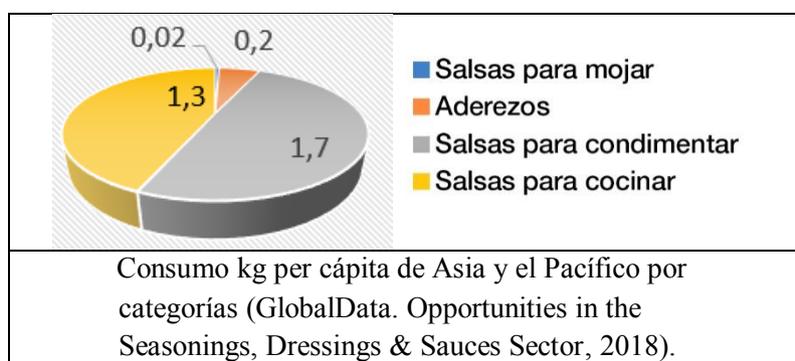


Las salsas para cocinar y aderezos registraron un gasto per cápita de 7,5 dólares y 7,1 dólares respectivamente. El aumento de la demanda de productos naturales en países desarrollados en oferta CAS tradicional, como Canadá y EEUU, está impulsando a los fabricantes a utilizar cada vez más nutrientes frescos y saludables en sus productos. (GlobalData, 2018).

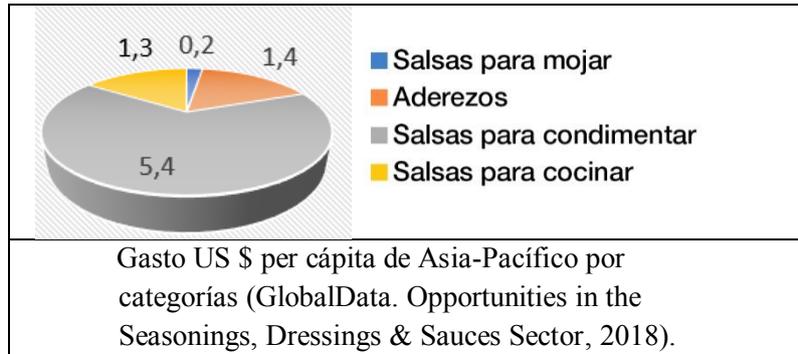


Resumen detallado del consumo y gasto per cápita por categorías: Asia-Pacífico*. Países con un potencial de crecimiento medio y alto 2017

En la región Asia-Pacífico durante el año 2018 las salsas para condimentar registraron el mayor consumo per cápita, con 1,7 kg. Entre los países de alto potencial, Nueva Zelanda y China tienen el mayor consumo per cápita de salsas para condimentar. China, aunque es el mayor consumidor de productos CAS en la región, tiene un bajo consumo per cápita debido a su elevada población, de la cual un gran segmento se encuentra en las áreas rurales con bajos ingresos. (GlobalData, 2018).

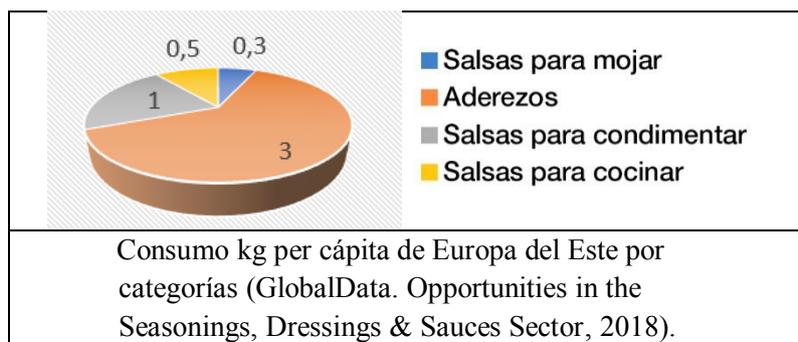


Las salsas de condimentos tuvieron el gasto per cápita más alto con 5,4 \$ en 2017. Nueva Zelanda tiene el consumo per cápita más alto en la mayoría de los mercados, debido a su baja población, mejores niveles de vida y baja disparidad en los ingresos en comparación con otros países como Corea del Sur e Indonesia. Se espera que la creciente preferencia de los consumidores por los productos de salud y bienestar, más naturales sin aditivos químicos, bajos en sal, azúcar y grasas, impulse aún más el gasto de los consumidores en productos CAS en la región.

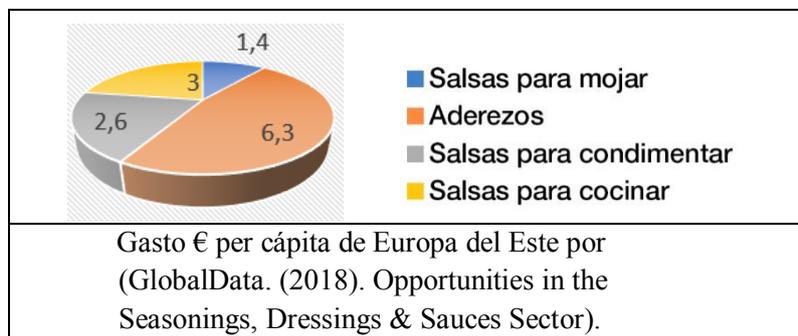


Resumen detallado del consumo y gasto per cápita por categorías: Europa del Este

En la región de Europa del Este los aderezos registraron el mayor consumo medio per cápita en 2017, en Polonia y la República Checa con 3 kg per cápita, liderando el consumo per cápita en la mayoría de las categorías. La categoría de aderezos en Polonia registró el mayor consumo per cápita, con 2,9 kg, principalmente debido al elevado consumo de mayonesa. El consumo per cápita de salsas para condimentar fue el más alto de la República Checa. (GlobalData, 2018).



Polonia, con un gasto per cápita de 40,5 dólares encabezó la región de Europa del Este en 2017. La República Checa es el segundo país más grande en términos de gasto per cápita, los checos gastaron 27,8 dólares en condimentos, aderezos y salsas en 2017. En lo que más gastaron fue en salsas para cocinar seguido de salsas para condimentar. Entre las diferentes categorías, los aderezos registraron el mayor gasto per cápita (6,3 dólares en 2017), seguidos de las salsas para cocinar, con 3 dólares per cápita (GlobalData, 2018).



Tendencias futuras del Mercado global de CAS

Se tiene previsto un aumento muy significativo de la popularidad de los productos de etiqueta limpia, sin conservantes, 100% naturales y declaraciones del tipo "sin sodio/sal añadida". Los condimentos, aderezos y salsas con etiqueta limpia ganarán popularidad en todo el mundo. Las salsas de condimentos con afirmaciones del tipo "naturales" y "libres de" ganarán protagonismo. "Sin conservantes" ganará prominencia mundial en condimentos, aderezos y salsas. Los crecientes problemas de salud impulsarán a los consumidores a buscar productos con un contenido reducido de sal.

Los consumidores se están volviendo más conscientes de la importancia de la salud y está aumentando el conocimiento sobre los ingredientes utilizados en los alimentos envasados.

P.ej. la mayoría de los productos de la categoría de condimentos (salsa de tomate, mostaza, mayonesa) y salsas, generalmente contienen una alta proporción de sal, azúcar, grasas y conservantes. Existe la percepción entre los consumidores de que estos productos no son saludables. Lo que representa un desafío para los fabricantes y como resultado, es probable que las industrias alimentarias se concentren más en usar menos o ningún conservante artificial o de síntesis química en sus productos. En general la creciente preocupación por el uso de aditivos y conservantes artificiales está aumentando la demanda de condimentos, salsas y aderezos "libres de". Por lo tanto, los fabricantes se están enfocando en ofrecer productos que satisfagan el deseo de los consumidores de ingredientes 'naturales' (GlobalData, 2018).

3. OBJETIVOS

Objetivos generales

Los objetivos generales de esta tesis doctoral son los siguientes:

A.- El estudio de la capacidad antimicrobiana de nuevos ingredientes naturales de origen vegetal, ricos en polifenoles y obtenidos sin procesos intensivos de concentración de componentes particulares, frente a levaduras alterantes y/o potencialmente patógenas en salsas y otras emulsiones alimentarias.

B.- La aplicación de una nueva tecnología de nariz electrónica (*E-Nose*) para lograr la detección temprana de levaduras alterantes y/o potencialmente patógenas en salsas. Para ello se investigará el modelado por nariz electrónica del crecimiento microbiano en diferentes emulsiones alimentarias para obtener una novedosa tecnología de determinación temprana de alteraciones microbiológicas que permita mejorar la seguridad alimentaria y también la rápida evaluación de nuevas formulaciones naturales, basadas en polifenoles vegetales, para prolongar la vida útil de las salsas y emulsiones alimentarias en general.

Objetivos específicos

A1.- Identificar los microorganismos de interés en salsas alimentarias a partir de revisiones bibliográficas y aislamiento de microflora a partir de salsas comerciales y otras emulsiones alimentarias alteradas y/o contaminadas.

A2.- Estudiar y comparar la capacidad antimicrobiana de un ingrediente o compuesto natural - *Natural Food Compound* (NFC) - basado en polifenoles de cítricos y eneldo, con los conservantes de síntesis química, sorbato de potasio y benzoato de sodio (S/B), frente a la levadura, alterante y potencialmente patógena, *C. metapsilosis* por el método de microdilución (en placas microtiter) a diferentes temperaturas y pH.

A3.- Estudiar y comparar la capacidad antimicrobiana de NFC y los conservantes artificiales S/B frente a *C. metapsilosis* en salsa ranchera.

A4.- Estudiar la vida útil de la salsa ranchera formulada con NFC y los conservantes artificiales S/B respectivamente a diferentes temperaturas y su aceptación por el consumidor en pruebas de valoración sensorial.

B1.- Detectar y cuantificar la levadura *C. metapsilosis* en salsas, mediante el método de Cromatografía de Gases-Espectroscopía de Masas (GC-MS) aplicado al Espacio de Cabeza (HS).

B2.- Utilizar todos los datos obtenidos por GC-MS (perfil m/z, área de pico del cromatograma, el perfil cromatográfico completo o cromatograma de iones totales (TIC) y combinación de valores m/z y TIC) por diferentes modelos quimiométricos para obtener el mayor porcentaje de éxito en la detección y cuantificación de levaduras en salsas.

B3.- Comparar los resultados con los modelos quimiométricos construidos utilizando otras características de las salsas contaminadas como el pH o el color para la detección y cuantificación de levaduras en salsas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *CITRUS SPP.* Y COMPONENTES *ANETHUM GRAVEOLENS* CONTRA *CANDIDA METAPSILOSIS* EN SALSA RANCHERA

4.1.1. Introducción

En los últimos años la industria alimentaria se enfrenta a un desafío fundamental para garantizar la seguridad y estabilidad de los alimentos, pero atendiendo a las demandas del consumidor de una mejor calidad sensorial, libre de conservantes químicos y con una vida útil prolongada (Brul y Coote 1999). Por tanto, la eliminación de aditivos químicos, con el fin de obtener alimentos de etiqueta limpia, aumenta el riesgo de deterioro e infecciones humanas causadas por patógenos transmitidos por alimentos (Sánchez Rubio y col. 2017).

La incidencia y prevalencia de las infecciones fúngicas invasivas ha aumentado en las últimas décadas. *Candida parapsilosis*, particularmente asociada con infecciones nosocomiales graves, se ha considerado un complejo de tres grupos genéticamente distintos, *C. parapsilosis* (I), *C. orthopsilosis* (II) y *C. metapsilosis* (III) (Silva y col. 2009). No se ha registrado hasta ahora en la bibliografía científica una relación directa entre este grupo de levaduras y brotes alimentarios de enfermedades causadas por estos microorganismos. Sin embargo, hay que destacar que especies *Candida* de los grupos citados pueden colonizar y causar enfermedades en varios sitios anatómicamente distintos, como piel, cavidad oral, vagina, sistema vascular, hígado, bazo, corazón, especialmente válvulas cardíacas y ojos

(Silva y col. 2009; Strollo y col. 2017). *Candida spp.* representa la flora microbiana normal del tracto gastrointestinal humano y podría implementarse en el sistema digestivo por vía oral con los alimentos. Sin embargo, estos patógenos oportunistas se consideran un posible reservorio de candidiasis diseminada, especialmente en pacientes delicados o con sistema inmunitario deprimido (Strollo y col.2017).

En este sentido las salsas presentan un riesgo para el consumidor que puede ser grave en ciertos sectores de la población de consumidores, ya que no están sujetas a pasteurización y pueden almacenarse a temperatura ambiente y en refrigeración según el tipo de salsa. Por eso, el uso de conservantes químicos (benzoato de sodio y sorbato de potasio) es el método tradicional de control microbiano en este tipo de alimentos (Restaino y col., 1982, Wind y Restaino 1995). El rango de pH para la actividad antimicrobiana útil de estos conservantes es de 2,5 a 4,0 para el benzoato de sodio (pKa 4,76) y menor a 6,5 para el ácido sórbico (pKa 4,2) (Wind y Restaino 1995).

Sin embargo, algunas levaduras poseen mecanismos de resistencia genética o adquirida a los ácidos orgánicos débiles, incluida la capacidad de degradarlos o bombear aniones disociados fuera de la célula (Piper y col. 2001). Por otro lado, está aumentando el interés por los compuestos alimenticios naturales para evitar el deterioro o alteración de los alimentos. Se fomenta el consumo y uso de alimentos vegetales, en particular frutas, verduras y especias, ya que tienen efectos beneficiosos para la salud. Por otra parte, algunos componentes vegetales se pueden utilizar como ingredientes naturales en la conservación de alimentos. Entre los ingredientes naturales más deseables se encuentran los compuestos fenólicos debido a su actividad antioxidante. En los frutos cítricos, los derivados del ácido cinámico, las cumarinas y los flavonoides (flavononas, flavonas y flavonoles) son los principales

grupos de compuestos bioactivos fenólicos (Singh y col. 2016). Además, se han registrado compuestos antimicrobianos de especies de *cítricos* (Li y col. 2018) y eneldo (Altameme y col. 2017; Chen y col. 2013). Así, el compuesto alimenticio natural (NFC), utilizado en este estudio, basa su composición en extractos vegetales tanto de cítricos como de eneldo.

El objetivo del actual capítulo de esta tesis doctoral fue estudiar la capacidad antimicrobiana de NFC contra la levadura patógena *C. metapsilosis* en salsa ranchera y compararla con la capacidad antimicrobiana del sorbato de potasio y benzoato de sodio (S/B) comúnmente utilizados en este tipo de salsas.

4.1.2. Materiales y métodos

Preparación de salsa ranchera

La formulación de salsa ranchera (g/kg) consistió en 550.5 de aceite de soja, 290,0 de agua, 80.0 de yogur deshidratado, 30,0 de vinagre (6% de ácido acético, AA), 18,0 de sal, 17,0 de azúcar, 5,0 de caseinato, 8,0 de goma xantana y 1,5 de goma guar. Todos los ingredientes se mezclaron a temperatura ambiente utilizando un procesador de alimentos (Mycook, Taurus, Lérida, España), y luego se distribuyó la salsa ranchera en tres lotes. La mezcla de conservantes químicos, 1 g/kg de sorbato y 1 g/kg de benzoato (S/B), se añadió a uno de los lotes teniendo en cuenta la lista positiva de aditivos en la EU en sus dosis máxima.. Se añadió NFC, a la concentración más alta aceptada en el análisis sensorial, al otro lote. Las muestras de salsa ranchera (50 g) se envasaron asépticamente en recipientes de polipropileno y se

refrigeraron hasta su uso. Además, se prepararon muestras de control para estudiar la evolución microbiana en salsa ranchera sin conservantes. A lo largo del experimento, se midieron pH, actividad del agua, color, Brix y viscosidad para comprobar la evolución de estos parámetros.

Conservantes

La composición de NFC se basa en extracto de *Citrus spp.* (cítricos) y *Anethum graveolens* (eneldo) rica en flavonoides con la que se busca obtener propiedades antimicrobianas. La extracción se realizó en condiciones suaves mediante una mezcla de 80% de agua / 20% de etanol y este extracto se secó mediante atomización. Los principales compuestos del polvo seco obtenido (NFC) fueron naringenina (2,7%), hesperetina (1,1%) y tangeritina (0,7%) en el extracto de cítricos y luteolina (3,2%), apigenina (1,7%) y kaempferol (1,1%) en el extracto de eneldo.

Se compararon los efectos antimicrobianos de NFC y la mezcla de S/B (1 g/kg de sorbato potásico – 1 g/kg de benzoato sódico). Se adquirió el sorbato de potasio y benzoato de sodio a Sigma Aldrich (Madrid, España).

Cepa microbiana y preparación de inóculos

La cepa *C. metapsilosis* se aisló de una muestra comercial alterada de salsa ranchera y fue

identificada por la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, España). Los cultivos frescos de *C. metapsilosis* se prepararon incubando una asada (*loopful*) de cultivo puro en TSB (caldo de triptona de soja, Pronadisa, Madrid, España) durante 24 h a 25 °C. El inóculo se estandarizó por dilución en TSB (pH de 3,8, 4,4 y 7) para alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.5 a 600 nm (Espectrofotómetro Visible UV Varian Cary 50 Scan), que correspondió a una concentración de levadura de 10⁶ UFC/ml aproximadamente. La población viable del inóculo se confirmó mediante diluciones decimales y método de siembra superficial en placas Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y SDA con cloranfenicol (0,1 g/L) (SDA + Ch), que se incubaron a 25 °C durante 48 h.

Efecto del ácido acético (AA), el pH y la temperatura sobre el crecimiento de *C. metapsilosis* mediante el ensayo de placa de microtitulación o microtiter (MPA) basado en absorbancia en medio de cultivo TSB

El MPA se llevó a cabo en TSB para probar la influencia del pH, la temperatura y el AA en el crecimiento de *C. metapsilosis*. Se prepararon tres soluciones de TSB a pH 3,8, 4,4 y 7 sin AA (AA -) y otras 3 soluciones de TSB a los mismos pH con AA (AA+). El último caso, antes de ajustar el pH (3,8, 4,4 y 7) con HCl al 10%, se agregó a TSB la cantidad de AA correspondiente al vinagre que contenía la salsa ranchera (1.8 g/kg) para observar su efecto en el crecimiento del microorganismo.

Se ha observado que la adición de S/B aumenta el pH de la salsa ranchera y la adición de NFC no modifica significativamente este parámetro. Cuando se aplica NFC, el pH final de la salsa ranchera es 3.8 y cuando se usa S/B, el pH final de la salsa ranchera es 4.4. También

se estudió el crecimiento a pH 7 para conocer el efecto fungicida a pH neutro.

Se utilizó una placa de microtiter de noventa y seis pocillos para realizar el MPA. Se añadieron a los pocillos correspondientes partes alícuotas de 150 µl de TSB ajustadas a pH 3,8, 4,4 y 7 con y sin AA. Luego se agregaron 150 µl de inóculo en los pocillos para obtener aproximadamente 10^5 UFC / ml de *C. metapsilosis* en el tiempo 0. Las placas de microtiter se colocaron en un espectrofotómetro de placas microtiter (Espectrofotómetro Visible UV Varian Cary 50 Scan) ajustado a 10, 25 y 37 °C. La absorbancia se registró a 600 nm cada 60 min durante un período de incubación de 24 h para cada temperatura. Para estudiar el efecto de AA, pH y temperatura sobre el crecimiento de *C. metapsilosis*, se determinó el área bajo la curva de crecimiento (AUC) para cada condición experimental durante 24 h de incubación (Cava y col. 2007).

Efecto antimicrobiano de AA, NFC y S/B sobre el crecimiento de *C. metapsilosis* por MPA

Se ensayó otra placa microtiter en el espectrofotómetro para estudiar el efecto antimicrobiano de S/B y NFC sobre el crecimiento de *C. metapsilosis* en TSB, respectivamente.

El control positivo, las soluciones madre de NFC a 16 g/kg y la solución madre de S/B a 4 g/kg de S y 4 g/kg de B (todos ellos AA - y AA +) se prepararon en TSB. A continuación el pH se ajustó a 3,8, 4,4 y 7, respectivamente.

Se añadieron volúmenes de 150 µl de TSB, ajustados a pH 3,8, 4,4 y 7, a todos los pocillos de la placa de microtiter. Posteriormente se agregaron volúmenes de 150 µl de cada solución

madre, al mismo pH, al primer pocillo de la fila de la placa de microtiter y luego los pocillos NFC se diluyeron dos veces a lo largo de la fila. Finalmente, se agregaron 150 µl de inóculo a los pocillos para obtener un volumen final en los pocillos de 300 µl con aproximadamente 10^5 UFC / ml de *C. metapsilosis* en el tiempo 0. Luego, las placas se colocaron en un espectrofotómetro de placas de microtiter a 10, 25 y 37 °C, y los experimentos se repitieron tres veces. La absorbancia se registró a 600 nm cada 60 min durante un período de incubación de 24 h. Al final de los experimentos de MPA (24 h), se sembraron 100 µl del contenido de los pocillos mediante el método de superficie sobre SDA y SDA + Ch, que se incubaron a 25 °C durante 48 h. Después de la incubación, se estudiaron morfológicamente las colonias aleatorias de las placas y se observaron las células de la colonia en el microscopio óptico para confirmar que las colonias pertenecen al microorganismo objetivo utilizado.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se consideró como la concentración más baja de antimicrobiano que causó el 100% de inhibición del crecimiento (Cava y col. 2007). La concentración inhibidora parcial (PIC) fue cualquier concentración de antimicrobiano inferior a la CMI que produjera una inhibición del crecimiento entre 0 y 100%.

El área bajo la curva de OD /tiempo de las muestras de control se comparó con las áreas de las condiciones experimentales ensayadas y se expresó como porcentaje de crecimiento (%G) para determinar la actividad antimicrobiana de cada concentración y antimicrobiano estudiado (Cava y col. 2007). Se utilizó la siguiente ecuación para determinar el %G:

$$\% G = AUC * 100 / AUCC$$

donde AUC es el área bajo la curva de crecimiento para cada condición experimental de antimicrobiano y concentración utilizada. AUCC es el área bajo la curva de crecimiento para el control positivo y para cada condición (pH y temperatura).

Análisis sensorial

El efecto de la concentración de NFC se analizó en la evaluación sensorial. Basada en estos resultados, se realizó un *Challenge Test* o Prueba de Reto en salsa ranchera utilizando la concentración máxima de NFC admitida sensorialmente.

Para los análisis sensoriales se conformó un panel de nueve personas (ISO 2017) y se realizaron mediante una prueba hedónica descriptiva. Se entregaron las fichas de cata a los panelistas y se explicó la forma de puntuar los atributos sensoriales (sabor, color, apariencia, olor y textura). Los análisis sensoriales se realizaron dos veces durante el experimento, el primero directamente después de la preparación de la salsa (día 0) y el segundo, después de 1 mes de almacenamiento.

Comparación del efecto antimicrobiano de NFC y S / B en salsa ranchera (*Challenge Test* o Prueba de Reto)

Las muestras de salsa ranchera, de 50 gramos, se inocularon con 10^3 UFC / g de *C. metapsilosis* a fin de reflejar las condiciones previsibles que podrían esperarse durante el almacenamiento entre la producción y el consumo de la salsa ranchera. Las muestras de

control positivo y negativo y las muestras inoculadas con el antimicrobiano correspondiente (NFC o S/B) se envasaron en bolsas asépticas y se almacenaron a 5, 25 y 37 °C (Tabla 2).

	<i>C.metapsilosis</i>	NFC	S/B
Control (-)	-	-	-
Control (+)	+	-	-
NFC	+	+	-
S/B	+	-	+

Tabla 2. Diseño experimental en salsa ranchera (*Challenge test*, en salsa ranchera almacenada a 5, 25 y 37 °C).

Las concentraciones de antimicrobianos fueron, para la mezcla de S/B, 1 g/kg de S y 1 g/kg de B. Para el NFC se seleccionó la concentración a aplicar en salsa ranchera teniendo en cuenta los datos de efecto antimicrobiano y el umbral de aceptación sensorial determinado en salsa ranchera (1 g/kg). Los recuentos de células viables de levadura y moho se determinaron cada 7 días durante las primeras siete semanas de estudio y a los 70 días. Las placas Petri se incubaron a 25 °C durante 48 h, se observó la morfología colonial de un número significativo de colonias seleccionadas de forma aleatoria y se observó también la morfología celular de dichas colonias en un microscopio óptico para confirmar que las colonias pertenecían a *C. metapsilosis*.

Análisis estadístico

Se compararon los efectos principales de AA y la concentración de NFC, así como el efecto de interacción entre NFC y AA sobre el % G de *C. metapsilosis* mediante ANOVA factorial (con significación establecida en $p < 0,05$), seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey para confirmar las diferencias en resultados significativos. El análisis fue realizado por R versión 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

4.1.3. Resultados y discusión

Efecto de AA, pH y temperatura sobre el crecimiento de *C. metapsilosis* por MPA

Los resultados del efecto de AA, pH y temperatura sobre el crecimiento (AUC) de *C. metapsilosis* obtenido en el MPA se muestran en la Figura 1.

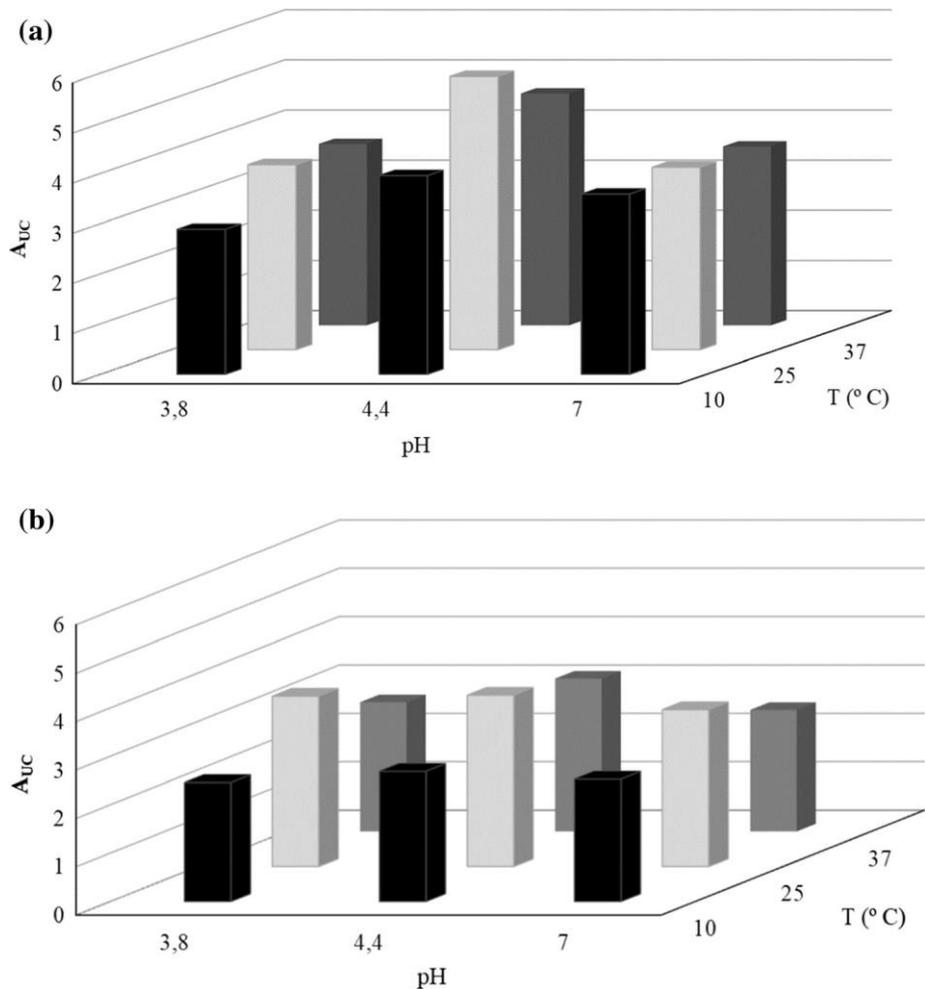


Figura 1. Efecto del pH, la temperatura y el uso de AA sobre el crecimiento (AUC) de *C. metapsilosis* en TSB durante 24 h en MPA. a AA -, b AA +

Cuando no se utilizó AA, *C. metapsilosis* mostró un crecimiento óptimo en TSB en condiciones ácidas y neutras a 25 °C, aunque a pH 7 no se observaron diferencias significativas a las diferentes temperaturas ensayadas. Se ha detectado que el crecimiento en TSB de *C. metapsilosis* se ve afectado significativamente por la presencia de AA, principalmente a 25 y 37 °C. La concentración de AA en este experimento fue la misma que se usa en la composición de la salsa ranchera. Se ha observado un efecto inhibitorio parcial

de AA basado en el valor AUC para cada condición. Según los resultados mostrados en la Figura 1 las mejores condiciones de crecimiento para *C. metapsilosis* en TSB fueron a 25 °C, a pH 4,4 y sin AA.

No se encontraron datos en la literatura científica para *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* y condiciones óptimas de crecimiento para estas especies en productos alimenticios. De acuerdo con nuestros hallazgos, el mejor crecimiento de *C. metapsilosis* en salsa ranchera podría estar cerca de los 25 °C.

De acuerdo con nuestras observaciones, otros autores han informado que el AA inhibe la desasimilación de azúcares por las levaduras, probablemente al inhibir las enzimas glucolíticas, de las cuales se ha informado que la enolasa es la más sensible (Pampulha y Loureiro-Dias 1990; Zhao y col. 2005).

No hemos encontrado en la literatura científica referencias al efecto de AA sobre la inhibición del crecimiento de *C. metapsilosis*. Sin embargo, se ha descrito una inhibición de aproximadamente un 25% del crecimiento de *C. albicans* con 25 ppm de AA en medio TSB enriquecido con extracto de levadura (Huang y col. 2011). Otros autores han informado de CMI del AA de 100 ppm en Sabourand Dextrose Broth para varias cepas de *C. albicans* (Dias de Castro y col. 2015). AA fue el agente más eficaz contra biopelículas de *Candida spp.*: 20 ppm fueron suficientes para inhibir la formación de biopelículas de *C. albicans*, pero para *C. orthopsilosis* y *C. parapsilosis* fueron necesarias 40 ppm de AA (Pires y col. 2013). En nuestro estudio hemos encontrado que la cepa de *C. metapsilosis* es mucho más resistente a AA que las otras especies patógenas de *Candida* citadas ya que con la

concentración de 1800 ppm de AA solo se logró una inhibición parcial de *C. metapsilosis* (Figura 1).

Efecto antimicrobiano de NFC y S/B sobre el crecimiento de *C. metapsilosis* por MPA

El crecimiento de *C. metapsilosis* en TSB con NFC y con S/B, a diferentes temperaturas (10, 25 y 37 °C), a diferentes pH (3.8 y 4.4) y agregando o no AA se muestran en la Tabla 3.

Antimicrobianos ^a	g/kg	10 °C		25 °C		37 °C	
		pH 3.8	pH 4.4	pH 3.8	pH 4.4	pH 3.8	pH 4.4
AA –							
Control	0.00	100	100	100	100	100	100
	1.00	86.13	88.95	92.63	93.9	88.92	91.02
NFC	2.00	74.42	77.07	85.87	88.47	82.9	84.92
	4.00	34.12	39.87	64.16	69.65	28.12	38.88
AA +							
Control+ AA	0.00	73.26	77.02	81.32	83.7	75.22	79.31
	1.00	58.36	60.87	74.11	76.97	62.54	73.3
NFC	2.00	38.94	42.46	61.75	64.84	49.18	58.01
	4.00	9.2	11.39	48.58	51.12	19.94	29.84

^aS/B en condiciones ácidas (pH 3.8 y 4.4) alcanzó la inhibición total del crecimiento de *C. metapsilosis* a 10, 25 y 37 °C.

Tabla 3. El crecimiento de *C. metapsilosis* (% G) calculado para cada temperatura y pH, en TSB utilizando NFC en diferentes condiciones de pH y temperaturas de incubación en condiciones ácidas (pH 3.8 y 4.4) alcanzó la inhibición total del crecimiento de *C. metapsilosis* a los 10, 25 y 37 °C.

Los resultados para pH neutro (7) no se muestran porque NFC y S/B no fueron efectivos a pH 7, por lo que no se produjo la inhibición del crecimiento. Por otro lado, S/B en

condiciones ácidas (pH 3,8 y 4,4) alcanzó la inhibición total del crecimiento de *C. metapsilosis* a 10, 25 y 37 °C.

Los principales efectos encontrados estadísticamente significativos ($p < 0.05$) fueron los relacionados con AA y concentración de NFC, siendo el efecto de NFC el más significativo, mientras que el efecto de interacción probado entre factores experimentales fue no significativo ($p > 0.05$). En general, el efecto de la concentración de NFC fue significativo y el efecto de AA mostró una interacción aditiva a 10, 25 y 37 °C. Además, se observó una tendencia a un mayor efecto antimicrobiano a pH 3,8. En la Tabla 2, los resultados de %G mostraron que el rango de NFC probado (1.0–4.0 g/kg) son concentraciones inhibitorias parciales donde el %G más bajo estaba cerca del 10%. Cabe señalar que la presencia de AA mostró una disminución significativa del %G mediante el uso de NFC a diferentes concentraciones.

De acuerdo con nuestras observaciones, el efecto antimicrobiano sinérgico de AA con antimicrobianos naturales ya se ha probado contra la *Staphylococcus aureus*, donde se combinaron el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y AA en concentraciones subinhibidoras. Estos resultados se aplicaron para extender la vida útil de productos cárnicos (de Souza y col. 2009). Rhee y col. (2003) investigaron los efectos combinados de la harina de mostaza y AA contra la *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* y encontraron que el 0,5% de AA combinado con mostaza puede retardar la reducción de *E. coli* y *L. monocytogenes*. Estos efectos antagonistas pueden cambiar si se usa mostaza sola o en combinación con concentraciones superiores al 1% de AA. Sin embargo, otra investigación encontró un efecto antimicrobiano sinérgico del etanol, cloruro

de sodio, componentes AA y aceite esencial de orégano contra varios mohos transportados por el aire en agar glucosa Sabouraud. La combinación de etanol al 0,5%, NaCl al 2%, AA al 0,05% y perilaldehído 0,5 mM fue suficiente para suprimir por completo el crecimiento de todos los mohos contaminantes durante más de 20 días y tiene un gran potencial para la conservación de alimentos sin la aplicación de conservantes sintéticos (Kurita y Koike 1983).

Según nuestros resultados, la combinación de AA y polifenoles de cítricos y eneldo podría ser un buen candidato para controlar el crecimiento de *C. metapsilosis* en alimentos en condiciones ácidas.

Análisis sensorial

Los resultados de la prueba hedónica en el momento 0 mostraron que no había diferencias significativas entre los atributos de las muestras Control, NFC 1 g/kg y S/B pero sí entre las anteriores y el NFC a 4 g/kg (Tabla 3). Los resultados después de 31 días de almacenamiento a 25 °C fueron similares a los obtenidos en el tiempo 0, siendo el NFC a 4 g/kg la única muestra con diferencias significativas. En general, todos los atributos de las muestras obtuvieron una puntuación más baja después de 31 días de almacenamiento.

El NFC a 4 g/kg puede modificar el color y el sabor de la salsa ranchera como podemos ver en los resultados de la prueba hedónica. Por eso la concentración máxima utilizada en la prueba de reto por debajo del umbral de percepción organoléptica, fue de 1 g/kg de NFC.

Comparación del efecto antimicrobiano de NFC y S/B en la salsa ranchera (*Challenge Test*)

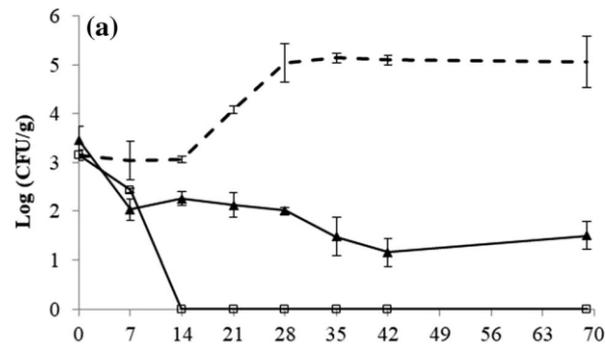
Durante el *Challenge Test* los parámetros fisicoquímicos de pH, actividad del agua (a_w 0,94), Brix, color y viscosidad no mostraron diferencias significativas durante el experimento. Se ha realizado un *Challenge Test* utilizando *C. metapsilosis* como microorganismo diana en salsa ranchera y en condiciones experimentales que simulan el almacenamiento del producto antes (25 y 37 °C) y después de su apertura (5 °C).

Las muestras de control negativo mostraron recuentos microbianos inferiores a 2 log UFC/g durante el tiempo del experimento.

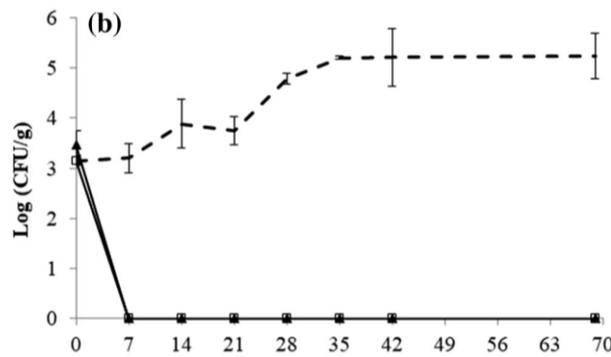
Los recuentos microbianos obtenidos durante el estudio se muestran en la Figura 2a - c. En los diferentes tratamientos estudiados, las temperaturas tuvieron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre el crecimiento de *C. metapsilosis* en salsa ranchera. A 25 °C, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los controles positivos y los tratamientos donde se agregaron S / B y NFC a la salsa ranchera. Mientras que a 5 °C se observó el efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre NFC, el control positivo y la S/B. *C. metapsilosis* fue capaz de crecer en ausencia de conservantes a 5 °C (control positivo), alcanzando una concentración de células viables cercana a 5 log UFC/g, lo que puede representar un riesgo para la salud de los consumidores de salsa ranchera (ver Figura 2a). En estas condiciones, NFC mostró un efecto fungicida parcial, provocando una disminución del recuento microbiano de alrededor de 1,5 log UFC/g a los 7 días y posteriormente mostró un efecto fungostático durante el resto del período estudiado de 70 días, donde los recuentos de *C. metapsilosis* permanecieron estables durante el

almacenamiento en refrigeración y no se detectó crecimiento. La mezcla de conservantes químicos S/B mostró efecto fungicida después de 14 días de almacenamiento a 5 °C. Durante el resto del experimento se detectaron células no viables para esta mezcla de conservantes. Cabe destacar que los recuentos en las muestras de salsa ranchera con NFC, almacenadas a 5 °C y entre 42 y 70 días estuvieron muy cerca del límite de detección del método de recuento en placa Petri utilizado (10 UFC/g).

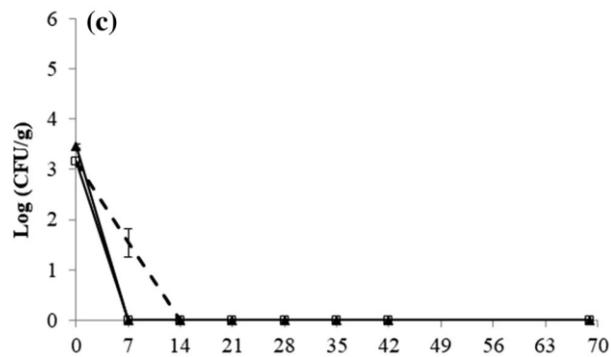
Sin embargo, a temperaturas más altas (25 y 37 °C) no se obtuvieron recuentos durante el experimento para muestras de NFC y S/B (ver Figura 2b, c). Los controles positivos mostraron la capacidad de *C. metapsilosis* para crecer a 5 y 25 °C, pero no se detectaron recuentos a 37 °C después de 14 días. A 25 °C, el control creció hasta 5 log UFC/g, mientras que a 37 °C la población de *C. metapsilosis* decayó incluso en el control positivo.



Tiempo (días)



Tiempo (días)



Tiempo (días)

Figura 2. Recuento microbiano de *C. metapsilosis* en salsa ranchera durante 70 días de almacenamiento a diferentes temperaturas. a 5 °C, b 25 °C, c 37 °C (línea discontinua Control Positivo; cuadrado abierto S/B; triángulo relleno NFC).

Los principales componentes presentes en el NFC fueron diferentes flavonoides, como naringenina (2,7%), hesperetina (1,1%) y mandaritina (0,7%) obtenidos a partir de extracto de piel de naranja y pomelo, y luteolina (3,2%), apigenina (1,7%) y kaempferol (1,1%) obtenidos a partir de extracto de eneldo. Se han reportado muchas propiedades biológicas de los flavonoides en diferentes estudios, entre ellos la más importante es la actividad antimicrobiana (Mandalari y col. 2007). En este sentido, los mecanismos antimicrobianos se han atribuido a la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos en bacterias (Wu y col.2013), y/o al daño de la membrana celular (Tsuchiya e Iinuma 2000) y/o la inhibición de las bombas de detoxificación (*efflux pumps*), y la consecuente muerte celular (Serpa y col. 2012) en función de los flavonoides presentes.

Algunos autores han informado que la naringenina y la apigenina tienen un efecto sinérgico para revertir la resistencia bacteriana a los antibióticos (Eumkeb y Chukrathok 2013). Además, naringenina y hesperetina mostraron interacciones sinérgicas diferentes que dependían del microorganismo diana ensayado (Mandalari y col. 2007). Se han descrito las mismas observaciones para la hesperetina junto con algunos flavonoides extraídos de las raíces de *Vepris glomerata*. En este caso se detectaron propiedades antimicrobianas incluso en concentraciones más bajas que las dosis de hesperetina utilizadas en la salsa ranchera en este trabajo. La determinación de la CMI mostró que la hesperetina inhibió completamente el crecimiento de *S. aureus* (ATCC 29213 y ATCC 25923) y *Shigella dysenteriae*, a 0.2 µg/ml y 4.0 µg/ml respectivamente (Kiplimo y Koorbanally, 2012) y la concentración de hesperetina en la salsa ranchera estudiada en el *Challenge Test* fue de 11 µg/g.

Los flavonoides luteolina, apigenina y kaempferol obtenidos del eneldo también se han

estudiado debido a las propiedades antimicrobianas de estos compuestos (Fialova y col. 2015; Mhalla y col. 2017). La actividad antimicrobiana de la luteolina puede operar a través de diferentes mecanismos aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática, inhibiendo el enzima ATPasa y la síntesis de proteínas y de peptidoglicano (Eumkeb y col. 2012). Otros estudios han informado del efecto de la apigenina a valores de CMI en *C. albicans*. Estas observaciones concluyen que, a esta concentración, la apigenina induce perturbaciones de la membrana celular, lo que contribuyó a la fuga de potasio, calcio y azúcares intracelulares, así como a la interrupción del equilibrio osmótico, lo que eventualmente conduce a la muerte celular (Lee y col. 2018). Otra investigación informó el efecto antifúngico de la apigenina de los extractos de *Aster yomena* sobre *C. albicans* a concentraciones sub-CMI. Los investigadores demostraron que la apigenina desencadenaba una absorción de calcio mitocondrial dependiente de la dosis, seguida de disfunción mitocondrial, pérdida del potencial de membrana y aumento de la masa mitocondrial y de las especies reactivas de oxígeno. La apigenina también indujo un desequilibrio redox intracelular, como lo indica la acumulación de especies reactivas de oxígeno, la oxidación del glutatión y la peroxidación de lípidos (Lee y col. 2019). También se ha estudiado el kaempferol, y este flavonoide mejora la inhibición del crecimiento de otros antimicrobianos (del Valle y col. 2016). Este compuesto también ha demostrado una buena actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (Quarenghi y col. 2000). Algunos autores han informado que la actividad antimicrobiana del kaempferol depende de las etapas de maduración de la planta y el método de extracción utilizado (Deng y col. 2014). Chen y col. (2013) mostraron que el aceite de eneldo provocó cambios morfológicos en las células de *Aspergillus flavus* y *C. albicans* y una reducción en la cantidad de

ergosterol. La exposición al aceite de eneldo resultó en una elevación del potencial de la membrana mitocondrial y la supresión de las actividades de ATPasa y deshidrogenasa inducidas por glucosa. Esto provocó la acumulación de especies reactivas de oxígeno que fue un mediador importante de la acción antifúngica del aceite de eneldo.

Proteggente y col. (2002) informaron que la fluidez de la membrana disminuye con una reducción de la temperatura. De acuerdo con nuestros resultados, la actividad antifúngica de NFC fue menor en el crecimiento de *C. metapsilosis* a 5 °C en salsa ranchera. Podría deberse a la mayor rigidez de la membrana, que se produce a bajas temperaturas y que limitaría la introducción de las moléculas antifúngicas de NFC en las células. Los y Murata (2004) observaron que las altas temperaturas provocan la fluidización de las membranas, lo que puede favorecer la desintegración de la bicapa lipídica. En nuestro estudio a 25 °C, NFC pudo atravesar la membrana lipídica de *C. metapsilosis* y actuar como bactericida desde las primeras semanas del estudio. En el caso de 37 °C, además de la posible acción de S/B y NFC, se pudo producir la desintegración de la bicapa lipídica (las muestras de control positivo también decayeron a los 7 días de estudio) debido al estrés sufrido por la alta temperatura. Nuestras observaciones corroboran que las fluctuaciones de temperatura (en el rango estudiado) modulan significativamente la fluidez de la membrana en los microorganismos objeto de este estudio.

Se ha descrito el efecto antifúngico contra la levadura patógena *C. albicans* de un componente alimenticio rico en polifenoles, como el NFC, elaborado a partir de Jambolan (*Syzygium cumini*), que también tiene propiedades antioxidantes (Singh y col. 2016).

Nuestros resultados han demostrado que los efectos in vitro y, en los alimentos, (salsa ranchera) son muy similares en cuanto a la concentración necesaria de NFC para alcanzar el efecto inhibitorio efectivo sobre *C. metapsilosis*.

4.2. CROMATOGRAFÍA DE GAS *HEAD-SPACE* ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE MAYONESA POR LEVADURAS.

4.2.1. Introducción

La alteración y contaminación microbianas, un problema importante en la industria alimentaria debido a las pérdidas económicas asociadas, puede ocurrir debido a la presencia y/o crecimiento de bacterias, hongos filamentosos o levaduras en los alimentos. Sin embargo, debido al gran daño que originan, la mayoría de los estudios se han concentrado en bacterias u hongos filamentosos. Si bien la levadura juega un papel secundario en la contaminación de los alimentos, las condiciones ambientales de conservación de los alimentos, que tienden a inhibir el crecimiento de bacterias, han favorecido la aparición de levaduras contaminantes, responsables de alteraciones en las propiedades organolépticas de los alimentos y en consecuencia disminuyen la calidad de los mismos.

Entre las levaduras, el género *Zygosaccharomyces* es de gran importancia en el deterioro de los alimentos. Sus características bioquímicas le permiten tolerar altas concentraciones de azúcar, etanol o ácido acético, y es resistente a los conservantes más habituales utilizados en los alimentos, como el ácido sórbico, el ácido benzoico o el SO₂ (Kurtzman y col. 1971). Además, es extremadamente osmotolerante y es capaz de fermentar enérgicamente azúcares de molécula hexagonal (piranosica), con capacidad para crecer en medios con un pH de alrededor de 2,2. *Z. bailii* es una de las especies más problemáticas debido a su excepcional tolerancia a condiciones estresantes de a_w y pH en medios con alto contenido de glucosa. Por tanto, *Z. bailii*

puede contaminar una amplia variedad de alimentos ácidos o con alto contenido de azúcar, que normalmente se considerarían estables durante el almacenamiento, como la mayonesa. Además de su efecto sobre la calidad del producto, las alteraciones de las propiedades organolépticas de los alimentos provocadas por esta levadura, los hacen más susceptibles a la colonización por otros microorganismos (Vermeulen, 2008).

Por su parte, *Candida parapsilosis* es una levadura patógena que se ha clasificado taxonómicamente en 3 grupos: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* (Lo y col. 2017). Esta levadura forma parte de la flora normal de la piel, manos y mucosas y puede contaminar los alimentos en situaciones deficientes de higiene o malas prácticas de fabricación. *C. parapsilosis* se ha detectado y aislado en frutas (Lo y col., 2017), yogur en concentraciones entre 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/g y 10^6 UFC/g (Rohm y col. 1990) y salsas (Robl y col. 2014), siendo también muy resistente a los tratamientos de conservación de alimentos. La determinación de *Z. bailii* y *C. parapsilosis* es, por tanto, un factor de gran importancia en la vida útil de determinados alimentos como las salsas.

La técnica más utilizada para detectar la presencia de levaduras es el recuento en placa de Petri. Sin embargo, esta metodología requiere largos periodos de tiempo en comparación con otras técnicas analíticas, por lo que su aplicación rutinaria no es práctica, lo cual es una de las razones por las que, en los últimos años, se ha observado un creciente interés en el desarrollo y aplicación de métodos analíticos alternativos para resolver este problema agroalimentario.

Hasta la fecha, se han propuesto varias alternativas, como métodos basados en la

amplificación directa del ADN de levadura de una muestra mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (White y col. 1990; Andorrà y col. 2012), o métodos moleculares basados en el análisis de genes que codifican ARN ribosómico (Garner y col. 2010). Sin embargo, estos métodos son tediosos, lentos o costosos, y no distinguen entre células viables y no viables o muertas (Elizaquível y col. 2013), lo que complica su implementación en la industria alimentaria. También se han propuesto inmunoensayos enzimáticos (ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), aunque estas pruebas carecen de sensibilidad cuando las matrices son complejas, existen reacciones cruzadas entre antígenos relacionados y su automatización también implicaría un alto costo (García y col. 2004). Estudios más recientes describen el uso de espectrometría de masas (MS) para detectar e identificar levaduras. Más específicamente, el uso de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Bizzini y Greub, 2010; Quiles-Melero y col. 2011; Taverna y col. 2019). Esta técnica permite la identificación de microorganismos mediante un análisis de proteínas, asociando un espectro de masas específico a una especie determinada. Sin embargo, presenta inconvenientes cuando se utiliza en muestras directas debido a su baja sensibilidad y la necesidad de una cantidad considerable de proteína para obtener perfiles fiables. Wang y col. (2015) también propusieron un sensor de óxido metálico para detectar dos levaduras osmotolerantes, *Z. rouxii* y *C. tropicalis*, en un medio con alto contenido de azúcar. Esta matriz de sensores comprende 10 semiconductores de óxido metálico que permiten detectar principalmente compuestos aromáticos, óxido de nitrógeno, amoníaco, hidrógeno, alcanos, compuestos de azufre, muchos terpenos, y alcoholes. Demostraron que los sensores sensibles al metano, alcohol y compuestos

aromáticos podrían ser los más importantes para la detección del deterioro causado por *Z. rouxii* y *C. tropicalis*. Además, los autores estudiaron la evolución de la huella dactilar de compuestos orgánicos volátiles (COVs) durante el crecimiento de estas dos levaduras utilizando microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases (GC) acoplada a MS. Los COVs producidos estaban compuestos principalmente por alcoholes, cetonas, aldehídos, ácidos y ésteres. Si bien no se propuso el método SPME-GC-MS para clasificar muestras reales de alimentos contaminados, ya que los experimentos anteriores solo se realizaron en medios de cultivo, parece que estudiar la evolución de los COVs mediante GC-MS podría ser una buena alternativa para la detección y cuantificación de levaduras en los alimentos. De hecho, también se ha demostrado que diferentes cepas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* y *Lachancea thermotolerans*), utilizadas durante la fermentación del mosto deshidratado al sol, ejercen una gran influencia en el perfil volátil del vino (Morales y col. 2019). En este caso, la composición volátil se determinó mediante extracción de sorción con barra de agitación secuencial dual, seguida de análisis por GC-MS.

El cromatograma obtenido del análisis de compuestos volátiles microbianos puede proporcionar información sobre la actividad microbiana, abundancia, estructura de la comunidad, tipo de comunidad y actividad fisiológica (Araki y col. 2012). Sin embargo, la dificultad de estos experimentos radica en la gran cantidad de metabolitos producidos y la diversa naturaleza de sus propiedades químicas y físicas, lo que hace que la cuantificación simultánea de todos los metabolitos sea inalcanzable

con las capacidades instrumentales actuales (García y col. 2004). Por otro lado, la distribución limitada del peso molecular no permite un análisis completo y detallado utilizando solo MS, por lo que generalmente necesita acoplarse a una técnica de separación como GC (Viswanadhan y col. 2011). Este acoplamiento genera un gran volumen de datos, lo que complica su procesamiento.

En este trabajo, la GC-MS de *head-space* (HS) se presenta como un método alternativo para la detección y cuantificación de dos levaduras alterantes y potencialmente patógenas (*Z. bailii* y *C. parapsilosis*) en salsas, evitando los tiempos y costos prolongados en la elaboración de salsas que tiene la técnica tradicional de recuento en placa de Petri. Los diferentes modelos quimiométricos se investigaron utilizando todos los datos obtenidos por GC-MS (perfil m/z, área de pico del cromatograma, el perfil cromatográfico completo o cromatograma de iones totales (TIC) y combinación de valores de m/z y TIC, con el fin de obtener el mayor éxito de clasificación. Los resultados se compararon con los modelos quimiométricos construidos utilizando otras características de la salsa contaminada como el pH o el color.

4.2.2. Materiales y métodos

Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y los solventes fueron de grado HPLC. El hexanal, acetaldehído, acetona, dimetilsulfuro, 2,3-butanodiona, acetato de etilo, pentanal, clorobenceno y metanol (MeOH) fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) y dimetilsulfóxido por ApplicChem GmbH (Darmstadt, Alemania). Para la preparación de los medios de cultivo se utilizó caldo de triptona de soja (TSB), agar sabouraud dextrosa con cloranfenicol y agua de peptona, todos de Pronadisa Conda (Madrid, España). Además, se utilizó clorobenceno como estándar interno (IS) en los análisis de GC-MS. Este se preparó diluyendo 2 ml de clorobenceno en 25 ml de dimetilsulfóxido para obtener una concentración de 80 ml/l. La solución se almacenó a -4 °C hasta su uso. Se prepararon en metanol (MeOH) soluciones estándar de 1000 mg/L de hexanal, acetaldehído, acetona, dimetilsulfuro, 2,3-butanodiona, acetato de etilo y pentanal.

Instrumentación y software

Los análisis HS-GC-MS se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases 7890A GC-System de Agilent Technologies (California, EE. UU.), equipado con un vaporizador de temperatura controlada (PTV) modelo CIS4-C506 y un inyector automático

(*Head-space* modelo *Multipurpose Sampler MPS*), ambos de Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemania). El sistema GC se acopló a un espectrómetro de masas (detector de eje triple MSD inerte 5975C de Agilent Technologies). La separación cromatográfica se realizó en una columna DB-624 con un diámetro interno de 0,25 mm, una longitud de 60 m y un espesor de película de 1,40 µm, constituida por 94% de dimetilpolisiloxano y 6% por cianopropilfenilo, también de Agilent Technologies. La inyección se realizó en modo dividido con una proporción de 1:10. El programa de temperatura de GC fue: temperatura inicial 40 °C, mantener durante 5 min, aumentar a 150°C a razón de 10°C/min manteniendo la temperatura durante 2 min; a continuación, se alcanzó la temperatura de 220 °C a razón de 25°C/min manteniendo la temperatura durante 2 min. El espectrómetro de masas se hizo funcionar usando el modo de impacto electrónico (EI) (70 V) y la temperatura de la fuente de iones fue de 230 °C. Los análisis se llevaron a cabo usando el modo de barrido de 29 a 150°C. Se utilizó un pHmetro SensION™ (Hach, Colorado, EE. UU.) para las mediciones de pH. La determinación del color se llevó a cabo utilizando un colorímetro 962 de X-Rite (Michigan, EE.UU.) y un espectrofotómetro Nicolet Evolution 300 de Thermo Electron Corporation (Massachusetts, EE.UU.) para preparar el inóculo de *C. metapsilosis* y *Z. bailii*. Los datos se procesaron utilizando Microsoft Office Excel (Microsoft, Washington, EE. UU.) Y Simca-P (Umetrics, Malmö, Suecia).

Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos especies diferentes de levadura: *Z. bailii* y *C. metapsilosis*. La primera se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo Valencia (CBS 680)

que fue aislada por Lindner y Guilliermond en 1912. *C. metapsilosis* fue aislado de una salsa por Productos del Sur SA, y su identidad se verificó comparando la secuenciación del ADN de la cepa aislada con la disponible en la Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia.

El inóculo de levadura se preparó transfiriendo una colonia obtenida en Placa Petri con medio Sabouraud dextrosa agar y cloranfenicol a un caldo triptona de soja (TSB), el cual se incubó durante 24 h a 25 °C. A continuación el inóculo se estandarizó mediante dilución en TSB a una densidad óptica de 0,9 a 600 nm para *C. metapsilosis* y 0,5 para *Z. bailii*, lo que equivale a una concentración de levadura de 10^7 y 10^5 CFU/ml, respectivamente. Las poblaciones de levadura de los inóculos se determinaron mediante el método estándar de dilución y siembra en superficie de placas de Petri con medio de Sabouraud dextrosa agar y cloranfenicol, seguido de incubación a 25 °C durante 48 h.

Elaboración e inoculación de mayonesa

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando mayonesa ligera, es decir, mayonesa con menor contenido de grasa, y se preparó utilizando un robot de cocción en condiciones estériles. La formulación de la mayonesa consistió en 55,05% de aceite de soja, 29,00% de agua, 8,00% de yogur, 3,00% de vinagre, 1,80% de sal, 1,70% de azúcar, 0,50% de caseinato, 0,80% de goma xantana y 0,15% de goma guar. Se probaron dos aditivos alimentarios diferentes para aumentar la variabilidad de las muestras y el perfil de volátiles generados. En concreto, NFC, una combinación sinérgica de extractos vegetales de cítricos y eneldo, y sorbato-benzoato, una mezcla

(1:1) de sorbato de potasio y benzoato de sodio. De esta forma se prepararon 21,60 kg de mayonesa, que se dividieron en dos lotes (de 10,80 kg cada uno). Un lote contenía 0,1% de sorbato-benzoato y el otro 0,1% de aditivo NFC.

Se colocaron alícuotas de 50 g de mayonesa en bolsas de polietileno estériles. Un tercio de las bolsas fue inoculado con *Z. bailii* y otro tercio con *C. metapsilosis* a una concentración de 10^3 UFC/ml. Las bolsas se sellaron con calor y se incubaron a 5 °C, 25 °C y 37 °C hasta el momento del muestreo. Se muestreó semanalmente un gramo de cada bolsa durante siete semanas, obteniendo una muestra para cada temperatura, cada cepa y cada aditivo. Las bolsas restantes no se inocularon para controlar la evolución de la mayonesa sin contaminación por levaduras y se incubaron y muestrearon en las mismas condiciones.

Las UFC/g de muestra se determinaron mediante recuento en placa, siguiendo la norma ISO 6887-1. Las muestras de mayonesa, previamente pesadas, se diluyeron en agua de peptona y las diluciones apropiadas se sembraron en placas Petri por el método estándar de siembra por dilución en agar fundido con medio Sabouraud dextrosa agar con cloranfenicol y las placas se incubaron a 25 °C durante 48 h antes de efectuar el recuento de UFC.

Análisis de muestras por GC-MS

Para los análisis HS-GC-MS, se pesó 1 g de mayonesa en un vial de 10 ml y se agregaron 50 ml de la solución estándar interna de clorobenceno a 80 ml/l.

Las muestras se incubaron a 80 °C durante 20 min y se inyectaron en el GC. En el PTV, la muestra se enfrió a 0 °C y se calentó durante 30 s a 12 °C/s hasta alcanzar

los 180 °C, que se mantuvieron durante cinco minutos. Para cuantificar el contenido de hexanal se estableció una curva de calibración utilizando soluciones estándar en dimetilsulfóxido a las siguientes concentraciones: 2, 4, 8, 12 y 16 µg/L, considerando la ratio área pico de hexanal/área pico de clorobenceno (IS) como la señal analítica.

Medición del pH y color

Se midió el pH y el color de cada muestra. Para la determinación del color, los parámetros L* (luminosidad), a* (equilibrio entre verde y rojo) y b* (equilibrio entre amarillo y azul) se determinaron con un espectrofotómetro X-Rite 962 utilizando el método de observación iluminación D65/10°. Aunque se determinaron los tres parámetros (L*, a* y b*), solo se consideró el parámetro L* para la construcción de los modelos quimiométricos debido a que los otros dos parámetros permanecieron constantes durante todo el experimento.

Tratamiento de datos

El análisis quimiométrico consistió en un análisis cualitativo de los componentes principales (PCA) con un intervalo de confianza del 95%, seguido de un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). El OPLS-DA filtró la variación no directamente relacionada con la respuesta y maximizó la varianza entre las categorías minimizándola dentro de ellas. En todos los casos, los datos se dividieron aleatoriamente en dos conjuntos diferentes: un conjunto de clasificación (80%) para la construcción de los modelos y un conjunto de validación

(20%). Además, se analizaron seis escalas diferentes: varianza unitaria (UV), varianza no unitaria (UVN), Pareto escalado (Par), pareto no escalado (ParN), escala centrada (Crt) y escala fija, así como la transformación logarítmica de los datos. Con la escala UV, la variable j se centra y se escala a "Varianza unitaria", es decir, el peso base se calcula como $1/sdj$, donde sdj es la desviación estándar de la variable j calculada alrededor de la media. La escala Par se encuentra entre la ausencia de escala y la escala UV. La variable j se centra y se escala a la varianza de Pareto, es decir, el peso base se calcula como $1/\sqrt{sdj}$, donde sdj es la desviación estándar de la variable j calculada alrededor de la media. Las escalas de UVN y ParN son las mismas que UV y Par, respectivamente, pero la variable no está centrada, es decir, la desviación estándar se calcula alrededor de 0. Con Crt, la variable está centrada pero no escalada y con escala fija, el peso de escala de la variable está fijo y no se volverá a calcular cuando las observaciones en el subproyecto cambien o la variable métrica se modifique después ser fijada. También se obtuvieron gráficos de importancia variable en proyección (VIP) y gráficas de contribución, para comprobar la importancia de cada variable en la construcción del modelo final.

4.2.3. Resultados y discusión

Detección de levadura en muestras de mayonesa

Inicialmente, todas las mayonesas se analizaron mediante recuento en placa Petri para cuantificar la contaminación microbiana. Con base en estos resultados, las muestras se dividieron en dos grupos: contaminadas (120 muestras) y no contaminadas (130 muestras) y fueron analizadas por HS-GC-MS. También se midieron el pH y el color. La evolución de \log_{10} , pH y color se muestra en la Figura 3 y, como puede verse, no se obtuvieron diferencias significativas entre las temperaturas de incubación y el tiempo de muestreo.

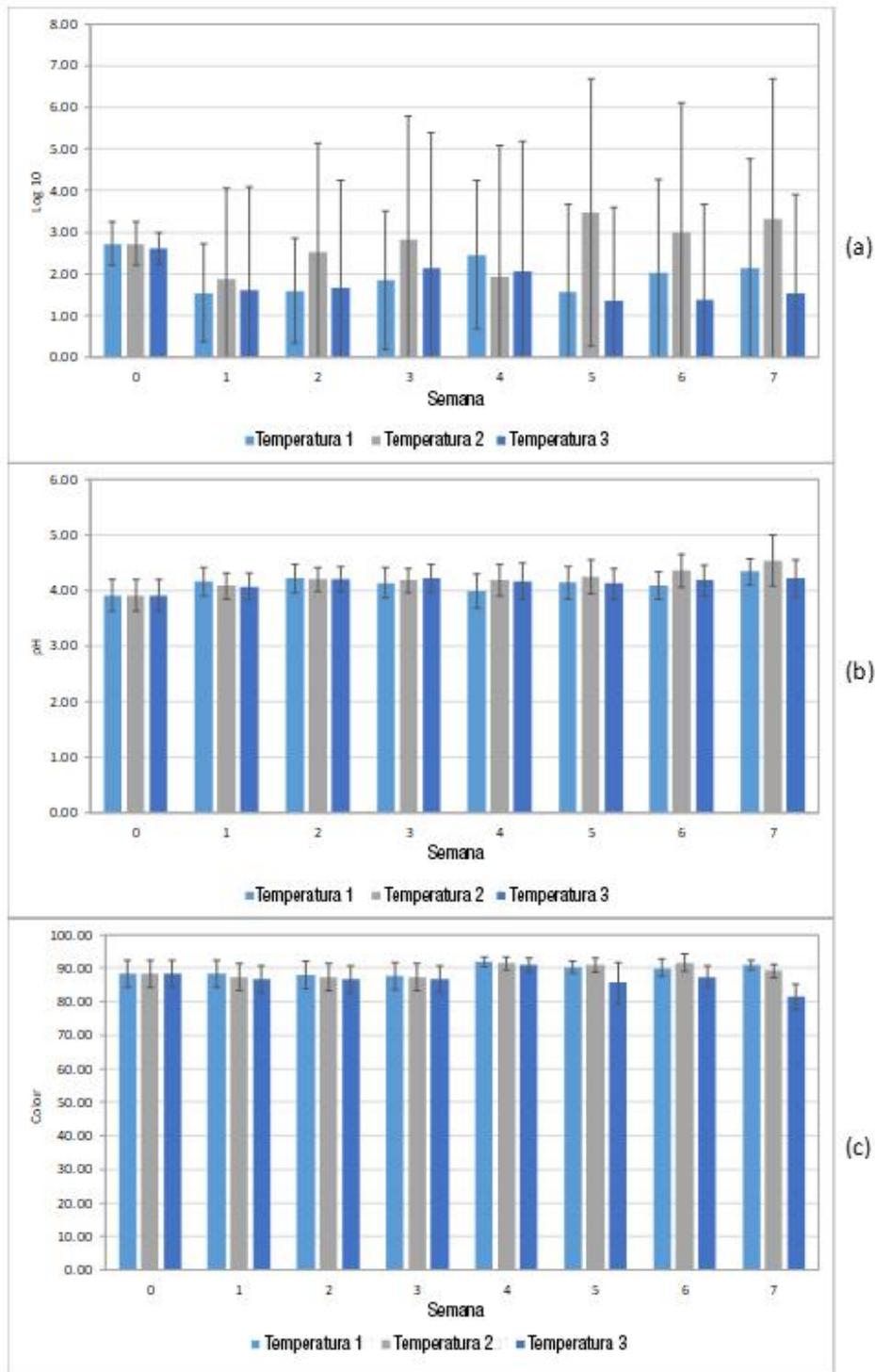


Figura 3. Evolución de Log₁₀ (a), pH (b) y color (c) a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas de incubación.

Luego, se construyeron modelos quimiométricos con los datos disponibles con el fin de obtener un modelo de clasificación que permitiera diferenciar muestras contaminadas y no contaminadas, como alternativa al recuento en placa de Petri.

Se construyeron cuatro modelos quimiométricos diferentes utilizando: a) las variables de pH, color y contenido de hexanal obtenidas por análisis GC-MS; b) el perfil m/z , simulando que las muestras no han sido previamente separadas en el GC; c) área de todos los picos presentes en la TIC obtenida por GC-MS; y d) el perfil cromatográfico completo.

Clasificación de las muestras usando pH, color y contenido de hexanal.

Las variables de pH, color y contenido de hexanal (subproducto de la oxidación de grasas) se han relacionado ampliamente con la contaminación microbiana de los alimentos (Collins y Buick, 1989; Huis in't Veld, 1996; Shahidi y Pegg, 1994). Por ello, en un primer intento por obtener un método analítico rápido y sencillo, como alternativa al recuento en placa de Petri, se obtuvo un modelo quimiométrico utilizando estos tres parámetros.

Inicialmente, se llevó a cabo un modelo de PCA utilizando la escala UV. Sin embargo, la separación entre las clases no fue buena, por lo que se implementó un modelo OPLS-DA. Los mejores resultados de validación se obtuvieron utilizando datos brutos y escala UV (Tabla 4).

PREDICCIÓN / REAL	Muestras contaminadas	Muestras no contaminadas
Muestras contaminadas	10	6
Muestras no contaminadas	14	20
Total	24	26
% Correcto	41.7%	76.9%

Tabla 5. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas/contaminadas del modelo OPLS-DA construido usando pH, color y contenido de hexanal.

Las alteraciones en el pH, color y contenido de hexanal parecen estar relacionadas principalmente con el aditivo utilizado, en este caso sorbato-benzoato o NFC, ya que ambos grupos de muestras aparecen bien separados en el OPLS-DA.

Clasificación de las muestras usando el perfil m/z

El m/z monitoreado osciló entre 29 y 150 y el perfil de m/z se obtuvo usando software GC. Los datos se procesaron sumando cada m/z a lo largo de todo el tiempo de análisis, es decir, simula que la muestra no se separó previamente en la columna cromatográfica.

Los datos difirieron considerablemente entre las muestras y, para igualar las matrices de datos de manera que fueran comparables, m/z se redondeó al número entero más cercano, sumando todos los valores de intensidad para el mismo número entero.

Como en la sección anterior, un modelo de PCA no proporcionó una buena separación entre grupos. Por tanto, se realizó un OPLS-DA utilizando el 80% de las muestras (Figura 5).

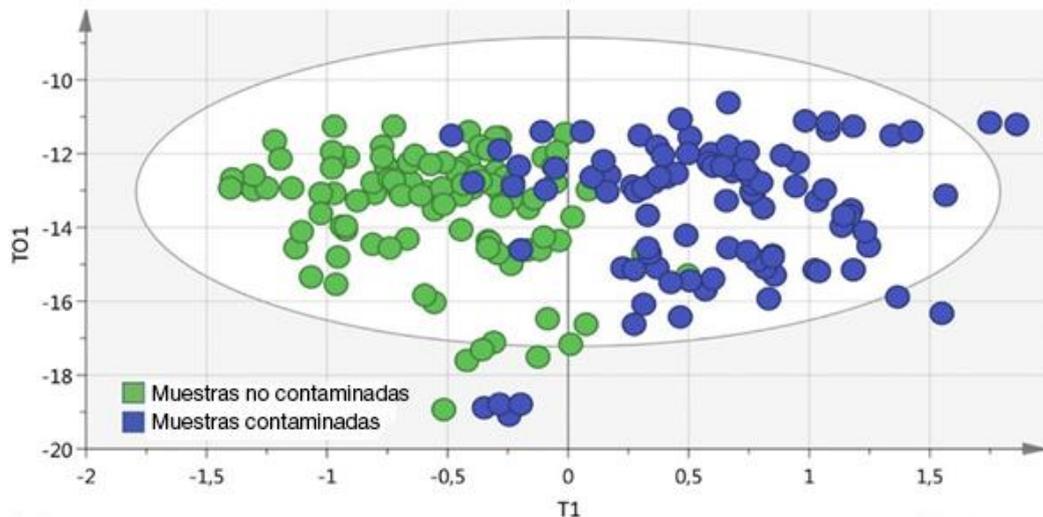


Figura 5. Modelo OPLS-DA obtenido con datos de perfil m/z.

En este caso, también se probaron diferentes transformaciones de datos de escala, obteniendo los mejores resultados con los datos transformados al logaritmo de escala ParN (Tabla 6).

Escalado	Éxito de la validación	
	Datos en bruto	Transformación logarítmica
UV	70.0%	74.0%
UVN	70.0%	72.0%
Par	68.0%	74.0%
ParN	74.0%	78.0%
Crt	62.0%	72.0%
Escala fija	62.0%	72.0%

Tabla 6. Optimización del escalado y transformación de datos utilizando datos de perfil m/z.

Esta escala reduce el impacto del ruido y los artefactos en los modelos (Wiklund y col. 2008), dividiendo cada variable por la raíz cuadrada de su desviación estándar.

OPLS-DA se validó con el 20% restante de las muestras y se obtuvo una tasa de éxito del 78,0% (84,6% de las muestras no contaminadas y 70,8% de las contaminadas se clasificaron correctamente (Tabla 7).

PREDICCIÓN / REAL	Muestras contaminadas	Muestras no contaminadas
Muestras contaminadas	17	4
Muestras no contaminadas	7	22
Total	24	26
% Correcto	70.8%	84.6%

Tabla 7. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas/contaminadas del modelo OPLS-DA construido utilizando datos de perfil m/z .

Los gráficos de contribución (Figura 6) mostraron que los valores m/z de entre 121 y 150 contribuyeron significativamente a la clasificación correcta de las muestras no contaminadas, mientras que los valores m/z de entre 29 y 74 fueron adecuados para clasificar las muestras contaminadas. Podría estar asociado a la descomposición de los componentes de la mayonesa en compuestos volátiles de menor tamaño por la acción de las levaduras, aunque esto debería ser estudiado con más detalle.

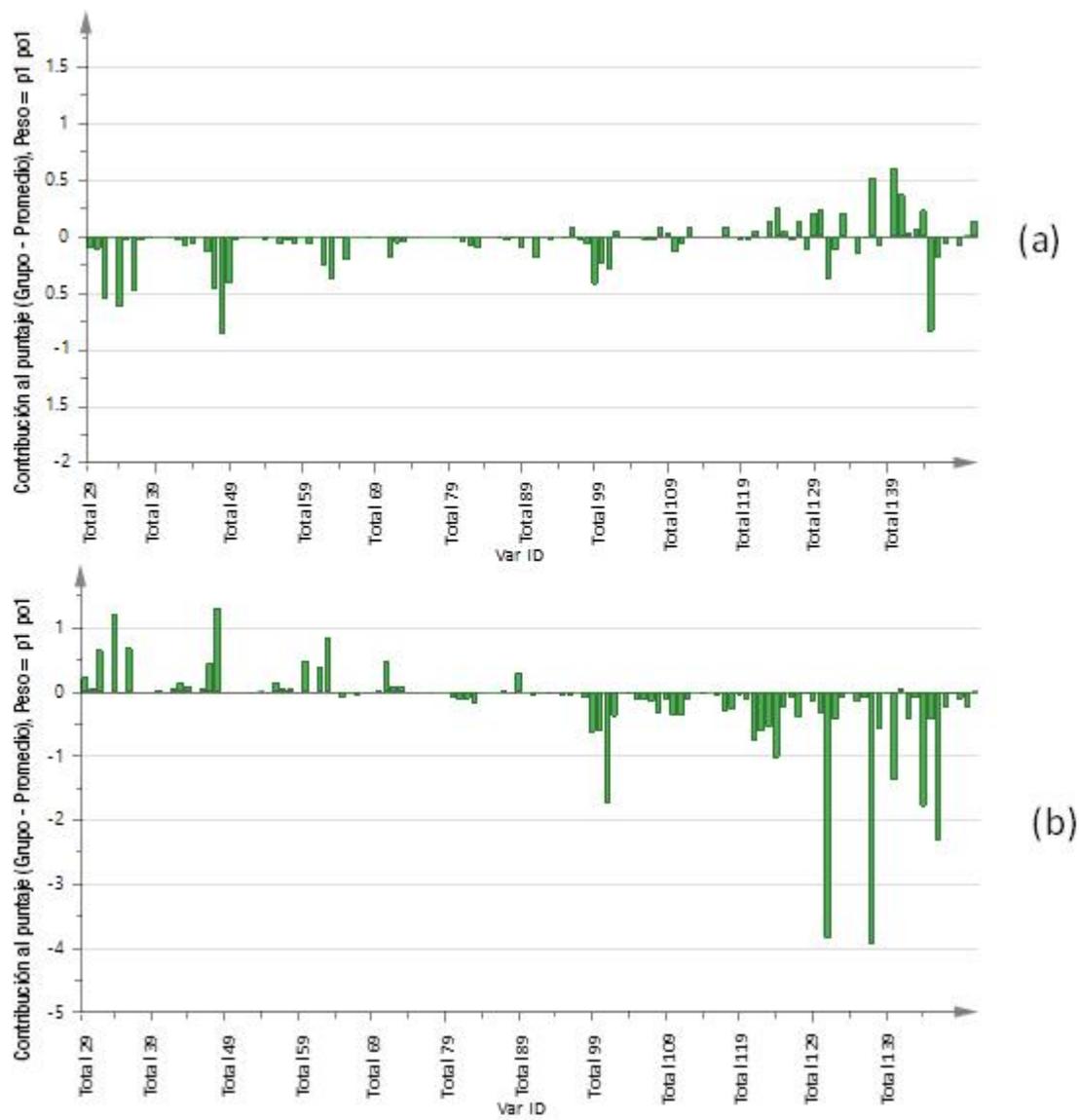


Figura 6. Parcelas de contribución del modelo OPLS-DA construidas utilizando el perfil m/z: (a) muestras no contaminadas, (b) muestras contaminadas.

Clasificación de muestras utilizando el área de todos los picos presentes en la TIC obtenida por HS-GC-MS

Como se mencionó anteriormente, la distribución limitada del peso molecular no permite un análisis completo y detallado utilizando solo MS, por lo que se estudió el cromatograma obtenido por HS-GC-MS.

Inicialmente, los picos presentes en las TIC se integraron manualmente (Figura 7). Estos picos se normalizaron con respecto al área del IS. De los 13 picos integrados, siete de ellos pudieron identificarse como acetaldehído, acetona, dimetilsulfuro, 2,3-butanodiona, acetato de etilo, pentanal y hexanal, mientras que los 6 restantes se procesaron como compuestos desconocidos. Los siete compuestos se identificaron usando la biblioteca GC-MS y se confirmaron inyectando salsa mayonesa enriquecida con cada compuesto a 1 $\mu\text{g/g}$.

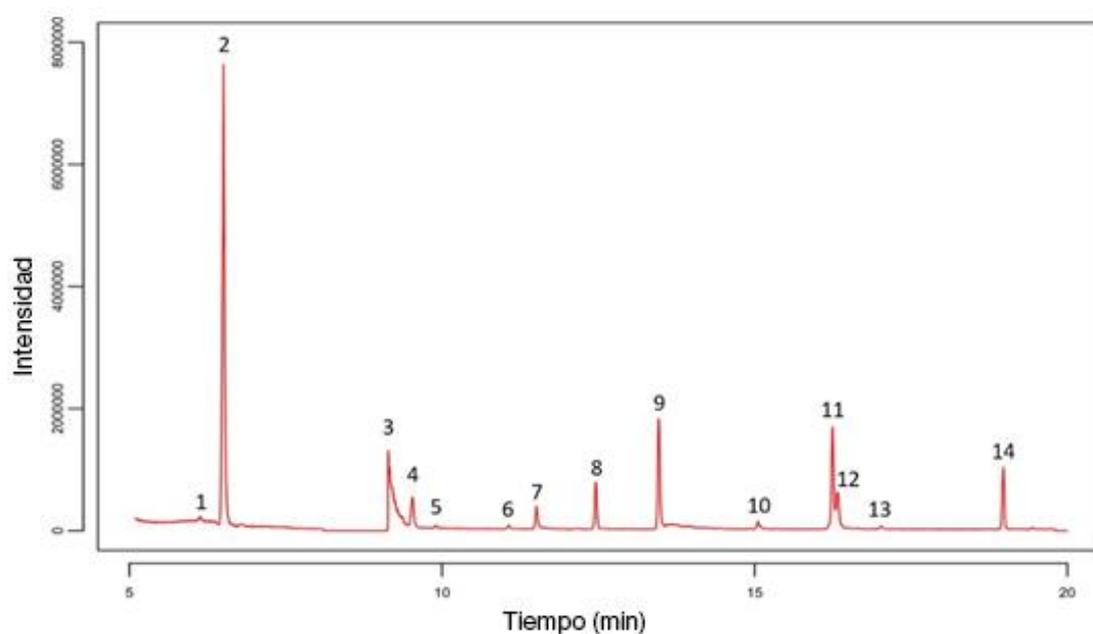


Figura 7. Cromatograma de una muestra de salsa obtenida por HS-GC-MS. 1: Desconocido 1, 2: Acetaldehído, 3: Acetona, 4: Dimetil sulfuro, 5: Desconocido 2, 6: Desconocido 3, 7: 2,3-butanodiona, 8: Acetato de etilo, 9: Desconocido 4, 10: Pentanal, 11: Hexanal, 12: Desconocido 5, 13: Desconocido 6, 14: Clorobenceno (IS).

También se construyeron modelos OPLS-DA utilizando diferentes escalas y transformación de datos. En este caso, el mayor éxito de clasificación se obtuvo utilizando datos brutos sin transformación y una escala UVN (Figura 8, Tabla 8).

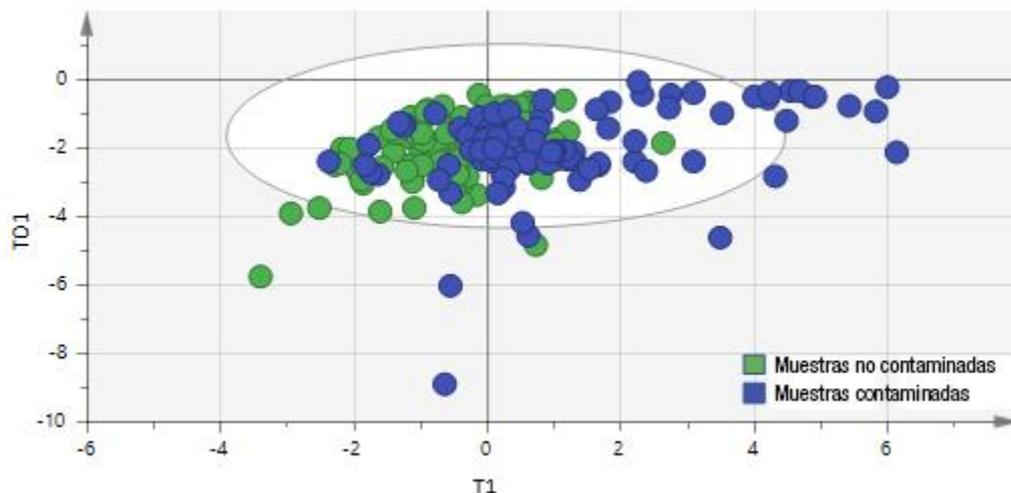


Figura 8. Modelo OPLS-DA obtenido utilizando las áreas de pico del cromatograma.

Escalado	Éxito de la validación	
	Datos en bruto	Transformación logarítmica
UV	75.5%	69.4%
UVN	76.0%	71.4%
Par	69.4%	73.5%
ParN	67.4%	69.4%
Crt	65.3%	73.5%
Escala fija	65.3%	73.5%

Tabla 8. Optimización de escalado y transformación de datos utilizando áreas de pico de cromatograma.

Sin embargo, el uso del área de los picos también fue insuficiente para la clasificación totalmente exitosa de las muestras, ya que las muestras contaminadas y no contaminadas parecían entremezcladas. La aplicación de los modelos OPLS-DA al conjunto de validación dio un éxito de clasificación del 76,0%, clasificando correctamente el 88,4% de las muestras no contaminadas, pero solo el 62,5% de las muestras contaminadas (Tabla 9).

PREDICCIÓN / REAL	Muestras contaminadas	Muestras no contaminadas
Muestras contaminadas	15	3
Muestras no contaminadas	9	23
Total	24	26
% Correcto	62.5%	88.5%

Tabla 9. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas/contaminadas del modelo OPLS-DA construido utilizando áreas de pico de cromatograma.

Por tanto, este método daría lugar a un elevado número de falsos negativos. Los picos que más contribuyeron a la clasificación correspondieron a acetaldehído, acetato de etilo, hexanal, 2,3-butanodiona y un compuesto no identificado (compuesto desconocido 5) (Figura 9).

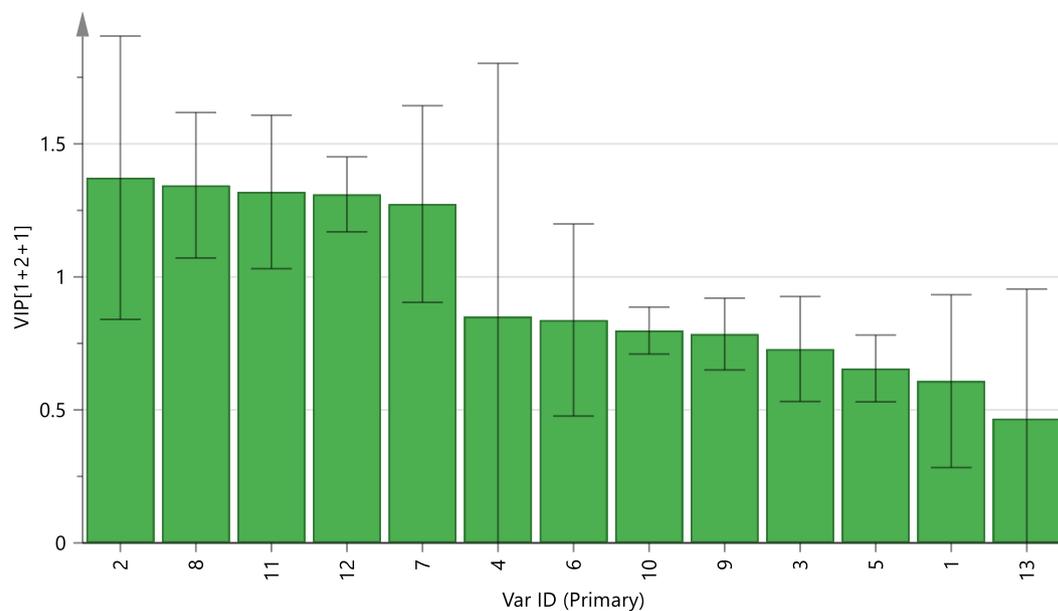


Figura 9. VIP del modelo OPLS-DA construido utilizando el área de todos los picos presentes en el TIC. 1: desconocido 1, 2: acetaldehído, 3: acetona, 4: dimetilsulfuro, 5: desconocido 2, 6: desconocido 3, 7: 2,3-butanodiona, 8: acetato de etilo, 9: desconocido 4, 10: pentanal, 11: hexanal, 12: desconocido 5, 13: desconocido 6.

Estos compuestos tendieron a mostrar una mayor intensidad en las muestras contaminadas, pero debido a la gran variabilidad entre las muestras, no se pudo establecer una relación clara (Figura 10).

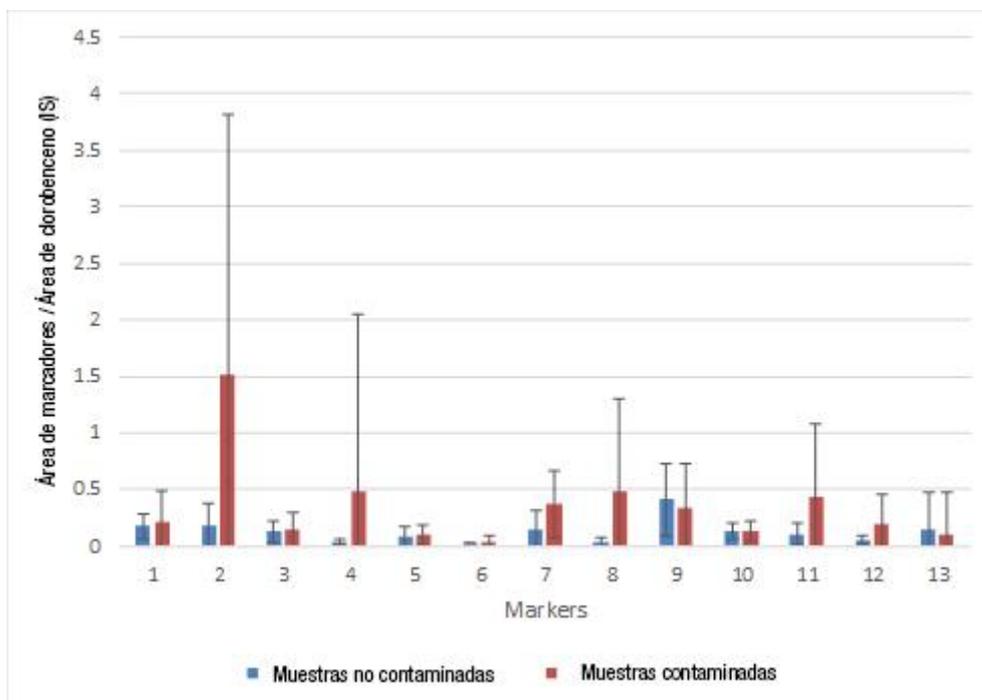


Figura 10. Comparación de marcadores de muestras contaminadas y no contaminadas 1: desconocido 1, 2: acetaldehído, 3: acetona, 4: dimetilsulfuro, 5: desconocido 2 6: desconocido 3, 7: 2,3-butanodiona, 8: acetato de etilo, 9: desconocido 4, 10: pentanal, 11: hexanal, 12: desconocido 5, 13: desconocido 6.

Clasificación de muestras mediante el cromatograma de iones totales

El TIC es la suma de las intensidades de todos los picos del espectro de masas que pertenecen a la misma exploración, por lo que contiene toda la información relativa a una muestra y se puede utilizar como huella digital. Por lo tanto, los modelos OPLS-DA se construyeron utilizando datos TIC.

La corrección y alineación de la línea de base no fueron necesarias, ya que los TIC se mantuvieron estables durante todo el experimento. En este caso, los mejores modelos se obtuvieron mediante la transformación logarítmica y la escala UV (Figura 11, Tabla 10), que arrojó una tasa de éxito del 92,0%.

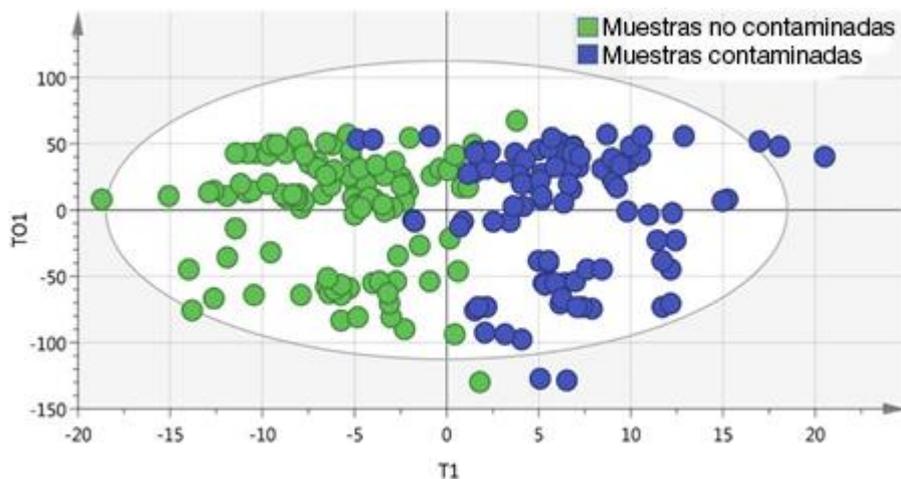


Figura 11. Modelo OPLS-DA obtenido utilizando datos de cromatograma de iones totales.

Escalado	Éxito de la validación	
	Datos en bruto	Transformación logarítmica
UV	88.0%	92.0%
UVN	86.0%	82.0%
Par	70.0%	84.0%
ParN	70.0%	82.0%
Crt	76.0%	82.0%
Escala fija	76.0%	82.0%

Tabla 10. Optimización del escalado y transformación de datos utilizando datos TIC.

El 92,3% de las muestras no contaminadas y el 91,7% de las muestras contaminadas se clasificaron correctamente (Tabla 11).

Predicción/actual	Muestras contaminadas	Muestras no contaminadas
Muestras contaminadas	22	2
Muestras no contaminadas	2	24
Total	24	26
% Correcto	91.7%	92.3%

Tabla 11. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas / contaminadas del modelo OPLS-DA construido con el TIC.

Clasificación de muestras combinando los valores m/z con el perfil cromatográfico

Los mejores resultados de clasificación se obtuvieron utilizando TIC (92,0%) y datos m/z (78,0%) por separado. Luego, se obtuvieron nuevos modelos OPLS-DA combinando ambos tipos de datos con el fin de mejorar el éxito de la clasificación. Los mejores resultados también se obtuvieron usando transformación logarítmica y escala UV (Tabla 12). Sin embargo, el éxito de la clasificación fue el mismo que cuando solo se utilizaron los datos de TIC.

Escalado	Éxito de la validación	
	Datos en bruto	Transformación logarítmica
UV	90.0%	92.0%
UVN	90.0%	78.0%
Par	70.0%	90.0%
ParN	70.0%	80.0%
Crt	76.0%	82.0%
Escala fija	76.0%	82.0%

Tabla 12. Optimización del escalado y transformación de datos utilizando TIC y datos m/z .

Clasificación de muestras contaminadas según concentración microbiana

Los modelos quimiométricos construidos utilizando los datos de TIC obtenidos por HS-GC-MS demostraron un gran éxito en la clasificación de muestras contaminadas y no contaminadas por levadura. Por lo tanto, se investigó el potencial de los datos de TIC para cuantificar la concentración de células de levadura.

Primero, las muestras contaminadas se dividieron en siete grupos con diferentes rangos de concentración celular de levadura: grupo 1 (entre 10^1 y 10^2 UFC/g), grupo 2 (entre 10^2 y 10^3 UFC/g), grupo 3 (entre 10^3 y 10^4 UFC/g), grupo 4 (entre 10^4 y 10^5 UFC/g), grupo 5 (entre 10^5 y 10^6 UFC/g), grupo 6 (entre 10^6 y 10^7 UFC/g) y grupo 7 (entre 10^7 y 10^8 UFC/g). Los modelos OPLS-DA también se construyeron con el 80% de las muestras (conjunto de calibración) utilizando tanto la matriz de datos brutos como la matriz transformada logarítmicamente, y diferentes escalas.

El modelo óptimo se obtuvo utilizando la matriz bruta nuevamente ajustada a una escala UV. Sin embargo, este modelo no fue suficiente para diferenciar entre los siete grupos de muestras y se obtuvo una tasa de éxito del 54,17% cuando se aplicó para clasificar el conjunto de validación (20% de las muestras restantes).

Por lo tanto, se seleccionaron otros rangos de concentración y el conjunto de calibración se dividió en tres grupos equilibrados: el grupo 1 comprendía el rango de concentración de 10^1 a 10^3 UFC/g (31 muestras), el grupo 2 de 10^3 a $10^{5.5}$ UFC/g (32 muestras) y grupo 3 de $10^{5.5}$ a 10^8 UFC/g (32 muestras). En este caso, se logró una buena separación entre grupos (Figura 12) y también se obtuvo el mejor modelo aplicando una transformación logarítmica y escala UV (Tabla 13). El modelo validado tuvo una clasificación de éxito del 87,50%.

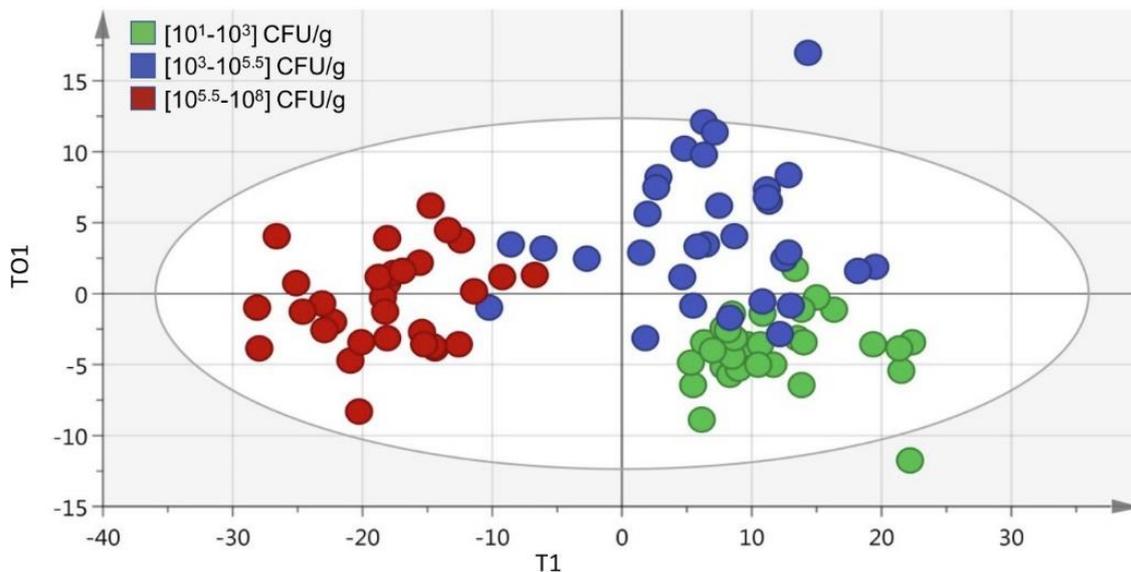


Figura 12. Modelo OPLS-DA construido utilizando datos TIC para clasificar muestras contaminadas en tres grupos de concentraciones de levadura.

Escalado	Éxito de la validación	
	Datos en bruto	Transformación logarítmica
UV	58.3%	87.5%
UVN	62.5%	62.5%
Par	62.5%	79.2%
ParN	62.5%	62.5%
Crt	54.2%	62.5%
Escala fija	54.2%	62.5%

Tabla 13. Optimización del escalado y transformación de datos para la clasificación de muestras contaminadas según concentración microbiana.

Clasificación de muestras contaminadas según cepa de levadura

Dado el éxito de HS-GC-MS para clasificar muestras de salsa contaminadas de acuerdo con la concentración de levadura, se estudió la idoneidad del método para diferenciar entre diferentes tipos de levadura. Para ello, las muestras contaminadas se dividieron en dos grupos: muestras contaminadas con *Z. bailii* y muestras contaminadas con *C. metapsilosis*. La mayoría de las muestras contaminadas pertenecían al grupo *Z. bailii*, ya que esta levadura crece más rápido que *C. metapsilosis*. Entonces, para obtener un grupo equilibrado, se incluyeron 31 muestras en cada grupo.

El mejor modelo quimiométrico se obtuvo con datos transformados logarítmicamente y ajustados a una escala UV. Ambos grupos parecían completamente separados (Figura 13). Sin embargo, cuando este modelo se aplicó al conjunto de muestras de validación, solo se logró un 62,50% de éxito. Este modelo debería mejorarse, p. Ej. aumentando el número de muestras durante la calibración, para que se utilice con éxito.

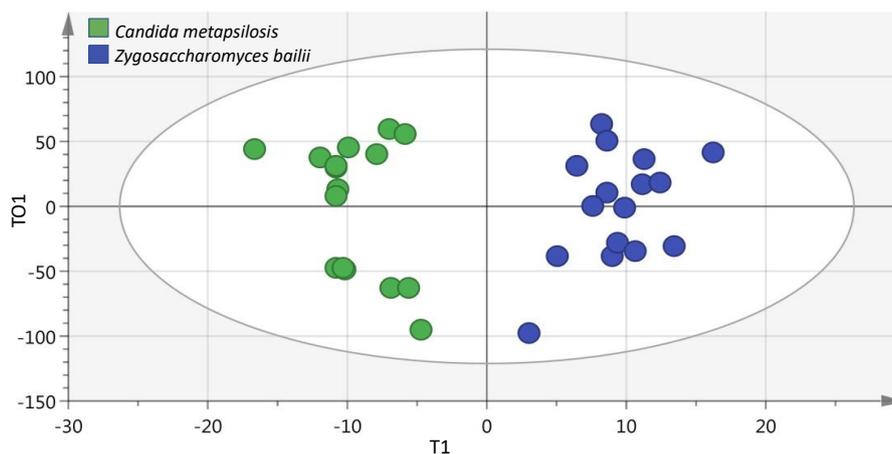


Figura 13. OPLS-DA para la clasificación de muestras contaminadas según la cepa de levadura.

5. CONCLUSIONES

1. *C. metapsilosis* es un microorganismo potencialmente patógeno, que se ha aislado en la salsa ranchera, donde puede crecer en refrigeración (5 °C) y a temperatura ambiente (25 °C), condiciones de almacenamiento frecuentes para la salsa ranchera.
2. La mezcla antimicrobiana estudiada (NFC), que contiene flavonoides obtenidos de extractos de *Citrus* y eneldo, cuyos componentes principales fueron naringenina, hesperetina, tangeritina, luteolina, apigenina y kaempferol en concentraciones entre 0.7 y 3.2%, presentó propiedades antifúngicas relevantes para *C. metapsilosis* en salsa ranchera.
3. La combinación de AA y NFC podría tener un efecto aditivo antimicrobiano en TSB para controlar el crecimiento de *C. metapsilosis*.
4. NFC en la dosis de 1 g/kg es capaz de controlar eficazmente el crecimiento de *C. metapsilosis* a todas las temperaturas probadas (5, 25 y 37 °C) sin cambiar significativamente las características sensoriales de la salsa ranchera.
5. Los conservantes naturales permiten reemplazar los conservantes químicos tradicionales como el sorbato y el benzoato con las ventajas de poder ser utilizados en emulsiones alimentarias de etiqueta limpia, sin alterar significativamente las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los productos.
6. Se ha demostrado que el análisis HS-GC-MS es una alternativa viable a los métodos clásicos de recuento microbiano para la identificación y cuantificación de levaduras en emulsiones alimentarias, lo que reduce el tiempo y los costes.
7. La utilización de todo el perfil cromatográfico (TIC), y por tanto de los compuestos orgánicos volátiles completos (perfil VOC), consigue mejores resultados a la hora

de clasificar salsas contaminadas por levaduras, ya que se obtuvo un éxito de validación del 92,0%.

8. El perfil completo de COV de compuestos orgánicos volátiles obtenido por HS-GC-MS permitió clasificar las muestras contaminadas según el rango de concentración de levadura, con una tasa de éxito de validación del 87,50%.
9. La modelización quimiométrica con datos obtenidos permite diferenciar distintos tipos de levadura, en el presente caso *C. metapsilosis* y *Z. bailii*. Sin embargo, aunque se obtuvieron dos grupos bien diferenciados, cuando se aplicó el modelo al conjunto de validación solo el 62,50% de las muestras se clasificaron correctamente.

6. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tablas

Tabla 1. Descripción general del mercado global y regional de CAS: tamaño del mercado, crecimiento y análisis per cápita, 2017-2022*. GlobalData (2018). *Opportunities in the Seasonings, Dressings & Sauces Sector*. Página 7.

Tabla 2. Diseño experimental en salsa ranchera (*Challenge test*, en salsa ranchera almacenada a 5, 25 y 37 °C. Página 31.

Tabla 3. El crecimiento de *C. metapsilosis* (% G) calculado para cada temperatura y pH, en TSB utilizando NFC en diferentes condiciones de pH y temperaturas de incubación en condiciones ácidas (pH 3.8 y 4.4) alcanzó la inhibición total del crecimiento de *C. metapsilosis* a los 10, 25 y 37 °C. Página 35.

Tabla 4. Optimización de escalado y transformación de datos usando pH, color y contenido hexanal. Página 58.

Tabla 5. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas/contaminadas del modelo OPLS-DA construido usando pH, color y contenido de hexanal. Página 59.

Tabla 6. Optimización del escalado y transformación de datos utilizando datos de perfil m/z. Página 60.

Tabla 7. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas/contaminadas del modelo OPLS-DA construido utilizando datos de perfil m/z. Página 61

Tabla 8. Optimización de escalado y transformación de datos utilizando áreas de pico de cromatograma. Página 64.

Tabla 9. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas/contaminadas del modelo OPLS-DA construido utilizando áreas de pico de cromatograma. Página 65.

Tabla 10. Optimización del escalado y transformación de datos utilizando datos TIC. Página 68.

Tabla 11. Matriz de validación para muestras de salsa no contaminadas / contaminadas del modelo OPLS-DA construido con el TIC. Página 69.

Tabla 12. Optimización del escalado y transformación de datos utilizando TIC y datos m/z. Página 69.

Tabla 13. Optimización del escalado y transformación de datos para la clasificación de muestras contaminadas según concentración microbiana. Página 71.

Figuras

Figura 1. Efecto del pH, la temperatura y el uso de AA sobre el crecimiento (AUC) de *C. metapsilosis* en TSB durante 24 h en MPA. a AA –, b AA +. Página 33.

Figura 2. Recuento microbiano de *C. metapsilosis* en salsa ranchera durante 70 días de almacenamiento a diferentes temperaturas. a 5 °C, b 25 °C, c 37 °C (línea discontinua Control Positivo; cuadrado abierto S/B; triángulo relleno NFC). Página 40.

Figura 3. Evolución de Log₁₀ (a), pH (b) y color (c) a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas de incubación. Página 56.

Figura 4. Modelo OPLS-DA obtenido mediante variables de pH, color y contenido de hexanal. El aditivo sorbato-benzoato y NFC se indican con una "S" o "G" al final del código de muestra, respectivamente. Página 58.

Figura 5. Modelo OPLS-DA obtenido con datos de perfil m/z. Página 59.

Figura 6. Parcelas de contribución del modelo OPLS-DA construidas utilizando el perfil m/z: (a) muestras no contaminadas, (b) muestras contaminadas. Página 62.

Figura 7. Cromatograma de una muestra de salsa obtenida por HS-GC-MS. 1: Desconocido 1, 2: Acetaldehído, 3: Acetona, 4: Dimetil sulfuro, 5: Desconocido 2, 6: Desconocido 3, 7: 2,3-butanodiona, 8: Acetato de etilo, 9: Desconocido 4, 10: Pentanal, 11: Hexanal, 12: Desconocido 5, 13: Desconocido 6, 14: Clorobenceno (IS). Página 63.

Figura 8. Modelo OPLS-DA obtenido utilizando las áreas de pico del cromatograma. Página 64.

Figura 9. VIP del modelo OPLS-DA construido utilizando el área de todos los picos presentes en el TIC. 1: desconocido 1, 2: acetaldehído, 3: acetona, 4: dimetilsulfuro, 5: desconocido 2, 6: desconocido 3, 7: 2,3-butanodiona, 8: acetato de etilo, 9: desconocido 4, 10: pentanal, 11: hexanal, 12: desconocido 5, 13: desconocido 6. Página 66.

Figura 10. Comparación de marcadores de muestras contaminadas y no contaminadas 1: desconocido 1, 2: acetaldehído, 3: acetona, 4: dimetilsulfuro, 5: desconocido 2 6: desconocido 3, 7: 2,3-butanodiona, 8: acetato de etilo, 9: desconocido 4, 10: pentanal, 11: hexanal, 12: desconocido 5, 13: desconocido 6. Página 67.

Figura 11. Modelo OPLS-DA obtenido utilizando datos de cromatograma de iones totales. Página 68.

Figura 12. Modelo OPLS-DA construido utilizando datos TIC para clasificar muestras contaminadas en tres grupos de concentraciones de levadura. Página 71.

Figura 13. OPLS-DA para la clasificación de muestras contaminadas según la cepa de levadura. Página 7.

7. EQUIPOS



8. BIBLIOGRAFÍA

Altameme, H.J., Hameed, I.H., Hamza, L.F. (2017). *Anethum graveolens*: physicochemical properties, medicinal uses, antimicrobial effects, antioxidant effect, anti-inflammatory and analgesic effects: a review. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance* . 8:88–91

Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT – Food Science and Technology*, 49(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.008>

Araki, A., Kanazawa, A., Kawa, T., Eitaki, Y., Morimoto, K., Nakayama, K., Shibata, E., Tanaka, M., Takigawa, T., Yoshimura, T., Chikara, H., Saijo, Y., Kishi, R. (2012). The relationship between exposure to microbial volatile organic compound and allergy prevalence in single-family homes. *Science of the Total Environment*, 423, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.026>

Association for Dressings and Sauces (2021). History of Salad Dressings. The Association for Dressings and Sauces, 3200 Windy Hill Road SE, Suite 600W Atlanta, GA 30339 (EEUU). <https://dressings-sauces.org/> (9 de abril de 2021).

Bizzini, A., Greub, G., (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(11), 1614–1619. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x>

Brul, S., Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50:1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)

Cava, R., Nowak, E., Taboada, A., Marin-Iniesta, F. (2007). Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 70:2757–2763. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.12.2757>

Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B., Wang, Y. (2013). Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology* 62:1175–1183. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.055467-0>

Collins, M.A., Buick, R.K. (1989). Effect of temperature on the spoilage of stored peas by *Rhodotorula glutinis*. *Food Microbiology*, 6(3), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(89\)80021-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(89)80021-8)

del Valle, P. García-Armesto, M.R., de Arriaga D., González-Donquiles, C., Rodríguez-Fernández, P., Rúa J (2016) Antimicrobial activity of kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. *Food Control*. 61:21,3–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.001>

Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., Zhao, Y. (2014). Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*. 38:184–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.023>

de Souza, E.L., Carneiro de Barros, J.C., da Conceição, M.L., Gomes-Neto, J., Vieira da Costa, A.C. (2009). Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Braz. J. Microbiol.* 40:387–393. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000032>

Dias de Castro, R., de Souza, T.M., Bezerra, L.M., Ferreira, G.L., Costa, M.M., Calvacanti, A.L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complement. Altern. Med.* 15:417-424. DOI 10.1186/s12906-015-0947-2

Elizaquível, P., Aznar, R., Sánchez, G. (2013). Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J. Appl. Microbiol.* 116(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.12365>

Eumkeb, G., Chukrathok, S. (2013). Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine* 20:262–269. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.10.008>

Eumkeb, G., Siriwong, S., Thumanu, K. (2012). Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin resistant *Escherichia coli* and mode of action. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 117:247–253
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.10.006>

Fialova, S. Slobodnkova, L., Veizerová, L., Granai, D. (2015) *Lycopus europaeus*: phenolic fingerprint, antioxidant activity and antimicrobial effect on clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Natural Product Research*, 29:2271–2274. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1010086>

Friberg, S., Larsson, K., Sjoblom, J., (2004). Food Emulsions. Cuarta edición. Editorial Marcel Dekker, Inc, Nueva York, EEUU.

García, T., Mayoral, B., González, I., López-Calleja, I., Sanz, A., Hernández, P. E., Martín, R. (2004). Enumeration of yeasts in dairy products: A comparison of immunological and genetic techniques. *Journal of food protection*, 67(2): 357–364. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.2.357>

Garner, C. D., Starr, J. K., McDonough, P. L. Altier, C. (2010). Molecular identification of veterinary yeast isolates by use of sequence-based analysis of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6): 2140–2146.

GlobalData (2018). Opportunities in the Americas Seasonings, Dressings & Sauces Sector. Global Business Insights.

<https://consumer.globaldata.com/Analysis/details/opportunities-in-the-americas-seasonings-dressings-and-sauces-sector> (9 de abril de 2021)

Hoefler, A.C. (2004) Functions and Properties. Hydrocolloids: [practical Guides for the Food Industry], Editorial Eagan Press. American Association of Cereal Chemist. Minnesota (EEUU). <https://doi.org/10.1094/1891127381.003>

Huang, C.B., Alimova, Y., Myers, T.M., Ebersole, J.L., (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol* 56:650–654. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.01.011

Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1): 1–18. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)

ISO. (2017). ISO 6658 : 2017 Guidance, Sensory analysis -- Methodology -- General guidance. Standars Catalogue, 1–26. www.iso.org/standard/65519.html (10 de abril de 2021).

Kiplimo, J.J., Koorbanally, N.A. (2012). Antibacterial activity of an epoxidised prenylated cinnamaldehyde derivative from *Vepris glomerata*. *Phytochemistry Letters* 5(3):438–442. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.03.017>

Kurita, N., Koike, S. (1983). Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. *Agricultural and Biological Chemistry* 47:67–75. <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10865580>

Kurtzman, C.P., Rogers, R., Hesseltine, C.W. (1971). Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. *Applied and Environmental Microbiology*, 21(5): 870–874. <https://aem.asm.org/content/aem/21/5/870.full.pdf>

- Lee, H., Woo, E.R., Lee D.G. (2018). Apigenin induces cell shrinkage in *Candida albicans* by membrane perturbation. *FEMS Yeast Research*, 18:1-9
<https://doi.org/10.1093/femsyr/foy003>
- Lee, W., Woo, E.R., Lee, D.G. (2019). Effect of apigenin isolated from *Aster yomena* against *Candida albicans*: apigenin-triggered apoptotic pathway regulated by mitochondrial calcium signaling. *Journal of Ethnopharmacology* 231: 19-28
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.005>
- Li, Z.H., Cai, M., Liu, Y., Sun, P. (2018). Development of finger citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*.) essential oil loaded nanoemulsion and its antimicrobial activity. *Food Control* 94:317–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.009>
- Lo, H. J., Tsai, S. H., Chu, W. L., Chen, Y. Z., Zhou, Z. L., Chen, H. F., Ching, F.L., Yang, Y.L. (2017). Fruits as the vehicle of drug resistant pathogenic yeasts. *Journal of Infection*, 75(3): 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.06.005>
- Los, D.A., Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1666:142–157. <https://doi.org/10.1016/j.bba.mem.2004.08.002>
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J., Narbad A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103:2056–2064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x>
- Mhalla, D., Bouaziz, A., Ennouri, K., Chawed, R., Smaoui, S., Jarraya, R., Tounsi, S., Trigui, M. (2017). Antimicrobial activity and bioguided fractionation of *Rumex tingitanus* extracts for meat preservation. *Meat Science* 125:22–29.
doi:10.1016/j.meatsci.2016.11.011

Morales, M. L., Fierro-Risco, J., Ríos-Reina, R., Ubeda, C. Paneque, P. (2019). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* co-inoculation on volatile profile in fermentations of a must with a high sugar content. *Food Chemistry*, 276, 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.041>

Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C. (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:375–380.

Piper, P., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K., Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*. 147:2635–2642. DOI: 10.1099/00221287-147-10-2635

Pires, R.H., da Silva, J.F., Martins, C.H., Fusco-Almeida, A.M., Pienna-Soares, C., Spares, M.J. (2013) Effectiveness of disinfectants used in hemodialysis against both *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis* sensu stricto biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:2417–2421. DOI: 10.1128/aac.01308-12

Pourkomialian, B. (2000): Sauces and dressings. En: Kilcast, D., Subramaniam P. (Eds.), The stability and shelf-life of food. Editorial CRC Press. Washington, D.C. EEUU.

Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., van de Put, F., Dacombe, C., Rice-Evans, C.A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and Vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36:217–233.
<https://doi.org/10.1080/10715760290006484>

Quarenghi, M.V., Tereschuk, M.L., Baigori, M.D., Abdala, L.R. (2000). Antimicrobial activity of flowers from *Anthemis cotula*. *Fitoterapia*, 71:710–712.
[https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00229-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00229-X)

Quiles-Melero, I., García-Rodríguez, J., Gómez-López, A., Mingorance, J. (2011).

Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. *European Journal of Clinical Microbiology*, 31(1), 67–71.

Restaino L., Lenovich L.M., Bills, S. (1982). Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *Journal of Food Protection*, 45(12), 1138–1142.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.12.1138>

Rhee, M.S., Lee, S.Y., Dougherty, R.H., Kang, D.H. (2003). Antimicrobial effects of mustard flour and acetic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:2959–2963. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2959-2963.2003>

Robl, D., Thimoteo, S.S., de Souza, G.C.C.F., Beux, M.R., Dalzoto, P.R., Pinheiro, R.L., Pimentel, I.C. (2014). Occurrence of *Candida orthopsilosis* in Brazilian tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 105–109.
DOI: 10.1590/s1517-83822014000100015

Rohm, H., Lechner, F. Lehner, M. (1990). Microflora of Austrian natural-set yogurt. *Journal of Food Protection*. 53 (6): 478–480. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.6.478>

Sánchez-Rubio, M., Guerrouj, K., Taboada-Rodríguez, A., López Gómez, A., Marín-Iniesta, F. (2017). Control of native spoilage yeast on dealcoholized red wine by preservatives alone and in binary mixtures. *Journal of Food Science*, 82:2128–2133.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13817>

Serpa, R., Franca, E.J.G., Furlaneto-Maia, L., Andrade, C.G.T., Diniz, A., Furlaneto, M.C. (2012). In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 61:1704–1708.
DOI: 10.1099/jmm.0.047852-0.

Shahidi, F., Pegg, R.B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, 53(6), 461–540. 1(3): 177–186. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.1994.tb00245.x>

Sikora, M., Badrie, N., Deisingh, A.K., Kowalski, S. (2008) Sauces and Dressings: A Review of Properties and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 50-77. DOI: 10.1080/10408390601079934

Silva, A.P., Miranda, I.M., Lisboa, C., Pina-Paz, C., Rodrigues, A.G. (2009). Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:2392–2397. DOI: 10.1128/JCM.02379-08

Singh, K.A., Kaur, A., Singh, N., Nim, L., Shevkani, K., Kaur, H., Arora, D.S. (2016). In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. *LWT - Food Science and Technology* 65:1025–1030. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.038>

Smith, A.F. (1998). "From Garum to Ketchup. A Spicy Tale of Two Fish Sauces". In *Fish: Food from the Waters. Proceedings of the Oxford Symposium on Food and Cookery*. pp. 299–306. Harlan Walker, (ed.) Prospect Books, ISBN 978-0-907325-89-5.

Smittle, R.B. (2000). Microbiological Safety of Mayonnaise, Salad Dressings, and Sauces Produced in the United States: A Review. *Journal of Food Protection*, 63(8): 2000, 1144–1153. DOI: 10.4315/0362-028x-63.8.1144

Strollo, S., Lionakis, M.S., Adjemian, J., Steiner, C.A., Prevots, D.R. (2017). Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002–2012. *Emerging Infectious Diseases*. DOI: 10.3201/eid2301.161198

Taverna, C.G., Mazza, M., Bueno, N.S., Alvarez, C., Amigot, S., Andreani, M., Azula, N., Barrios, R., Fernandez, N., Fox, B., Guelfand, L., Maldonado, I., Murisengo, O.A. Relloso, S., Vivot, M., Davel, G. (2019). Development and validation of an extended

database for yeast identification by MALDI-TOF MS in Argentina. *Medical Mycology*, 57(2): 215–225. DOI: 10.1093/mmy/myy021

Tsuchiya, H., Iinuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial Sophora flavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* 7:161–165. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80089-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80089-6)

Vermeulen, A. (2008). Microbial stability and safety of acid sauces and mayonnaise-based salads assessed through probabilistic growth/no growth models. University of Gent, Tesis doctoral. <https://biblio.ugent.be/publication/470411/file/4334568.pdf> (10 de Abril de 2021).

Viswanadhan, V.N., Rajesh, H., Balaji, V.N. (2011). Atom type preferences, structural diversity, and property profiles of known drugs, leads, and nondrugs: A comparative assessment. *ACS Combinatorial Science*, 13(3), 327–336. <https://doi.org/10.1021/co2000168>

Wang, H., Hu, Z., Long, F., Guo, C., Yuan, Y., Yue, T. (2015). Detection of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida tropicalis* in a high-sugar medium by a metal oxide sensor-based electronic nose and comparison with test panel evaluation. *Journal of Food Protection*, 78(11):2052-2063. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-196

White, J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications”, (Vol. 31, pp. 315–322) Editorial Academic Press Inc. (EEUU). <http://pdf.xuebalib.com:1262/3x0d5gC6z4eF.pdf> (11 de abril de 2021).

Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., Gottfries, J., Moritz, T., Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, 80(1):115–122. <https://doi.org/10.1021/ac0713510>

Wind, C.E., Restaino, L. (1995). Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 58:1257–1259. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.11.1257>

Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., Xu, X. (2013). Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34):8185–8190.
<https://doi.org/10.1021/jf402222v>

Zhao, J., Wang, M., Yang, Z., Gong, Q., Lu, Y., Yang, Z. (2005). Mediated electrochemical measurement of the inhibitory effects of furfural and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters*, 27:207–211.
<https://doi.org/10.1007/s10529-004-7884-3>