



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGIA

Efecto Antimicrobiano de Vainilla y de Aceites Esenciales
de Canela y Clavo en Leche de Vaca Pasteurizada

Dña. Rita María Cava Roda
2013



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. María Dolores Garrido Fernández, Catedrática de Universidad del Área de Tecnología de Alimentos y **Director del Departamento*** Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Efecto antimicrobiano de vainillina y aceites esenciales de canela y clavo en leche de vaca pasteurizada", realizada por D^a Rita María Cava Roda, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Fulgencio Marín Iniesta, este Consejo de Departamento, en sesión celebrada en fecha *16 de Julio de 2013*, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a *16 de Julio* de 2013



Fdo. María Dolores Garrido Fernández

Doctorando: D^a. Rita María Cava Roda

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*

Mod: T-40



D. Fulgencio Marín Iniesta, Profesor Titular de Universidad del Área de Tecnología de Alimentos en el Departamento de Tecnología de alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Efecto antimicrobiano de vainillina y aceites esenciales de canela y clavo en leche de vaca pasteurizada", realizada por D. Rita María Cava Roda, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 08 de julio de 2013

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido publicada como:

Artículos científicos

- Cava Roda, R.M., Taboada Rodríguez, A., Palop Gómez, A., Lopez Gómez, A., Marín Iniesta, F. 2012. Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *International Journal of Food Microbiology* 157: 314-318.
- Cava Roda, R.M., Taboada Rodriguez A., Valverde Franco, M.T., Marin Iniesta, F. 2012. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food and Bioprocess Technology* 5:2120-2131
- 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.

Comunicaciones a Congresos

- Cava, R., Marín-Iniesta, F. y Fernandez-Escamez, P.S. 2004. Influence of some plant extracts in the growth kinetics of *Listeria monocytogenes*. *Meeting: Transatlantic Quality and Safety Systems in the AgroFood Chain: a technological, managerial and legislative approach*. Gent, Bélgica
- Cava Roda, R., Sáez-Soto, M.J., Fernández-Escamez, P., y Marín-Iniesta, F. 2005. Efecto de los aceites esenciales de canela y clavo sobre la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*. *III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Burgos, España. 2005.
- Cava Roda, R., Taboada, A., Novak, E, Marin-Iniesta, F. 2006. *Antimicrobial activity of mixtures of vanillin and some essential oils*. II IAFP (International Association of Food Protection) European Symposium. Barcelona, España.

- Cava Roda, R.M., Valverde Franco, M.T., Marin Iniesta, F. 2011. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Escherichia coli* O157:H7 in milk during storage in refrigeration 235-235. En: 23RD IIR International Congress of Refrigeration 2011. 978-2-913149-89-2. Praga, República Checa.
- Cava Roda, R.M., Marin Iniesta, F., Taboada Rodriguez, A., Valverde Franco, M.T.2010. Effect of vanillin on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in fluid milk. 1—5. En: International Conference on Food Innovation. 9788-84-693-5010-2. Valencia, España.
- Cava Roda, R.M., Taboada Rodriguez, A., Valverde Franco, M.T., Marin Iniesta, F. 2009. Efecto de la vainillina en el crecimiento y supervivencia de *E. coli* O157:H7 en caldo y en leche pasteurizada 267-267. En: Libro de Comunicaciones Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, mu-1585-2009, 2009
- Cava Roda, R.M., Taboada Rodriguez, A., Valverde Franco, M.T., Marín Iniesta, F. 2008. Actividad antimicrobiana de la vainillina frente a *Listeria monocytogenes* 81-81. En: II Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. 978-84-923537-7-4. Murcia, España.

*La vida está sembrada de milagros;
aquellos milagros que pueden esperar siempre
las personas que aman.*

Marcel Proust

A mis padres, a quienes les debo todo lo que soy

Agradecimientos

Durante todos los años en que he trabajado en la realización de esta tesis doctoral, han sido muchas las personas que de un modo u otro me han ayudado y han contribuido a su culminación. Quiero señalar que sin su apoyo moral en los muchos y duros momentos que me ha tocado vivir desde mi salida de Venezuela ésta no hubiera sido posible.

En primer lugar a mi familia, por estar siempre a mi lado, apoyándome y animándome a culminar este trabajo.

En segundo lugar a Fulgencio Marín, mi tutor y sobre todo mi amigo, a quien tengo que agradecer tantas y tantas cosas, gracias por acogerme y hacerme sentir en su laboratorio como un segundo hogar, gracias por depositar en mí su confianza y ofrecerme tantas oportunidades para trabajar con él en sus proyectos, que me han llenado siempre de ilusión y confianza en el futuro, gracias también por los buenos ratos que hemos compartido juntos en las excursiones de los domingos, en las comidas con los muchachos del laboratorio, en fin, no tengo palabras para expresar todo el agradecimiento que siento.

A los profesores del grupo de la Universidad Politécnica de Cartagena, Pablo Salvador Fernández-Escamez, Antonio Lopez y Alfredo Palop, por estar siempre dispuestos a ayudarme, a aclararme dudas y animarme a salir adelante. Especialmente doy las gracias a Alfredo por recibirme siempre tan amable y dedicarme su valioso tiempo.

A Amaury Taboada, mi gran compañero de laboratorio, con el que he compartido desde el principio esta nueva andadura en la cual nos puso la vida después de venir de América, receptor incansable de mis largos monólogos. Gracias por tus ideas y por tu ayuda insustituible en todo momento. Siempre valoraré tu amistad por encima de todo.

A Maria Teresa y a Miriam por vuestro cariño y vuestra ayuda en el laboratorio. Fueron muchas los momentos compartido, gracias a los cuales se forjó una bonita amistad.

A Carmen, mi gran amiga Carmen, gracias por tu amistad incondicional, por tus consejos, por estar siempre ahí animándome en las buenas y en la malas, por entenderme y por considerarme tu amiga.

A Ana Vera, que puedo decir.... simplemente gracias por representar para mi el auténtico valor de la amistad verdadera, resistente al paso de los años, las ausencias, los despistes y las desconsideraciones. Por sentir que siempre estás ahí pase lo que pase.

A Isa, ¡que buenos años juntas! ¡ que buenos consejos! ¡ que fundamental fuiste para mi en estos años para apoyarme y sobre todo aconsejarme en los momentos más difíciles!. Estés donde estés siempre te recordaré.

A todos los estudiantes de Eramus, con los cuales compartí su estancia en el laboratorio y que con su juventud, ilusión, risas y tazas de café me hicieron sentirme una joven estudiante de nuevo. Especialmente a Ewa Novak, por su ayuda y su amistad que ha permanecido con el tiempo y estoy segura que se alegrara mucho cuando vea que ya la tesis está terminada.

A Aurora y a Adelfo, insustituibles, con su cariño, su acento y su carácter latino que tantas veces me hicieron recordar con nostalgia los grandes amigos que deje en Venezuela.

Finalmente a Martica y Doris, que no por ser las últimas compañeras de trabajo son las menos importantes, al contrario, creo que caminaremos juntas por mucho tiempo. Muchas gracias por vuestro apoyo y por vuestra ayuda en los momentos finales para culminar esta tesis.

RESUMEN

Listeria monocytogenes y *E. coli* O157:H7 son microorganismos patógenos de gran preocupación en la industria láctea debido a que en los últimos años se han producido numerosos brotes de enfermedades asociados al consumo de productos lácteos, incluyendo la leche pasteurizada. La necesidad de buscar alternativas naturales a los aditivos químicos ha potenciado los estudios sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de plantas (AEs). En este estudio se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración No Inhibitoria (CNI) en Caldo Tripticasa de Soja (CTS) de los AEs de clavo, hojas de canela y corteza de canela, así como de los compuestos puros eugenol, cinamaldehído y vainillina frente a *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* O157:H7 mediante el modelado de la curva dosis-respuesta obtenida al graficar las áreas fraccionadas frente a la concentración de antimicrobiano, a pH 6 y 7.. También se determinaron las Concentraciones Parcialmente Inhibitorias (CPIs) y las Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMBs). La actividad de las combinaciones de antimicrobianos se determinó mediante el método del tablero de ajedrez, que permitió obtener la Concentración Fraccionada Inhibitoria de la mezclas (índice CFI), y la construcción de los isobogramas correspondientes. La actividad de la vainillina y de los aceites esenciales (AEs) y sus combinaciones se determinó en leche de vaca pasteurizada entera, semidesnatada y desnatada, almacenada a 7 °C y 35 °C. Por último se estudió la resistencia térmica de *L. monocytogenes* Scott A en leche semidescremada calentada a 55 °C, 58 °C, 60 °C y 62 °C con 900, 1400 y 1800 ppm de vainillina. Dos modelos matemáticos se usaron para ajustar los datos obtenidos: el modelo “shoulder+log-linear” de Geeraerd y el modelo Weibull. Los ensayos en CTS demostraron que *E. coli* 157:H7 fue más resistente a los AEs de corteza de canela, hojas de canela y clavo que *L. monocytogenes* mientras que la vainillina y el cinamaldehído mostraron una actividad antimicrobiana similar frente a los dos microorganismos. El antimicrobiano con mayor actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* fue el AE de corteza de canela seguido por el AE de clavo, cinamaldehído, AE de hojas de canela, eugenol y la vainillina. El antimicrobiano con mayor actividad inhibitoria frente a *E. coli* O 157:H7 fue el cinamaldehído, seguido por AE de corteza de canela, eugenol, AE de clavo, AE de hojas de canela y la vainillina. Los antimicrobianos con mayor actividad bactericida frente a *L. monocytogenes* fueron el AE clavo seguidos por el eugenol y hojas de canela, AE de corteza de canela,

cinamaldehido y vainillina. Frente a *E. coli* O157:H7 la mayor actividad bactericida la presentaron el eugenol, AE de clavo y AE de hojas de canela, seguidos por cinamaldehido, AE de corteza de canela. y vainillina. Las combinaciones de los AES ensayadas en CTS fueron aditivas para *L. monocytogenes* Scott A. Frente a *E. coli* O157:H7 las combinaciones con AE de hojas de canela y AE de clavo fueron aditivas, con corteza de canela fueron indiferentes y con vainilla fueron sinérgicas. En la leche de vaca semidescremada el AE de corteza de canela fue el antimicrobiano más efectivo frente a los dos microorganismos evaluados, seguidos de los AES de clavo y hojas de canela. La temperatura de incubación no afectó a la CMB pero la CMI sufrió un descenso a 7 °C, lo cual se puede atribuir al aumento de ácidos grasos insaturados que modulan la fluidez de la membrana, lo cual facilitaría el efecto perturbador de los AES. La grasa de la leche redujo significativamente la actividad antimicrobiana de todos los compuestos debido su efecto protector sobre los microorganismos. Los AES de canela, clavo y vainillina incrementaron su actividad antimicrobiana en las mezclas, logrando disminuir las concentraciones necesarias para conseguir la inhibición de los microorganismos diana en la leche. La incorporación de vainillina en la leche incrementó la tasa de muerte y disminuyó el tiempo de latencia, de las curvas de destrucción térmica de *L. monocytogenes* en leche, efecto que fue más evidente a las temperaturas más bajas. .Estos resultados sugieren que el uso de concentraciones sub-inhibitorias de vainillina en leche semidescremada favorecen la inactivación térmica de *L. monocytogenes*.

ABSTRACT

Among food-borne pathogens, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O 157:H7 are a great safety concern for the dairy industry because in the last decades several outbreaks have been associated with the consumption of dairy products including pasteurized milk. The growing demand of consumers for safe and natural products, without chemical preservatives has increased the investigations to assess the antimicrobial activity of the essential oils of plants (EOs). In this study the antimicrobial activity of clove EO, cinnamon leaves EO and cinnamon bark EO, eugenol, cinnamaldehyde and vanillin was determined in Trypticase Soy Broth (TBS) against *L. monocytogenes* Scott A y *Escherichia coli* O157:H7. The MIC (Minimal Inhibitory Concentration) and the NIC (Non Inhibitory Concentration) values were obtained by modeling the dose response curve based on fractional areas against the antimicrobial concentration at pH 6 and 7. Partially Inhibitory Concentrations (PICs) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs) were also determined. The FICs (Fractional Inhibitory Concentrations) index of mixtures of antimicrobials was established by the checkerboard method and the corresponding isobolograms. The activity of the antimicrobials and their combinations was determined in pasteurized whole, semiskim and skim cow's milk stored at 7 °C and 35 °C. Finally, the heat resistance of *L. monocytogenes* Scott A in semiskim pasteurized cow's milk heated to moderate temperatures (55, 58, 60 and 62°C) with different levels of vanillin (900, 1400 and 1800 ppm) was studied. Two models were used to fit the data: the "shoulder+log-linear" model and the Weibull model.

The highest inhibitory activity against *L. monocytogenes* was exhibited by cinnamon bark EO, followed by clove EO, cinnamon leaves EO, eugenol and vanillin. The highest inhibitory activity against *E. coli* O 157H was exhibited by cinnamaldehyde followed by cinnamon bark EO, eugenol, clove EO, cinnamon leaves EO and vanillin. The pH did not affect the MICs and CNIs values. The highest antimicrobial activity against *L. monocytogenes* Scott A was exhibited by clove EO, followed by eugenol, cinnamon leaves EO, cinnamon bark EO, cinnamaldehyde, and vanillin. The highest bactericidal activity against *E. coli* O157:H7 was exhibited by clove EO followed by eugenol and cinnamon leaves EO, cinnamaldehyde, cinnamon bark EO and vanillin. Mixtures of the EOs were additive for *L. monocytogenes* Scott A, but for *E. coli* O157:H7 mixtures with cinnamon bark EO were indifferent and with vanillin were synergistic. The antimicrobial with the

highest antimicrobial activity in semiskim cow's milk was cinnamon bark EO, followed by clove EO, cinnamon leaves EO and vanillin. The incubation temperatures did not affect the CMBs but the CMI₅₀s were lower at 7 °C for both microorganisms. This effect is attributed to the increase of unsaturated fatty acids at low temperature that modulate the membrane fluidity, which would facilitate the disruptive effect of EOs. Milk fat significantly reduced the antimicrobial activity of all compounds. Vanillin and cinnamon bark, cinnamon leaves and clove EOS mixtures enhanced the activity of the individual components, reducing the antimicrobial concentration required for inhibition of the target microorganisms in milk. Vanillin increased the death rate and reduced the shoulder length of the thermal destruction curves of *L. monocytogenes* in milk, effect that was more evident when lower temperatures were used. In general, the results suggest that the use of sub-inhibitory concentrations of vanillin could be used to enhance the inactivation of *L. monocytogenes* Scott A in semiskim milk.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	XI
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	1
OBJETIVOS.....	5
1 INTRODUCCION.....	7
1.1 Tecnologías emergentes en la conservación de alimentos.....	7
1.2 Microbiología predictiva en tecnología de alimentos.....	10
1.3 Antimicrobianos naturales de plantas.....	12
<i>1.3.1 Aceites esenciales (AEs).....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.1.1 Eugenol.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.1.2 Cinnamaldehido.....</i>	<i>21</i>
<i>1.3.1.3 Vainillina.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.1.4 AE de canela.....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.1.5 AE de clavo.....</i>	<i>26</i>
<i>1.3.2 Efectos biológicos de los AEs.....</i>	<i>28</i>
<i>1.3.3 Modo de Acción.....</i>	<i>29</i>
<i>1.3.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en alimentos.....</i>	<i>32</i>
<i>1.3.5 Mezclas de aceites esenciales. Sinergismo y antagonismo.....</i>	<i>35</i>
<i>1.3.6 Métodos para evaluar la acción antimicrobiana de los AES.....</i>	<i>37</i>
<i>1.3.7 Métodos para determinar las combinaciones de antimicrobianos.....</i>	<i>43</i>
1.4 La leche pasteurizada.....	45
<i>1.4.1 Tecnologías emergentes en la conservación de la leche pasteurizada.....</i>	<i>45</i>
<i>1.4.2 Tratamientos térmicos.....</i>	<i>46</i>
<i>1.4.3 Envases.....</i>	<i>50</i>
<i>1.4.4 Bebidas lácteas funcionales.....</i>	<i>52</i>
1.5 Microorganismos patógenos de interés en la leche pasteurizada.....	55
<i>1.5.1 Listeria monocytogenes.....</i>	<i>55</i>
<i>1.5.2 E. coli O157:H7.....</i>	<i>60</i>

1.6 Determinación de la termoresistencia de los microorganismos.	65
1.6.1 <i>Métodos para estimar la destrucción microbiana.....</i>	65
1.6.2 <i>Termorresistómetro</i>	68
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
2.1 Materiales.....	71
2.1.1 <i>Equipos.....</i>	71
2.1.2 <i>Medios de cultivo.....</i>	72
2.1.3 <i>Leche.....</i>	73
2.1.4 <i>Antimicrobianos de origen vegetal (AEs).....</i>	73
2.1.4.1 <i>Soluciones madre</i>	73
2.1.5 <i>Microorganismos e Inóculos</i>	74
2.1.5.1 <i>Cepas microbianas.....</i>	74
2.1.5.2 <i>Preparación de inóculos</i>	75
2.1.6 <i>Reactivos.....</i>	75
2.2 Actividad de los antimicrobianos en Caldo Tripticasa de Soya.....	75
2.2.1 <i>Diseño experimental.....</i>	75
2.2.2 <i>Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y las Concentraciones No Inhibitorias basadas en el modelado de la Curva Dosis-Respuesta</i>	76
2.2.3 <i>Concentraciones Parcialmente Inhibitorias.....</i>	77
2.2.4 <i>Concentraciones Mínimas Bactericidas.....</i>	78
2.3 Actividad de las combinaciones de antimicrobianos en Caldo Tripticasa de Soya.	79
2.3.1 <i>Diseño experimental.....</i>	79
2.3.2 <i>Cálculo de las Concentraciones Inhibitorias Fraccionadas. Construcción de isobologramas</i>	80
2.4 Actividad de los antimicrobianos en leche pasterizada.....	82
2.4.1 <i>Diseño experimental.....</i>	82
2.4.2 <i>Concentraciones Mínimas Inhibitorias, Concentraciones Parcialmente Inhibitorias, Concentraciones Parcialmente Bactericidas y Concentraciones Mínimas Bactericidas.....</i>	83
2.4.3 <i>Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad antimicrobiana.....</i>	83

2.4.4	<i>Efecto de la concentración de grasa de la leche en la actividad antimicrobiana.....</i>	85
2.4.5	<i>Efecto de la actividad de las combinaciones de antimicrobianos en la leche.....</i>	85
2.5	Efecto del tratamiento térmico sobre <i>L. monocytogenes</i> en leche semidescremada suplementada con vainillina.	86
2.5.1	<i>Diseño experimental.....</i>	86
2.5.2	<i>Modelización de curvas de destrucción térmica.....</i>	87
2.5.3	<i>Distribución de frecuencias.....</i>	88
2.6	Análisis estadísticos.....	89
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
3.1	Actividad de los antimicrobianos en Caldo Trypticase de Soya.....	91
3.1.1	<i>Concentraciones Mínimas Inhibitorias.....</i>	105
3.1.2	<i>Concentraciones no Inhibitorias.....</i>	108
3.1.3	<i>Concentraciones Parcialmente Inhibitorias.....</i>	108
3.1.4	<i>Concentraciones Mínimas Bactericidas.....</i>	116
3.1.5	<i>Discusión.....</i>	118
3.1.6	<i>Concentraciones Inhibitorias Fraccionadas. Construcción de isobologramas.....</i>	128
3.1.7	<i>Discusión.....</i>	145
3.2	Actividad de los antimicrobianos en leche pasteurizada.	148
3.2.1	<i>Efecto de la temperatura de almacenamiento.....</i>	148
3.2.1.1	<i>Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Parcialmente Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida y Concentración Parcialmente Bactericida en leche almacenada a 35 °C.....</i>	148
3.2.1.2	<i>Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Parcialmente Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida y Concentración Parcialmente Bactericida en leche almacenada a 7 °C.....</i>	152
3.2.2	<i>Efecto de la concentración de grasa de la leche.....</i>	160
3.2.3	<i>Efecto de las combinaciones de antimicrobianos en leche semidescremada a 7 °C.....</i>	166
3.2.4	<i>Discusión.....</i>	171

3.3 Efecto del tratamiento térmico sobre <i>L. monocytogenes</i> en leche	
semidescremada suplementada con vainillina.	178
3.3.1 <i>Modelización de curvas de supervivencia.</i>	<i>178</i>
3.3.1.1 <i>Distribución de frecuencias.</i>	<i>184</i>
4 CONCLUSIONES	189
5 BIBLIOGRAFÍA	195

ABREVIATURAS

ABC	Area bajo la curva
ABS.....	Absorbancia
ADN.....	Acido Dexosiribonucleico
AF.....	Area Fraccionada
AP.....	Agua Peptonada
ATP.....	Adenosina Trifosfato
ATS.....	Agar Tripticasa de Soja
a_w	Actividad de agua
CMI.....	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB.....	Concentración Mínima Bactericida
CNI.....	Concentración No Inhibitoria
CLSI.....	Clinical and Laboratory Standars Institute
CPI.....	Concentración Parcialmente Inhibitoria
CFI.....	Concentración Fraccional Inhibitoria
CPB.....	Concentración Parcialmente Bactericida
CPSI.....	Center for Science in the Public Interest (Centro para la Ciencia de Interés Público)
CTS.....	Caldo Tripticasa de Soja
CDCP.....	Center for control of disease and prevention (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades)
CECT.....	Colección Española de Cultivos Tipo
DO.....	Densidad óptica
ECVT.....	<i>Esherichia coli</i> verotoxigenica
ECEH.....	<i>Escherichia coli</i> enterohemorragica
ECEP.....	<i>Escherichia coli</i> enteropatogena
ECEI.....	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EEUU.....	Estados Unidos
FDA.....	Food and Drug Administration
EFSA-ECDP.....	Autoridad para la Seguridad Alimentaria Europea–Centro Europeo para la Prevención de Enfermedades

GRAS.....	Generally Recognised as Safe
HC.....	Colitis Hemorrágica (Haemorrhagic Colitis)
HDPE.....	High Density Polietilene (Polietileno de Alta Densidad)
HTST.....	High Temperature Short Time
LT.....	Tiempo de Latencia (Lag Time)
MDP.....	Máxima Densidad de Población
NCCLS.....	National Commitee for Clinical Laboratory Standars
min.....	minutos
PCA.....	Plate Count Agar (medio con agar para recuento en placa)
pH.....	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno (expresada en moles)
R ²	Coefficiente de determinación
SERA.....	Salmonella enteritidies Risk Assesment
TG.....	Tiempo de Generación
TD	Tiempo de Deteccion
UFC.....	Unidades Formadoras de Colonias
UHT.....	Ultra High Temperature (Temperatura ultra alta de tratamiento)
μmax.....	Tasa máxima de crecimiento bacteriano
UP.....	Ultra Pasterizada
UP-ESL.....	Ultrapasteurizada de larga vida útil (Ultrapasteurized Extended shelf Life)
USDA.....	Departamento de Agricultura de Estados Unidos (United States Department of Agriculture)
VCE	Velocidad Crecimiento Exponencial
WHO.....	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de terpenos vegetales.....	17
Figura 2. Estructura química de terpenoides vegetales.....	18
Figura 3. Estructura química de fenilpropanoides vegetales.....	19
Figura 4. Estructura química de alicina y aliisotiocianato.....	20
Figura 5. Estructura química del eugenol.....	21
Figura 6. Estructura química del cinamaldehído.....	21
Figura 7. Flores y vainas de la vainillina.....	22
Figura 8. Estructura química de la vainillina.....	23
Figura 9. Corteza em rama de <i>C. ceylanicum</i>	25
Figura 10. Flores de canela de Ceylan.....	25
Figura 11. Flor de clavo.....	27
Figura 12. Clavos de olor.....	27
Figura 13. Mecanismos y sitios de acción en la célula bacteriana para los componentes de AEs.....	32
Figura 14. Nuevos envases y bebidas en el mercado lácteo.....	54
Figura 15. <i>Listeria monocytogenes</i>	55
Figura 16. <i>E. coli</i> O157:H7.....	60
Figura 17. Termorresistómetro usado en los estudios de inactivación térmica.....	72
Figura 18. Interpretación de un isoblogrrama.....	81
Figura 19. Curvas de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en CTS con AE de hojas de canela, a) pH7 y b) pH 6.....	92
Figura 20. Curvas de crecimiento de por <i>L. monocytogenes</i> Scott A en CTS con AE de clavo, a) pH 7 y b) pH 6.....	92
Figura 21. Curvas de crecimiento de por <i>L. monocytogenes</i> Scott A en CTS con AE de corteza de canela, a) pH 7 y b) pH 6.....	93
Figura 22. Curvas de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en CTS con eugenol, a) pH 7 y b) pH 6.....	93
Figura 23. Curvas de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> ScottA en CTS con cinamaldehído a) pH 7 y b) pH 6.	94
Figura 24. Curvas de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en CTS, con vainillina, a) pH 7 y b) pH6.	94
Figura 25. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en CTS con AE de hojas	95

de canela a) pH 7 y b) pH 6.	
Figura 26. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en CTS con AE de clavo	95
a) pH 7 y b) pH 6.	
Figura 27. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> en CTS con AE de hojas de canela	96
a) pH 7 y b) pH 6.....	
Figura 28. Curvas de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> ScottA en CTS con	96
eugenol a) pH 7 y b) pH 6.....	
Figura 29. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en CTS con cinamaldehido	97
a) pH 7 y b) pH6.....	
Figura 30. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en CTS con vainillina a)	97
pH 7 y b) pH 6.....	
Figura 31. Perfiles de Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en CTS a pH 7 y	100
6 con a)AE de hojas de canela, b)AE de clavo, c)AE de corteza de canela, d)	
eugenol, c) cinamaldehido y d) vainillina.....	
Figura 32. Perfiles de Inhibición de <i>E. coli</i> O157:H7 en CTS a pH 7 y 6 con	103
a)AE de hojas de canela b)AE de clavo, c)AE de corteza de canela, d) eugenol,	
c) cinamaldehido y d) vainillina.....	
Figura 33. Concentraciones Parcialmente Inhibitorias (CPIs) de <i>L.</i>	112
<i>monocytogenes</i> Scott A en CTS a pH 7 y 6 con a)AE de hojas de canela, b)AE	
de clavo, c) AE de corteza de canela, d) eugenol, c) cinamaldehido y d)	
vainillina.....	
Figura 34. Concentraciones Parcialmente Inhibitorias (CPIs) de <i>E. coli</i> O157:H7	115
en CTS a pH 7 y 6 con a)AE de hojas de canela, b) AE de clavo, c) AE de	
corteza de canela, d) eugenol, c) cinamaldehido y d) vainillina.....	
Figura 35. Isoblograma de las mezclas de eugenol y cinamaldehido frente a <i>L.</i>	129
<i>monocytogenes</i> ScottA en CTS.....	
Figura 36. Isoblograma de las mezclas de AEs de clavo y hojas de canela	131
frente a <i>L. monocytogenes</i>	
Figura 37. Isoblograma de las mezclas de AEs de clavo y hojas de canela y	132
frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	
Figura 38. Isoblograma de las mezclas de AEs de clavo y corteza de canela	134
frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	
Figura 39. Isoblograma de las mezclas de AEs de hojas de canela y corteza de	135

canela frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	
Figura 40. Isoblograma de las mezclas de AEs de clavo y corteza de canela frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	137
Figura 41. Isoblograma de las mezclas de vainillina y del AEs de clavo frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	138
Figura 42. Isoblograma de las mezclas de vainillina y del AE de hojas de canela frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	140
Figura 43. Isoblograma de las mezclas de vainillina y del AE de hojas de canela frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	141
Figura 44. Isoblograma de las mezclas de vainillina y del AE de hojas de canela frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	142
Figura 45. Isoblograma de las mezclas de vainillina y del AE de clavo frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	143
Figura 46. Isoblograma de las mezclas de vainillina y del AE de corteza de canela frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	144
Figura 47 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en leche semidescremada almacenada a 35 °C con los antimicrobianos: a) AE de corteza de canela, b) AE de hojas de canela, c) AE de clavo y d) vainillina.....	150
Figura 48. Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en leche semidescremada almacenada a 35 °C con los antimicrobianos: a) AE de corteza de canela, b) vainillina.....	152
Figura 49 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en leche semidescremada almacenada a 7 °C con los antimicrobianos: a) AE de corteza de canela, b) AE de hojas de canela, c) AE de clavo y d) vainillina.....	154
Figura 50. Comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en leche semidescremada almacenada a 7 °C con los antimicrobianos: a) AE de corteza de canela, b) AE de hojas de canela, c) AE de clavo y d) vainillina.....	157
Figura 51. Comportamiento en leche entera y semidescremada con AE de corteza de canela almacenada a 7 °C de a) <i>L. monocytogenes</i> Scott A y b) <i>E. coli</i> O157:H7.....	162
Figura 52. Comportamiento en leche entera y semidescremada con AE de hojas de canela almacenada a 7 °C a) <i>L. monocytogenes</i> Scott A y b) <i>E. coli</i> O157:H7.	163
Figura 53. Comportamiento en leche entera y semidescremada con AE de clavo	164

almacenada a 7 °C a) *L. monocytogenes* Scott A y b) *E. coli* O157:H7.....

Figura 54. Comportamiento en leche entera y semidescremada con vainillina **165**

almacenada a 7 °C a) *L. monocytogenes* Scott A y b) *E. coli* O157:H7.....

Figura 55. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en leche **168**

semidescremada almacenada a 7 °C con combinaciones de a) AEs de hojas de canela y de clavo, b) AE de hojas de canela y vainillina, c) AE de hojas de canela y vainillina y d) AE de hojas de canela y vainillina.....

Figura 56. Curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en leche semidescremada **170**

a 7 °C con combinaciones de a) AEs de corteza de canela y de clavo, b) AE de corteza y vainillina, c) AE de clavo y vainillina y d) AE de hojas de canela y vainillina.....

Figura 57. Ajuste del modelo Weibull a los datos de destrucción térmica de *L. monocytogenes* en leche semidescremada suplementada con vainillina. Los valores experimentales (puntos) y ajustados (líneas). a) 55 °C, b) 58 °C, c) 60 °C y d) 62 °C. [vainillina]: ■ 0 ppm, □ 900 ppm, ● 1400 ppm, ○ 1800 ppm.....

Figura 58. Sensibilidad de *L. monocytogenes* Scott A a los cambios de **183**

temperatura en leche semidescremada suplementada con vainillina.....

Figura 59. Distribución de resistencias correspondientes a las curvas de **187**

destrucción de *L. monocytogenes* Scott A en leche con diferentes concentraciones de vainillina y térmicamente tratadas, ajustadas con la función de la distribución acumulativa de Weibull. a) 55 °C, b) 58 °C, c) 60 °C y d) 62 °C.....

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios realizados sobre la actividad bacteriana de los AEs y componentes en los alimentos.....	33
Tabla 2. Principales brotes de listeriosis ocurridos a nivel mundial en los últimos años.....	59
Tabla 3. Brotes producidos por <i>E. coli</i> O157:H7 en productos lácteos.....	64
Tabla 4. CMI _s y CN _I s de diversos antimicrobianos frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	104
Tabla 5. CMI _s y CN _I s de diversos antimicrobianos frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	104
Tabla 6. CMB _s de diversos antimicrobianos frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A y <i>E. coli</i> O157:H7.....	105
Tabla 7. Tiempos de latencia y de generación (min) obtenidos para <i>L. monocytogenes</i> Scott A para determinadas CPI _s	115
Tabla 8. Tiempos de latencia y velocidad de generación (min) obtenidos para <i>E. coli</i> O157:H7 para determinadas CPI _s	116
Tabla 9. Concentraciones de cinamaldehído (cin) y eugenol (eu) ensayadas frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A, CMI _s de los compuestos individuales, CFI _s de las combinaciones e índice CFI _i de la mezcla.....	130
Tabla 10. Concentraciones de AEs de clavo (cl) y hojas de canela (hc) ensayadas frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A, CMI _s de los compuestos individuales, CFI _s de las combinaciones, e índice CFI _i de la mezcla.....	132
Tabla 11. Concentraciones de AEs de clavo (cl) y hojas de canela (hc) ensayadas frente a <i>E. coli</i> O157:H7, CMI _s de los compuestos individuales, CFI _s de las combinaciones e índice CFI _i de la mezcla.....	133
Tabla 12. Concentraciones de AEs de clavo y hojas de canela ensayadas en combinación frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A, CMI _s de los compuestos individuales, CFI _s de las combinaciones, e índice CFI _i de la mezcla.....	135
Tabla 13. Concentraciones de AEs de clavo y hojas de canela ensayadas en combinación frente a <i>E. coli</i> O157:H7, CMI _s de los compuestos individuales, CFI _s de las combinaciones, e índice CFI _i de la mezcla.....	137
Tabla 14. Concentraciones del AEs de clavo y vainillina ensayadas en	

combinación frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A, CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones, e índice CFI _i de la mezcla.....	139
Tabla 15. Concentraciones de AE de hojas de canela y vainillina ensayadas en combinación frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A. CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones, e índice CFI _i de la mezcla.....	140
Tabla 16. Concentraciones de AE de hojas de canela y vainillina ensayadas en combinación frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A. CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones, e índice CFI _i de la mezcla.....	141
Tabla 17. Concentraciones de AE de hojas de canela y vainillina ensayadas en combinación frente a <i>E. coli</i> O157:H7, CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones e índice CFI _i de la mezcla.....	142
Tabla 18. Concentraciones del AE de clavo y vainillina ensayados en combinación frente a <i>E. coli</i> O157:H7. CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones, e índice CFI _i de la mezcla.....	143
Tabla 19. Concentraciones del AE de hojas de canela y vainillina ensayados en combinación frente a <i>E. coli</i> O157:H7. CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones e índice CFI _i de la mezcla.....	144
Tabla 20. Concentraciones Parcialmentees Inhibitorias (CPIs), Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Concentraciones Parcialmentees Bactericidas (CPBs) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB) de AE de hojas de canela, AE de corteza de canela, AE de clavo y vainillina frente a <i>L. monocytogenes</i> ScottA en leche semidescremada incubada a 7 °C y 35 °C.....	158
Tabla 21. Concentraciones Parcialmentees inhibitorias (CPIs), Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Concentraciones Parcialmentees Bactericidas (CPBs) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB) de AE de hojas de canela, AE de corteza de canela, AE de clavo y vainillina frente a <i>E. coli</i> O157:H7 en leche semidescremada incubada a 7 °C y 35 °C.....	159
Tabla 22. Parámetros del modelo “Shoulder_log-linear” de Geerard y del modelo Weibull para las curvas de destrucción térmica de <i>L. monocytogenes</i> en leche semidescremada suplementada con vainillina y sometida a diferentes temperaturas de calentamiento.....	180

JUSTIFICACION DEL TRABAJO

La industria de la leche líquida ha llevado a cabo numerosos avances tecnológicos para competir con otras bebidas y mantener su cuota de mercado en los últimos 25 años. Los principales desarrollos se han dirigido principalmente al aumento de la capacidad de producción, mejora de la higiene y al desarrollo de nuevos productos. Actualmente las bebidas combinadas basadas en leche y zumos de frutas, leches suplementadas con ingredientes funcionales o con nuevos sabores y texturas en envases más convenientes para el consumidor son una muestra de las innovaciones del sector lácteo (Alegría y col., 2012; Salvia-Trujillo y col., 2011; Zulueta y col., 2007).

A pesar del profundo conocimiento acerca de los patógenos transmitidos por los alimentos y de los mecanismos involucrados en su transmisión, garantizar la seguridad de los productos lácteos y en particular de leche procesada para el consumo humano aún constituye un reto, debido en parte a la naturaleza cambiante de los patógenos y por lo tanto su control dentro de la cadena de producción y procesamiento (Olivier y col., 2009; Gsreddew y col., 2012). La leche cruda y en menor porcentaje la leche pasteurizada han sido vehículo de varios de los brotes transmitidos por los alimentos en los últimos años. Así por ejemplo desde 1998 hasta el 2010 se produjeron en Estados Unidos 86 brotes asociados al consumo de la leche cruda, con 1495 casos y 3 muertes y 9 brotes por leche pasteurizada con 2.200 casos y 3 muertes (CDCP, 2011).

La leche cruda es una fuente potencial de microorganismos patógenos, por lo que es reconocido que se requiere gran cuidado en su producción, distribución almacenamiento y preparación antes del consumo final, ya que la supervivencia de los microorganismos patógenos puede llegar a comprometer muy seriamente su inocuidad. Asimismo la estabilidad microbiológica, puede verse disminuida debido a la supervivencia y crecimiento de los microorganismos alterantes. *Listeria monocytogenes* ha llegado a significar en los últimos años un gran problema de seguridad alimentaria y ha sido causa de numerosos brotes por consumo de leche cruda y pasteurizada, debido a que es muy tolerante a condiciones ambientales adversas, crece a temperaturas de refrigeración y su dosis infectiva puede llegar a ser menor de 1000 células. *L. monocytogenes* se elimina a temperaturas de pasteurización, por lo que su presencia en la leche

pasteurizada se debe a la contaminación postproceso o a un inadecuado tratamiento térmico. El consumo de leche contaminada con *L. monocytogenes* puede representar un grave peligro para la salud, especialmente de las personas inmunocomprometidas por lo que la leche pasteurizada se encuentra entre los alimentos valorados con categoría de riesgo para este microorganismo (FDA/USDA, 2003)

E. coli O157: H7 constituye otro de los microorganismos que ha sido responsable de numerosos brotes atribuidos al consumo de productos lácteos y en particular a la leche cruda y pasteurizada. La ingesta de alimentos contaminados con este microorganismo puede producir colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y hasta la muerte (Feng y col., 2011). Este microorganismo puede llegar a la leche cruda por contaminación fecal de los animales pero es fácilmente eliminado por pasteurización, por lo que su presencia en leche pasteurizada se debe a contaminación postproceso (Hussein and Sakuma, 2005).

Las técnicas tradicionales de conservación de la leche actúan previniendo el crecimiento de los microorganismos (enfriamiento, envasado en atmósferas modificadas), restringiendo su acceso de los mismos a los alimentos (procesamiento y envasado aséptico) e inactivandolos (pasteurización, esterilización). Dependiendo de la intensidad del tratamiento térmico la leche puede ser pasteurizada en procesos HTST con vida útil de aproximadamente 10 días, y leche UHT (Ultra High Temperature) cuya distribución se puede realizar a temperatura ambiente y cuya vida útil es de varios meses. (Rysstad y Kolstad. 2006).

La necesidad de extender la vida útil de la leche pasteurizada, y al mismo tiempo evitar pérdidas de vitaminas, proteínas, disminuir reacciones de Maillard y mejorar la calidad sensorial de la leche UHT y que es causa de rechazo por parte de una sección de los consumidores ha dado lugar al desarrollo de leche ultra pasteurizada de larga vida útil (UP-ESL) que presentan una vida útil de alrededor de 4 semanas y al mismo tiempo unas características sensoriales similares a la leche pasteurizada. La tecnología de este tipo de producto está basada en tratamientos térmicos más suaves que las que se utilizan para la leche UHT, combinados con microfiltración y centrifugación, envasado aséptico en salas de llenado ultralimpias y almacenamiento en refrigeración (Rysstad y Kolstad, 2006).

En la actualidad la inactivación por calor tiende a ser sustituida, al menos parcialmente, por técnicas físicas menos drásticas como las altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos, campos eléctricos, microcentrifugación, ultrasonido. Muchas de estas tecnologías se están ensayando en combinación con antimicrobianos naturales, producidos por microorganismos como las bacteriocinas o con extractos naturales de plantas. Existen numerosos estudios que demuestran el potencial de los aceites esenciales de las plantas como conservantes naturales, teniendo en cuenta sus propiedades antivirales, antibacteriales, antitoxigenicas, antiparasiticas e insecticidas de muchos de ellos. (Burt, 2004; Backkali y col., 2008; Tajkarimi y col., 2010;). Sin embargo el factor mas importante que limita el uso de los aceites esenciales en la conservación de los alimento es que afectan al sabor y en general concentraciones ente 1-3% pueden causar cambios no deseados en las características organolépticas de los alimentos. Este problema se puede remediar por el uso de menos cantidad de AE al combinarlo con otros antimicrobianos o con otros métodos de conservación. Existen numerosas combinaciones de AEs de plantas que presentan efecto sinérgico y permiten obtener idénticos resultados con dosis más bajas que si se utilizaran los aceites por separado (Hyldgaard, 2012; Bassolé, 2012)

El desarrollo experimentado por las tecnologías de extracción, ha permitido identificar recientemente numerosos compuestos hallados en los aceites esenciales de especies y plantas aromáticas. Muchos de estos compuestos (fenóles, terpenoides, aldehídos) son capaces de controlar el desarrollo de diferentes microorganismos y al proceder de especias y plantas aromáticas empleadas habitualmente en la preparación de alimentos, se pueden considerar como aptos para el consumo humano. En la canela y el clavo, ya ampliamente usados en la industria alimentaria y de perfumeria por su aroma y sabor atractivo, se han encontrado en su mayor proporción aldehído cinámico y eugenol, compuestos estudiados recientemente por sus propiedades antimicrobianas (Kamatou, y col. 2012, Ooi y col., 2006., 2005 Smith-Palmer y col., 2001; Hsieh y col., 2001; Valero y col., 2003). La vainillina es también un aromatizante natural al cual se le han reconocido actividades antimicrobianas importantes (Fitzerrall y col., 2004; Fitzerrall y col., 2005).

La microbiología predictiva es un área dentro de la microbiología de alimentos, que estudia las respuestas de los microorganismos a los factores ambientales (físicos, químicos, competencia) a través de funciones matemáticas. Estas funciones predicen el comportamiento de los microorganismos patógenos y de deterioro bajo la combinación de diferentes factores. Numerosos modelos matemáticos y aproximaciones estadísticas se han usado para modelar el crecimiento y inactivación microbiana (Barbosa y col., 1994; Chabra y col., 2002; Geeraerd y col., 2004). Tradicionalmente la inactivación de microorganismos por calor y por procesos combinados (calor, pH y otros compuestos con capacidad antimicrobiana) se han descrito mediante cinéticas de primer orden, basándose en el modelo de Bibelow (Stumbo, 1973). Este modelo asume que una población de microorganismos sigue una cinética de inactivación logarítmica y en base a esta observación, se calcularon los parámetros D y Z, en los que se han basado los baremos de esterilización aplicados a estos alimentos durante las últimas décadas (Stumbo, 1973). Sin embargo la inactivación de los microorganismos no puede entenderse como una cinética de reacción de primer orden, sino como una distribución de frecuencias de sensibilidad o resistencia a factores adversos, entre ellos el tratamiento térmico, siendo posible de esta forma describir matemáticamente hombros o colas de inactivación, es decir individuos más resistentes al tratamiento aplicado que el resto de la población. Se han propuesto el uso de modelos estocásticos para estudiar el comportamiento de microorganismos individuales de una población frente a condiciones adversas, como contraposición a los modelos deterministas, que consideran a la población uniforme (Van Boekel, 2002). El uso de nuevos modelos que ajusten de forma más fielmente los datos de destrucción térmica obtenidos permitirán interpretar los resultados de una manera más real y adecuada para el producto.

OBJETIVOS

1 Objetivo principal

Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de canela y clavo y de los compuestos puros eugenol, cinamaldehido y vainillina sobre *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en CTS en leche de vaca pasteurizada.

2. Objetivos secundarios

- 2.1. Determinar la actividad de los antimicrobianos en CTS.
- 2.2 Determinar el efecto del pH sobre la actividad de los antimicrobianos en CTS.
- 2.3 Determinar el efecto de las combinaciones de antimicrobianos sobre su actividad en CTS.
- 2.3. Determinar la actividad de los antimicrobianos vegetales en leche de vaca pasteurizada.
- 2.4. Determinar el efecto de las combinaciones de antimicrobianos sobre su actividad en leche pateurizada.
- 2.5. Determinar el efecto de la temperatura y de la grasa de la leche sobre la actividad de los antimicrobianos.
- 2.6. Determinar el efecto de la adición de vainilla sobre la termorresistencia en leche de vaca pasteurizada de *L.monocytogenes* Scott A

1 INTRODUCCION

1.1 Tecnologías emergentes en la conservación de alimentos

La seguridad de los alimentos es un tema de gran preocupación a escala mundial debido a que las enfermedades transmitidas por los alimentos sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. De acuerdo a los datos registrados por la EFSA-ECDP (Autoridad para la Seguridad Alimentaria Europea–Centro Europeo para la Prevención de Enfermedades) en Europa se produjeron en 2.012 un total de 5.648 brotes, con 69.553 casos, 7.125 hospitalizaciones y 93 muertes. En Estados Unidos (EEUU), de acuerdo al CDCP (Center of Disease and Prevention Control), se registran aproximadamente cada año alrededor de 48 millones de casos, 128.000 hospitalizaciones y 3.000 muertos. Concretamente en el 2.012, se produjeron un total de 19.531 infecciones, 4.563 hospitalizaciones y 68 muertes asociadas con consumo de alimentos contaminados (CDCP, 2011a), valores que comparados con el periodo 2006-2008 permanecen sin tendencia a la baja y en algunos casos en incremento (CDCP, 2011b). Entre los factores que contribuyen a este hecho destaca el aumento de la demanda de productos frescos, lo más parecidos al natural posible y de alimentos listos para el consumo, que son procesados generalmente con tratamientos térmicos más suaves pero a la vez presentan mayor facilidad para el crecimiento microbiano. También constituye un factor de riesgo importante y el incremento del comercio internacional que facilita que los productos procesados en una parte del mundo se consuman en otra lo cual demanda alimentos de mayor vida útil. Esto unido a la aparición de patógenos emergentes y reemergentes y al aumento de la resistencia bacteriana hace que la conservación de los alimentos sea en la actualidad un reto constante para la industria alimentaria (Cheftel, 2011)

La tecnología de obstáculos o barreras, en la cual se usan combinaciones de varios factores (pH, temperatura, a_w , aditivos) para garantizar la estabilidad microbiológica y sensorial de los alimentos es la base del procesamiento de muchos de los alimentos que se consumen en la actualidad. La base de esta tecnología consiste en la posibilidad de usar sinérgicamente obstáculos que presenten diferente dianas moleculares dentro de la célula microbiana, y destruyan la homeostasis metabólica más

efectiva. El efecto que se logra en la conservación de alimentos por la acción combinada de los llamados obstáculos fue introducida por Leisteer en 1978 y ha sido universalmente reconocida y utilizada para ilustrar las combinaciones complejas que se producen en los alimentos. El resultado final no es necesariamente una secuencia de efectos, sino que el concepto bien entendido incluye una combinación de técnicas de conservación que abarcan efectos secuenciales y también paralelos. Este efecto de obstáculo sirve no sólo para mejorar la inocuidad del alimento sino también para mejorar su calidad sensorial y nutricional, en definitiva la calidad total, al disminuir la intensidad de los tratamientos aplicados. Así por ejemplo, los productos mínimamente procesados dentro de los cuales se pueden ver cada vez un número y variedad mayor en el mercado, utilizan nuevas técnicas de envase y de procesamiento basadas en esta tecnología, y están en su mayor parte especialmente diseñadas para aumentar la vida útil por periodos prolongados de tiempo con la mínima pérdida de propiedades sensoriales y nutritivas (Leistner, 2000). Por ejemplo, muchos de estos alimentos se procesan mediante tratamiento térmicos suaves y se mantienen a temperaturas de refrigeración, para garantizar su conservación.

Entre las tecnologías emergentes que emplean tratamientos térmicos más suaves se encuentra el calentamiento ohmico, que consiste en hacer pasar una corriente eléctrica a través del alimento con una alta resistencia a la conductividad, las ondas de radiofrecuencia y/o microondas, que producen oscilaciones muy rápidas de moléculas de agua que producen fricción y en consecuencia calor, DIC o descompresión instantánea controlada, tecnología mediante la cual los microorganismos son eliminados por procedimientos térmicos y mecánicos, y por último por rayos infrarrojos (Hugas y col., 2000). Entre las tecnologías no térmicas se encuentran los pulsos eléctricos, las altas presiones o el ultrasonido (Pereira y Vicente, 2010). La aplicación de nuevos tratamientos térmicos más suaves o no térmicos, solos o en combinación con antimicrobianos, supone una alternativa para la conservación de los alimentos y constituye una de las áreas de mayor desarrollo en los últimos años, con las que se pretende sustituir al menos Parcialmente los tratamientos térmicos convencionales.

El excesivo uso de los conservantes de síntesis química, muchos de los cuales son sospechosos por su potencial carcinogénico o por su toxicidad residual, ha generado mucha presión sobre los productores de alimentos para eliminarlos completamente de

sus productos ha llevado a adoptar alternativas que el consumidor entienda como naturales. Esto último unido a que existe la necesidad de reducir el uso de antibióticos, disminuir al mismo tiempo la resistencia a los mismos, y reforzar el sistema inmune en los humanos hace que los retos en la industria de los alimentos sea cada vez más grande y que los antimicrobianos naturales estén siendo cada vez más estudiados, recibiendo gran atención por parte de los investigadores.

En particular, la industria de bebidas pasteurizadas (leche, zumos de frutas, derivados lácteos) está actualmente desarrollando nuevas tecnologías para la elaboración de productos basadas en procesamientos no térmicos o en tratamientos térmicos menos drásticos para evitar pérdidas de vitaminas, proteínas, disminuir reacciones de Maillard y mejorar su calidad sensorial (Vassanta y Yu, 2012; Caminitti y col., 2011; Belletti y col., 2010; Corbo y col., 2009). Es reconocido que estos productos requieren gran cuidado en su producción, distribución almacenamiento y preparación antes del consumo final, ya que la supervivencia de los microorganismos patógenos puede llegar a comprometer muy seriamente su inocuidad. Asimismo la estabilidad microbiológica, puede verse disminuida debido a la supervivencia y crecimiento de los microorganismos alterantes.

Por este motivo en los últimos años las investigaciones se han dirigido fundamentalmente al estudio de combinaciones de tecnologías menos drásticas con antimicrobianos naturales, por ejemplo Mosqueda-Melgar y col., 2008 demostraron que el uso combinado de aceite de hojas de canela y pulsos eléctricos ejercen un efecto sinérgico y aditivo en zumos de frutas frente a *Salmonella enteritidis* o *E. coli* O157:H7. Knight y McKellar, 2007 encontraron que aceites esenciales como la canela y el clavo en combinación con tratamientos térmicos suaves disminuyeron en 5 ciclos logarítmicos el valor D en *Escherichia coli* O157:H7 en sidra de manzana. El uso combinado de ácido cítrico o de AE de corteza de canela, seguido de un tratamiento de alta intensidad en campos eléctricos, consiguió la pasteurización en zumo de tomate. Zhao y Source, 2008, encontraron que el empleo de aceites esenciales en zumo de fresa unido a un proceso de congelación y descongelación tenía efecto antimicrobiano *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica*. Char y col. (2009) y Char y col.(2010) consiguieron exitosamente disminuir la población de *L. innocua* en zumo naranja mediante la combinación de tratamientos térmicos suaves y la adicción de vainillina y citral

respectivamente. Martin-Diana y col., (2009) estudiaron el efecto antimicrobiano y antioxidante del chitosano incorporado en zumo de naranja para extender la vida útil como una alternativa a la pasteurización.

1.2 Microbiología predictiva en tecnología de alimentos

La microbiología predictiva es un área dentro de la microbiología de alimentos, que estudia las respuestas de los microorganismos a los factores ambientales (físicos, químicos, competencia) a través de funciones matemáticas. Estas funciones permiten a los investigadores predecir el comportamiento de los microorganismos patógenos y de deterioro bajo la combinación de diferentes factores.

Los modelos predictivos permiten:

- ❑ Predecir la seguridad de los alimentos ya que permiten estimar el riesgo de crecimiento o supervivencia de los microorganismos patógenos durante el transporte y almacenamiento de los alimentos,
- ❑ Identificar puntos críticos en los procesos de producción y distribución e informar sobre como las variables ambientales afectan el comportamiento de los microorganismos patógenos y de deterioro en los alimentos, ayudando al desarrollo de sistemas HACCP,
- ❑ Desarrollar nuevos productos, ya que permite evaluar rápidamente las consecuencias que tienen los cambios en la composición y en el procesado de los alimentos,
- ❑ Realizar estudios de vida útil,
- ❑ Diseñar eficientemente los experimentos,

Los modelos usados en microbiología predictiva se desarrollan a partir de trabajos experimentales usualmente realizados en un medio de laboratorio y los datos obtenidos se extrapolan a los alimentos. Fundamentalmente se basan en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de los microorganismos a factores ambientales son reproducibles y que es posible por observaciones del pasado predecir las respuestas de los microorganismos en otros ambientes similares.

La aplicación de modelos matemáticos se realiza en dos etapas principales:

- 1- Modelado de la curva de crecimiento del microorganismo
- 2- Descripción de la variación de los distintos parámetros que afectan dicha curva.

Estas curvas se ajustan y sus parámetros se derivan usando programas informáticos. En los últimos años debido al gran avance de la informática y al desarrollo de sofisticados paquetes estadísticos se han logrado bastantes avances. Existen bases de datos formuladas para almacenar datos crudos y modelos de los cuales la información puede ser obtenida y usada para interpretar el efecto del procesamiento y transporte sobre el crecimiento microbiano y permite tomar decisiones sobre la calidad de los alimentos (Fakruddin y col., 2011).

Los modelos se pueden clasificar de múltiples formas, si se toman en cuenta las variables consideradas los modelos microbiológicos se pueden clasificar en tres niveles:

1. Modelos de nivel primario. En este se describen cambios en el número de microorganismos con el tiempo (crecimiento, supervivencia, inactivación). Los modelos se pueden cuantificar por ejemplo en UFC/ml, formación de toxinas, productos metabólicos, absorbancia o impedancia (Geeraerd y col., 2004). Ejemplos de estos modelos son la ecuación de Gompertz, la ecuación exponencial y el modelo logístico. Muchos de los modelos primarios desarrollados hasta ahora son modelos deterministas de población. En estos modelos la evolución del número total de células es descrita a través de un sencillo conjunto de parámetros (máxima densidad poblacional, velocidad de crecimiento específica, fase de latencia) (Swinnen y col., 2004). El de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el crecimiento microbiano bajo diversas combinaciones de factores (Buchanan, 1992). El modelo de Gompertz se considera la ecuación primaria más ampliamente utilizada para describir el crecimiento microbiano en alimentos bajo condiciones ambientales controladas y definidas. Esta función está basada en una relación exponencial entre la velocidad de crecimiento específico y la densidad de población. A partir de este modelo se pueden desarrollar modelos secundarios.
2. La inactivación térmica de primer orden es otro ejemplo de modelo primario.

3. Modelos de nivel secundario: describen las respuestas de parámetros del modelo primario al cambiar determinadas condiciones de desarrollo tales como temperatura, pH o a_w . Ejemplo: ecuación de Arrhenius, modelo de la raíz cuadrada
4. Modelos de nivel terciario: corresponden a software que transforman los modelos de nivel primario y terciario en programas más confiables. Estos permiten calcular la respuesta de los microorganismos en las distintas condiciones, comparar los efectos de dichas condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos. Estos modelos pueden tener varias formas, por ejemplo combinar los dos primeros niveles de modelos basados en experimentos de laboratorio, como el “Programa para el modelado de patógenos” o “Pathogen Modeling Program”, creado y puesto a disposición de la comunidad científica gratuitamente por la USDA; versiones que incluyen la posibilidad de importar una historia de temperatura para predecir la vida útil restante con respecto a un organismo deteriorador específico, como es el caso del modelo de Predicción de Deterioro de Alimentos Marinos (“Seafood Spoilage Predictor”) o llegando a la incorporación de modelos predictivos en una red de evaluación de riesgos microbiológicos, como por ejemplo el SERA (Salmonella enteritidis Risk Assessment) de la USDA (dos Santos, 2007)

1.3 Antimicrobianos naturales de plantas

Los antimicrobianos se usan en los alimentos para controlar los procesos naturales de deterioro, y prevenir y controlar el crecimiento de los microorganismos, incluyendo los microorganismos patógenos. El deterioro puede ocurrir desde los alimentos crudos hasta el procesamiento y la distribución y las fuentes de deterioro pueden ser químicas, físicas y biológicas. La tendencia del consumidor hacia productos con más bajo contenido de sal y azúcar ha incrementado la necesidad para usar conservantes más eficientes, ya que la vida útil del alimento tiende a disminuir. Los antimicrobianos naturales están siendo considerados como una alternativa a los aditivos químicos, asociados cada vez más con consecuencias negativas para la salud, como carcinogenicidad, teratogenicidad, toxicidad y problemas medioambientales relacionados con sus amplios periodos de degradación (Vuuren y Vijoen, 2011; Tiwari y col 2009; Hyldgaard y col., 2012). A este problema se une el alarmante incremento de

la resistencia a los antibióticos entre los patógenos bacterianos, emergentes y reemergentes. La posibilidad de reducir el uso de antibióticos y al mismo tiempo disminuir la resistencia a los mismos o reforzar el sistema inmune en los humanos son otro de los beneficios de los antimicrobianos naturales (Warnke y col., 2009; Mulyaningsih y col., 2010)

Los aditivos se clasifican en químicos o sintéticos y los naturales. Los aditivos químicos son aquellas sustancias químicas de síntesis que se utilizan en pequeñas cantidades en los alimentos y cuya aplicación está permitida en la normativa vigente. En Estados Unidos el uso de aditivos químicos está regulado por la “Food and Drug Administration” y en otros países por las correspondientes autoridades. La FAO (Food and Agriculture Organization) y OMS (Organización Mundial de la Salud) vigilan por el correcto uso y la seguridad de los aditivos químicos, así como recomiendan las dosis adecuadas diarias o Average Daily Intake (ADI). En Europa los aditivos deben ser autorizados por la EFSA y cumplir los requisitos de pureza establecidos en la regulación EU 231/2012. En esta categoría se incluyen los ácidos orgánicos y sus sales (propiónico, sórbico, benzoico), nitritos y nitratos sulfitos y sulfatos. Los antimicrobianos naturales son sustancias obtenidas a partir de microorganismos, plantas y animales y cuya inocuidad se atribuye a que son degradados por el organismo (Tajkarimi y col., 2012). Las condiciones para que un aditivo químico se apruebe son muy exigentes por eso en los últimos años se ha buscado nuevos conservantes naturales que ya se usan en la industria alimentaria con otros fines pero que son generalmente clasificados y reconocidos por la FDA como GRAS (Generally Recognised as Safe). Estos componentes naturales se pueden agrupar en conservantes de origen animal, vegetal o microbiano. Estos últimos han sido investigados ampliamente en los últimos 20 años (Lopez-Malo Vigil y col., 2005).

Las plantas aromáticas y las especias han contribuido desde hace siglos a mantener la salud, la higiene y la calidad de vida de muchos países tales como India y Brasil. En particular los aceites esenciales se han usado ampliamente por sus aplicaciones bactericidas, viricidas, fungicidas, antiparasitarias, insecticidas, medicinales y cosméticas, en las industrias farmacéuticas, sanitarias, cosméticas, agrícolas y alimentarias. Los egipcios usaban extractos de plantas (especies y aceites) como antimicrobianos para la conservación de los alimentos así como para embalsamar a sus difuntos, sin embargo aunque las antiguas civilizaciones reconocían el potencial

antimicrobiano de muchos extractos de plantas, no fue hasta el siglo XVIII que se empezaron a estudiar científicamente (Lopez-Malo Vigil. y col., 2005). Las plantas son capaces de sintetizar sustancias aromáticas, la mayoría metabolitos secundarios, de los cuales se han aislado al menos 12.000 compuestos, número que se estima sea menos del 10 % del total.

Estos compuestos incluyen glucósidos, saponinas, taninos, alcaloides, terpenoides, ácidos orgánicos y otros sirven como mecanismo de defensa de las plantas frente a los depredadores como son los microorganismos, insectos y herbívoros o frente a la exposición de rayos UV-B (Wink, M y Schimmer, 2010). Algunos como los terpenoides son responsables del olor de las plantas, otros como los taninos y las quinonas son responsables de los pigmentos de color, otros son responsables del sabor y aroma y otros son usados por sus efectos medicinales (Tajarini y col., 2010). Algunos metabolitos están también involucrados en los mecanismos de defensa Durante siglos han sido reconocidos como agentes conservantes en los alimentos, al mismo tiempo que contribuían a mejorar su sabor y el olor. La mayoría de las especies de plantas aromáticas provienen de oriente, siendo ampliamente utilizada en China e India; Algunas de las especies, tales como clavo, canela, mostaza, ajo, jengibre y menta son aún aplicadas como terapias medicinales alternativas en la India y otras fueron introducidas en Occidente después del descubrimiento del Nuevo Mundo, en este grupo podemos citar - tales los diversos tipos de pimientos, pimienta de jamaica, onoto, chocolate, epazote, sassafras, y vainilla, los cuales han sido usados como agentes aromatizante y saborizantes.

El primer estudio científico que demostró la potenciabilidad de las especies como antimicrobianos se remonta al siglo 1880 donde se comprobó que la canela tenía actividad antimicrobiana frente a las esporas de la bacteria causante del ántrax. Más aún el clavo se ha usado como conservante en carnes, siropes, salsas y embutidos. En 1910 se demostró que la canela y la mostaza se utilizaban para conservar las salsas, pero es actualmente cuando se está considerando que poseen un gran potencial como aditivos naturales en la conservación de los alimentos. En los últimos años se ha demostrado científicamente el efecto conservante a otras muchas especies (Burt, 2004; Ceylan y Fung, 2004; Gutierrez y col., 2008; Skeinjar y Nemet, 2009; Vijai y Srivastava, 2007; Hyldgaard y col., 2012).

Muchas de estas plantas y sus extractos se han usado también en la medicina tradicional de muchos países y aún en la actualidad en muchos países la salud esta basada en la medicina que proviene de las plantas. Además de sus efectos beneficiosos en el aspecto sensorial, algunas especies y hierbas tienen efectos antimicrobianos en plantas y patógenos humanos, por su capacidad para inhibir directa o indirectamente los sistemas enzimáticos de las bacterias, resultando en efectos bacteriostáticos y bactericidas. Sin embargo las investigaciones científicas sobre estos aspectos se han empezado a hacer recientemente.

Dentro de los compuestos antimicrobianos procedentes de plantas un particular interés se han enfocado sobre los aceites esenciales (AEs) y sus componentes, debido a que se ha encontrado que presentan actividad antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos, incluyendo los patógenos y los responsables de deterioro (Burt, 2004, Tajkarimi y col., 2010, Skrinjar y Nemet, 2012). Estudios *in vitro* también han demostrados sus propiedades antioxidantes, debido a su capacidad de secuestro de radicales libres (Brenes y Roura, 2010) y antimutagénicas (Bakkali y col., 2008)

1.3.1 Aceites esenciales (AEs)

Los aceites esenciales (AEs) son sustancias, volátiles, de carácter lipofílico y de fuertes propiedades aromáticas, sintetizadas como metabolitos secundarios de las plantas, que se encuentran comúnmente en la fracción oleosa de las hojas (romero, salvia, laurel, orégano, tomillo, y mejorana), flores o brotes (clavo), bulbos (ajo y cebolla), semillas (comino) y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o trichomas glandulares para su posterior secreción. Son reconocidos por la FDA como GRAS, (Tiwari y col., 2009). En la naturaleza los AEs desempeñan un papel muy importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra los herbívoros por reducir el apetito por tales plantas. Están siempre presentes permanentemente o se producen esporádicamente como respuesta a una agresión externa. También pueden atraer algunos insectos al favorecer la dispersión del polen y las semillas o repeler otros indeseables. Una extensa revisión sobre las diferentes propiedades de los aceites ha sido

llevada a cabo por diferentes autores (Burt, 2004; Bsassole y col., 2012; Bakkali y col., 2008).

Los AEs se usan desde la antigüedad por sus propiedades antisépticas y antimicrobianas como conservantes y aromatizantes. En la actualidad los AEs presentan reconocidas aplicaciones en la industria farmacéutica y odontológica (principios activos y saborizantes), cosmética (perfumes y aromas) y agroalimentaria (saborizantes y aromatizantes). Se ha demostrado que los AEs son efectivos frente a una gran variedad de microorganismos incluyendo las bacterias y mohos. La actividad antimicrobiana depende del tipo, composición y concentración del aceite esencial, del método de procesamiento y las condiciones de almacenamiento, el tipo y concentración del microorganismo diana y la composición del sustrato (Demuner y col, 2010; Paibon y col., 2011).

Los aceites esenciales son mezclas de numerosos compuestos orgánicos de bajo peso molecular y presión de vapor lo suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente, la mayoría formadas por más de 45 componentes, por lo que son difíciles de identificar. Los principales componentes están alrededor de un 85% y otros componentes minoritarios se encuentran en niveles trazas. Normalmente sus propiedades se atribuyen a dos o tres componentes mayoritarios, que son los que determinan la actividad biológica de los mismos (Pichersky y col., 2006) La composición química depende las condiciones climáticas, estacionales y geográficas, periodo de cosecha y técnicas de destilación.

Composición química

Los aceites esenciales se clasifican en cuatro grupos dependiendo de su estructura química: terpenos, terpenoides, fenilpropenos y otros (Hyldgaard y col., 2012):

Terpenos Los terpenos son hidrocarburos producidos por la combinación de numerosas cadenas de isopreno (C_5H_8). Los terpenos se sintetizan en el citoplasma de las células de las plantas y la síntesis procede del acetyl- coenzima A. Los principales terpenos son monoterpenos y sesquiterpenos. Los AEs están formados en su mayoría por monoterpenos (C_{10}), Los sesquiterpenos están formados por la unión de tres unidades de isopreno. Este grupo comprende compuestos que no presentan una actividad metabólica significativa: p-cimeno, limoneno, terpineno, sabineno y pineno.

Entre las plantas que contienen estos compuestos se encuentran bergamota, alcaravea, apio, eucalipto, lavanda, menta, naranja, mandarina, pimienta, pinio, romero, lavanda, limón y tomillo.

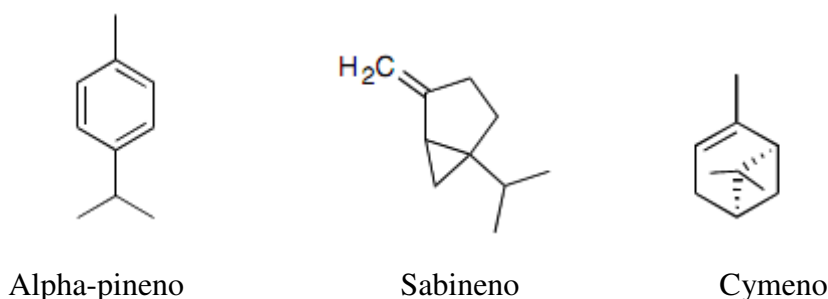


Figura 1. Estructura química de terpenos vegetales

Terpenoides. Son terpenos que sufren modificaciones bioquímicas vía enzimática que añaden moléculas de oxígeno y mueven grupos metilo. Los terpenoides se subdividen en alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, éteres, fenoles y epóxidos. Ejemplos de terpenoides son el timol, carvacrol, linalool, linalylacetato, citronellas, piperitone, mentol y geraniol. La actividad antimicrobiana de la mayoría de los terpenoides está ligada a sus grupos funcionales y se ha demostrado que el grupo hidroxilo de los terpenoides fenólicos y la presencia de electrones deslocalizados son importantes para la actividad microbiana (Ultee y col., 2002; Ben Arfa y col. 2006; Wen y col., 2003). Se ha demostrado que los terpenoides son activos frente a un numeroso grupo de microorganismos, entre los que se encuentran *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* y *Pseudomonas aureginosa*, *Salmonella enterica* (Dorman y Deans, 2000; Basolé y col., 2010; La storia y col., 2011)

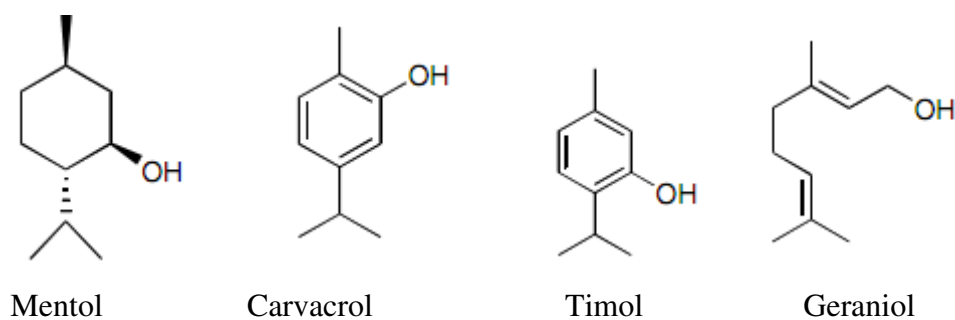


Figura 2. Estructura química de tepenoides vegetales

Fenilpropanoides. Constituyen una subfamilia formada por varios grupos de compuestos orgánicos llamados fenilpropanoides que son sintetizados en plantas a partir del aminoácido fenilalanina. Los fenilpropanoides toman su nombre del grupo fenol y del grupo propeno de tres carbonos producidos en el primer paso de la biosíntesis de los fenilpropanoides. Los fenilpropenos constituyen una parte relativamente pequeño de los aceites esenciales y aquellos que han sido más activamente estudiados son el eugenol, isoeugenol, vainillina, y cinamaldehido. La actividad antimicrobiana de este grupo se debe principalmente a los grupos hidroxilo así como el tipo y el número de sustituyentes del anillos aromático (Pauli y Kubeczka, 2010). Existen numerosos estudios donde se demuestra la actividad antimicrobiana de los fenilpropenos frente a bacterias Gram + y Gram - , así como frente a mohos y levaduras (Gill y Holey 2006; Fitzgerald y col., 2003, 2004 y 2005; Rupasinghe y col., 2006; Di Pascua y col, 2007; Bouhdid y col., 2010).

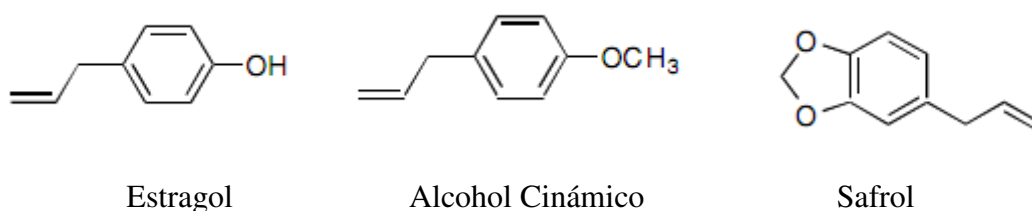


Figura 3. Estructura química de algunos fenilpropanoides vegetales

Otros. Se incluye aquí un grupo que contienen un número de diferentes productos de degradación originados de ácidos grasos insaturados, lactonas, terpenos, glycosidos y compuestos que contienen sulfuro y nitrógeno. Dos ejemplos los encontramos en los compuestos alicina y allil isotiocyanato. Se ha demostrado ampliamente el efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram+ y Gram – (Nielsen y Rios, 2000; Kyung y col., 2011).

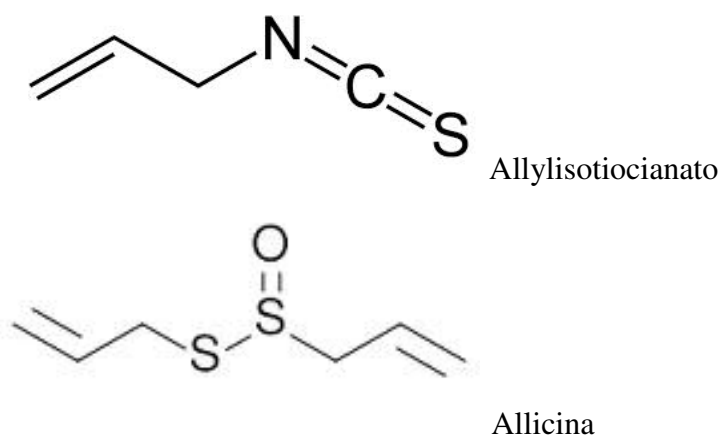


Figura 4. Estructura química de alicina y alil isotiocianato

Métodos de extracción

El uso de aceites esenciales se remonta a tiempos bíblicos, con las tecnologías de extracción que existían en el antiguo Egipto, India y Persia hace más de 2000 años y que fueron mejoradas por los arábigos en el siglo IX (Bauer y col., 2001). El primer manuscrito que define la destilación como método de obtención de un AE fue escrito por Arnaldo de Villanova (ca 1235-1311), quien especificó detalladamente el proceso de destilación del aceite de trementina, pero su uso no se extiende en Europa hasta el siglo XVI. En la actualidad estos extractos pueden ser obtenidos de las plantas por varios métodos como destilación con agua o hidrodestilación, al vapor directo o al vacío (Vargas y Bottia, 2008). Existen otros métodos alternativos, como la extracción por solventes, por prensado o con fluidos supercríticos.

Los antimicrobianos que tienen su origen en plantas se producen comúnmente por destilación al vapor y por hidrodestilación o por ambos métodos cuando se necesita conservar las propiedades antimicrobianas o fungicidas, si el uso va a ser para perfumería se prefieren métodos alternativos tales como la extracción por fluidos supercríticos que proveen mayor solubilidad y mejora la tasa de transferencia de masas. Mas aún la manipulación de parámetros tales como la temperatura y la presión conducen a la extracción de los diferentes componentes, cuando uno en particular es

requerido, La bioingeniería de los componentes de los aceites esenciales también provee de más productos comercialmente disponibles (Burt, 2004).

1.3.1.1 Eugenol

El eugenol (4-allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene) es el principal componente químico del aceite de clavo, pertenece al grupo de los phenilpropenos y se caracteriza por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos.

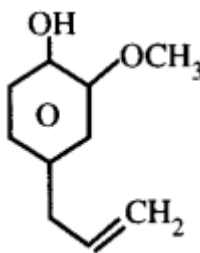


Figura 5. Estructura química del eugenol

El eugenol ha sido por largo tiempo reconocido por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (Yogalakshimi y col., 2010; Leem y col., 2011; Bachiega y col., 2012) y se ha usado como parte de cemento dental, rellenedor y material restaurativo y como facilitador en la piel de otros productos (Park y col., 2011). Es una molécula muy versátil que ha encontrado aplicación en agricultura, farmacia, cosmética y otras, reconocida como Grass por la FDA. Es ampliamente usado en agricultura para proteger los alimentos de los microorganismos durante el almacenamiento y podría tener un efecto importante en la salud humana como pesticida y fumigante alternativo. Se han reconocido sus propiedades bacteriales contra patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 (Pei y col., 2009; Oyodemi y col., 2009), *Listeria monocytogenes* (Blaszyk y Holley, 1998; Gaysinsky y col., 2007), *Campylobacter jejuni*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sakei* and *Helicobacter pylori* (Friedman y col., 2002; Wals y col., 2003; Ali y col., 2005), *E. fecalis*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aureginosa*, *S. typhimurium* y *M. luteus*, *B. subtilis* y *P. vulgaris* (Fu y col., 2007), (Devi y col., 2010; Ann y col., 2012). También se le ha reconocido su acción fungicida (Campaniello y col., 2010).

1.3.1.2 Cinnamaldehido

El cinamaldehido fue aislado por primera vez del AE de hojas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en 1834 por Bumaz y Peligot. El producto natural es el trans-cinamaldehido, cuya molécula consiste en un grupo fenol unido a un aldehído insaturado, clasificado como GRAS (generally regarded as safe) por la FDA y su uso está aprobado en los alimentos (21 CFR 182.60).

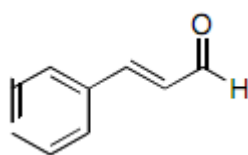


Figura 6 Estructura química del cinamaldehido

La aplicación más obvia del cinamaldehido es como agente saborizante en chicles, helados y bebidas a unos niveles entre 9 y 4.900 ppm. Al cinamaldehido se le atribuyen propiedades antimutágenas (Shaughnessy y col, 2006), antioxidantes (Ali y col., 2005), anticancerígenas (Cabello y col., 2008) antifúngicas y antimicrobianas (Ooi y col., 2006). Así se ha demostrado que es capaz de inhibir el crecimiento de *Cronobacter sakasalii* en películas comestibles usadas en fórmulas infantiles y alimentos similares (Ali y col., 2005; Raybaudi-Massilia y col., 2008). También se ha demostrado que inhibe el crecimiento de bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *E. coli* O157:H7 (Viazis y col., 2010), inclusive inhibiendo la formación de biofilms (Matos de Oliveira y col., 2012).

1.3.1.3 Vainillina

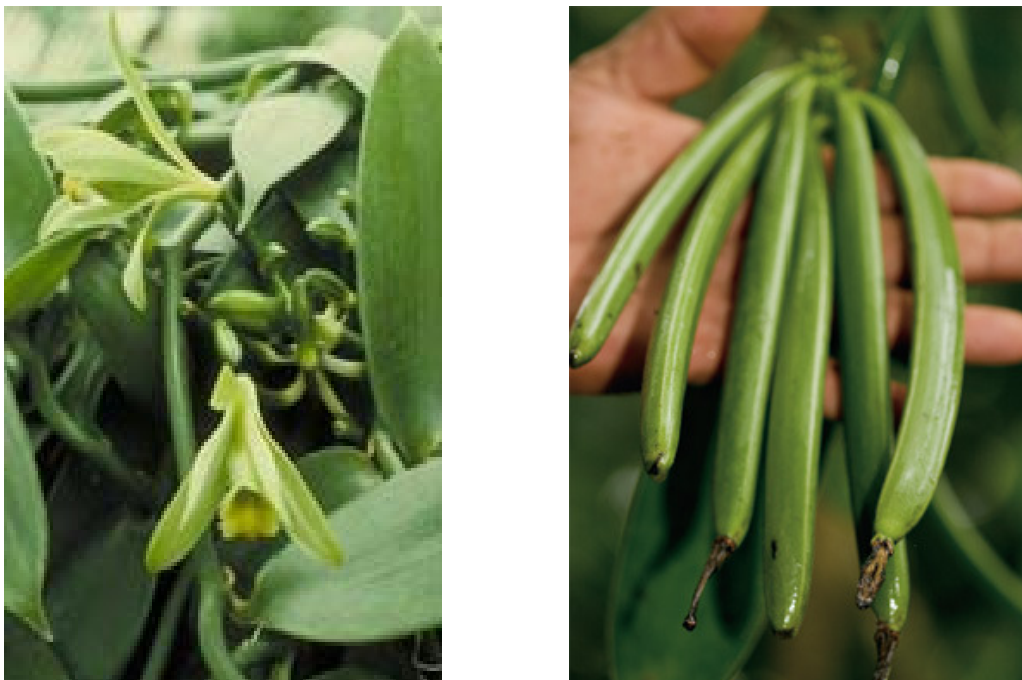


Figura 7. Flores y vainas de la vainilla

La vainillina (4-hidroxi-3-methoxibenzaldehido) es un compuesto cristalino de color blanco soluble en cloroformo y eter, principal componente phytoquímico presente en la parte oleosa de la vainillina natural y uno de los agentes responsable del aroma y sabor mas ampliamente usado en todo el mundo. Su estructura es similar al eugenol (2-methoxy-4-2-2-propenyl phenol) de los clavos (Fitzgerald y col., 2005).

Los aztecas de México cultivaban la vainilla, la cual fue traída a Europa por los españoles después de 1.520, y es ahora cultivada en un amplio numero de países tropicales, siendo los principales productores México, Madagascar, Tahití e Indonesia. El principal compuesto de la vainilla, la vainillina, se encuentra también en pequeñas trazas en otras plantas, incluyendo productos comerciales tales como el tabaco, sin embargo las semillas de la planta *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona* o *Vanilla tahitensis* aún permanece como la única fuente comercial natural de la vainillina. El extracto de vainilla natural es una mezcla de cientos de compuestos diferentes que

acompañan a la vainillina. La vainillina artificial es producida sintéticamente a partir del eugenol, la lignina o el guayacol, debido en parte a la escasez y lo caro que resulta el uso de vainillina natural. Aunque más de 12.000 toneladas de vainillina se producen cada año, menos del uno por ciento es vainillina natural de vainillina, el resto se sintetiza vía química a partir del eugenol, lignina o guaiacol, de un modo más económico (Ramachandra y col., 2000). El valor de la vainillina extraída de las semillas se calcula entre 1.200 y 4.000 dólares por kg en contraste con el precio de la vainillina sintética <15 dólares el kilo. La vainillina sintética se usa en alimentos y en preparaciones no alimenticias, en fragancias y como aromatizante en preparaciones farmacéuticas. Reconocida como GRAS y uno de los principales aromatizantes y saborizantes en los alimentos y en la industria cosmética. Se usa ampliamente en cremas de manzana, bebidas, productos horneados, de 1 a 26 mM dependiendo de la naturaleza del producto.

Actualmente aproximadamente el 50 % de la producción mundial de la vainillina sintética se usa como un intermediario en la industria química y farmacéutica para la producción de herbicidas, agentes antieaspumantes o drogas tales como la papaverina, L-dopa, L methildopa y el agente antimicrobiano, trimethoprim (Walton y col., 2003).

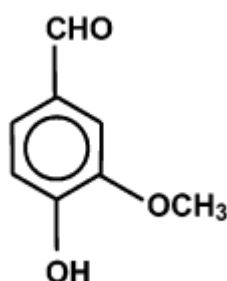


Figura 8. Estructura química de la vainillina

En común con muchos otros compuestos de bajo peso molecular, la vainillina ha mostrado propiedades antioxidantes (Burri y col, 1989), antifúngicas (Fitzgerald y col., 2003), antimutagénicas (Shaghenessy y col, 2006) y antimicrobianas (Delakis y col., 2004), de aquí que tiene un papel muy interesante en la tecnología de los alimentos. Se ha demostrado su efecto antimicrobiano frente microorganismos patógenos (*Salmonella enterica*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, y *Enterobacter aerogenes*), así como de deterioro (*Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Penicillium expansum*) (Fitzgerald y col., 2004; Rupasinghe y col., 2005). Se ha

demostrado que ha sido efectivo frente a levaduras y mohos en purés de frutas y medios de crecimiento de laboratorio (Cerruti y Alzamora, 1996; Cerruti y col., 1997) y en zumos de naranja frente a *Listeria innocua* y *E. coli O 157:H7* (Char y col., 2009; Char y col. 2010).

1.3.1.4 AE de canela

La canela es la corteza seca de un árbol perteneciente a la familia *Lauraceae*. Dentro de la subclase *Magnolidas* y perteneciente al orden *Lurales*, la familia *Lauraceae* es una de las más importantes por su diversidad y amplia distribución. Reúne unas dos mil especies, que se agrupan en poco más de una treintena de géneros que se extienden por las zonas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios (Izco y col. 1997). La importancia comercial de esta familia no radica en el consumo de los frutos sino en la riqueza en aceites esenciales de las cortezas o las hojas. En este sentido debe destacarse el *Sassafras albidum*, árbol nativo de América del Norte de cuya corteza se extrae un aceite (el sasafrás) que se utiliza para aromatizar tabaco, bebidas, perfumes, etc. o el laurel, cuyas hojas se utilizan como aromatizantes y conservantes debido a su contenido en aceites esenciales ricos en geraniol, cineol y eugenol (Izco y col. 1997).

Por la riqueza en aceites esenciales destaca sobre todo, el género *Cinnamomum*, que es la fuente de la canela y también de la casia. A lo largo de la historia se han confundido estas dos especias que, aunque muy parecidas, son diferentes. La canela se obtiene exclusivamente a partir de *Cinnamomum zeylanicum*, el cuál es originario de Sri Lanka (Ceilán), la casia deriva de otras especies del género *Cinnamomum* tales como *C. cassia*, *C. burmannii*, y *C. loureirii*, las cuáles son nativas del Sureste Asiático (Izco *et al.* 1997). Los productos derivados de estas especies distintas son también diferentes, por ejemplo: el AE derivado de la corteza de *C. zeylanicum* contiene eugenol el cuál sólo está presente en trazas o bien ausente en el AE obtenido de la corteza de la casia (Miller y col., 1996). Debido a la confusión entre ambas especias, el término canela se usa indistintamente para designar tanto a la canela propiamente dicha como a la casia. Así a la casia que se obtiene de las especies *C. cassia*, *C. burmannii*, y *C. loureirii* se les da el nombre de canela china, canela indonesia y canela vietnamita respectivamente.

C. zeylanicum es un árbol oriundo de la isla Sri Lanka. Puede alcanzar diez o quince metros de altura en estado silvestre, pero se poda para configurar árboles más pequeños y densos para facilitar su cultivo. Sus hojas son verdes y las flores blancas.



Figura. 9. Corteza en rama de *C. ceylanicum*



Figura. 10. Flores de canela de Ceylan

Los AEs que se extraen de la corteza, de las hojas y de la raíz tienen composiciones diferentes. El AE que se extrae de la corteza (máximo 4%) está constituido principalmente por cinamaldehído (65-75%) y eugenol (5-10%) (Koketsu y col. 1997; Möllenbeck y col. 1997). En trazas aparecen otros fenilpropanoides (safrol y ésteres del ácido cinámico), mono y sesquiterpenos, que aunque sólo aparecen en trazas contribuyen al sabor de manera importante. El AE que se obtiene de las hojas (1%) está constituido principalmente por eugenol (76-84%) (Hili y col., 1997; Raina y col., 2001) y puede ser usado como un sustituto del clavo. También contiene pequeñas cantidades (1-5%) de cinamaldehído, benzoato de bencilo, linalol y β -cariofilano.

La canela es conocida desde la antigüedad y ha sido usada como condimento en diferentes alimentos tales como salsa de manzana, leche, y productos horneados por su característico aroma (Jayaprakasha y col. 2003, Chang y col. 2001) y también en la industria de cosméticos (Kim y col 2004), incorporada a cremas y lociones. A la canela se le han encontrado también propiedades antioxidantes (Jarvill-Taylor y col 2001)

antidiabéticas, por ser un agente mimetizante con la insulina (Kim y col., 2006) e insecticidas (Park y col 2000).

Recientes investigaciones han demostrado que la corteza y las hojas de canela poseen una fuerte actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias Gram+: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y Gram-: *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Samonella typhimurium*, *Brucella*), mohos (*Aspergillus*, *Fusarium*), levaduras (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*) y dermatofitos (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* and *T. mentagraphytes*) (Velluti y col., 2003; Gupta y col., 2008; Fani y Kohante, 2010 ; Ooie y col., 2012; Saraf y col., 2011; Muthuswamy y col., 2008 ; Senhaji y col., 2007). Han sido varios los investigaciones realizadas demostrando la actividad bactericida de la canela frente a *L. monocytogenes* (Gupta y col., 2008) y *E. coli* O157:H7 (Friedman y col., 2002; Hoque y col., 2007; Babu y col., 2011). Las CMI obtenidas en la literatura oscilan entre 75 ug/ml a 600 ug/ml para las bacterias, de 100 ug/ml a 450 para las levaduras, de 75 a 150 ug/ml para los hongos filamentosos y 18,8 a 37,5 ug/ml para los dermatofitos (Ooi y col., 2006). El aceite de corteza encapsulado también ha demostrado ser efectivo en reducir el deterioro de tomates cherries (Xing y col., 2011)

1.3.1.5 AE de clavo

Los chinos daban a esta planta el nombre de *hi sho hiang* y la traían del estado de Mogada, en la cuenca del Ganges de la India Oriental, dónde se empleaba para condimentar los alimentos y era a su vez importada de las islas del sureste, a dos meses de navegación por el océano. Las crónicas chinas refieren que en siglo III a.C. durante la dinastía Han, cuando los funcionarios de la corte se dirigían al emperador, llevaban clavos en la boca para evitar el mal aliento.

El árbol del clavo (*Eugenia caryophyllus/Syzygium aromaticum*) pertenece a la familia *Myrtaceae*. Esta familia comprende unas 3.000 especies que se reúnen en 140 géneros, algunos de ellos notablemente diversificados, como el género *Eucalyptus* con 500 especies. La familia *Myrtaceae* crece en las zonas templadas y cálidas del

hemisferio sur, con una amplia representación en América y Australia (Izco y col. 1997).

Otra especie importante perteneciente a la familia *Myrtaceae* es la pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*), árbol de hoja perenne, que puede llegar a los nueve metros y que crece en Méjico, Guatemala, Belice y Jamaica. El árbol empieza a dar fruto a partir de los seis años y puede llegar produciendo hasta los cien.

El árbol del clavo, el clavero (*Eugenia caryophyllus/Syzygium aromaticum*) (Figura 11.), es nativo de las islas Molucas (Indonesia), hoy día Zanzíbar y Madagascar son los principales productores, seguidos de Indonesia. El árbol tarda unos veinte años en desarrollarse, alcanza una altura entre doce y quince metros, y puede seguir produciendo clavos hasta cincuenta años (Izco y col.1997).

Los clavos se desarrollan en grupos en los extremos de las ramas, lo que convierte su recolección en una operación difícil. Una vez que el clavo ha sido recolectado se quitan los pedúnculos florales y se dejan solamente los capullos que se ponen a secar al sol (Figura 12.) durante tres días. Al secarse pierden dos tercios de su peso y adquieren el color oscuro. Se suele aprovechar sólo una cosecha al año para que el árbol se recupere, aunque según la climatología las cosechas fluctúan entre abundantes y catastróficas. El AE proveniente del clavo está consituido por 36 componentes, de los cuales el eugenol está en la concentración más elevada: (70-90%), - β cariofileno (5-12%), otros componentes son α -humuleno, epóxido de humuleno, etil hexanoato, 2-heptanona humulenol, calacoreno y calamento (Rovio y col. 1999). (Chaieb y col., 2007).



Figura 11. Flor de clavo



Figura 12. Clavo de olor

Los clavos se usan como carminativos al incrementar el ácido hidrociorídico del estomago y mejorar la peristalsis. También se usan en odontología (Prashar y col., 2006, Ali y col., 2009). Además son antimutágenos (Miyazawa y Hisama, 2003), antiinflamatorios (Kim y col., 1998), antioxidantes (Chaieb y col., 2007), antiulcerogénicos (Bae y col., 1998; Li y col., 2005), antitrombóticos (Srivastava y Malhotra, 1991) y antiparasitarios (Yang y col., 2003).

Estudios recientes han reconocido el amplio espectro antibacteriano del AE de clavo frente a mohos, levaduras y bacterias (Smith and Palmer, 1998; Matan y col., 2006, Fu y col., 2007; Sahed y col., 2008; Ali y col., 2009).

1.3.2 Efectos biológicos de los AEs.

Citotoxicidad y fototoxicidad. Los AEs son capaces de atravesar la pared celular y las membranas citoplasmáticas, alterando la estructura química de los polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y permeabilizando la membrana. Esta permeabilización produce pérdida de iones, reduce el potencial de membrana, produce colapso en la bomba de protones y una disminución de la reserva de ATP. Todo esto conlleva a la fuga de macromoléculas y a la lisis celular (Burt, 2004; Di Pascua y col., 2006; Turina y col., 2006). Los AEs también pueden entrar al citoplasma y causar daños intracelulares al entrar en contacto con lípidos y proteínas.

En las células eucariotas, los AE pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales, produciendo una disminución del potencial de membrana, lo cual hace que las membranas se vuelvan permeables, provocando la fuga de radicales, citocromo C, iones Ca y proteínas. Estos efectos sobre la membrana mitocondrial externa e interna pueden dar lugar a la muerte celular por apoptosis y necrosis (Bakali y col. 2008).

Frente a este efecto citotóxico aparecen fenómenos de resistencia y adaptación microbiana. Así se ha descrito una resistencia en cepas de *Bacillus* sometidas al tratamiento con concentraciones subletales de carvacrol, provocando un incremento en

la fluidez en la membrana y cambios en la composición de ácidos grasos (Di Pascua, 2006).

Muchos aceites esenciales tienen efectos citotóxicos como las furocumarinas. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas con actividad tóxica en presencia de luz, con electrones que se insertan en la doble hélice del ADN, bloqueando su transcripción y reparación e incluso a veces provocando la muerte celular (Dijoux y col., 2006)

Mutagenicidad nuclear y citoplasmática. Algunas investigaciones han demostrado que la hierbabuena (*Mhenta spicitta*), el pino (*Pinus silvestres*) y la menta (*Mentha piperita*) han sido genotóxicos en *Bacillus subtilis*, *Drosophila melanogaster* y en linfocitos respectivamente (Bakali y col., 2008). El eugenol también ha demostrado ser citotóxico en células v76 (Maralhas y col., 2006). El aceite del árbol del té, el clavo, ajo, cebolla y orégano han demostrado ser mutágenos para las mitocondrias de las levaduras.

Efecto anticarcinogénico. Ciertos aceites esenciales contienen moléculas fotosensibles como flavinas, cianinas, porfirinas e hidrocarburos que han mostrado efectividad contra eritemas y cancer (Zhou y col., 2004; Burkey y col., 2000).

Efecto antimutágeno. Se ha demostrado que los AEs pueden tener ciertas propiedades antimutágenas por atrapamiento directo de los agentes mutagénicos evitando así la penetración de los mismos en el interior de la célula, la inhibición de la conversión de promutágenos en mutágenos o la activación de la detoxificación enzimática de mutágenos e po extractos de plantas (Gomes-Carneiro y col., 2005; Evandri y col., 2005))

1.3.3 Modo de Acción

Las propiedades antimicrobianas de los AEs se han demostrado por numerosos estudios pero el mecanismo de acción no está todavía muy claro. En muchos casos la actividad resulta de complejas interacciones entre las diferentes clases de compuestos tales como fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes, esterés o éteres o hidrocarburos encontrados en los AEs. Se ha encontrado que los AEs que contienen aldehidos o

fenoles, tales como el cinamaldehído, citral, carvacrol, eugenol o timol como principales componentes muestran gran actividad antibacteriana, seguidos de los AEs que contienen alcoholes terpenos. Los AEs que contienen cetonas o ésteres, tales como B-myrceno, a-thujone o acetato de geraniol tienen una actividad mucho más débil, mientras que los aceites volátiles que contienen terpenos son usualmente inactivos (Bassole y col., 2012)

De acuerdo a las investigaciones llevadas a cabo sobre el mecanismo de acción de los AEs, la principal acción antimicrobiana de los AEs se basa en su hidrofobicidad, que les permite pasar a través de la pared celular y la membrana citoplasmática. Es importante tener en cuenta que una estructura dañada afecta a otra y se produce una reacción en cascada (Faleiro, 2011). En general el efecto de los AEs sobre la célula microbiana se debe a:

Disrupción de la pared y la membrana plasmática. Debido a su hidrofobicidad los AEs son capaces de pasar a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, romper la estructura de las diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y permeabilizarlos, causar disrupciones en la membrana citoplasmática y producir despolarización e incremento de la permeabilidad, salida de iones, colapso de la bomba de protones, salida ATP celular y otros metabolitos (Turina y col., 2006; Di Pascua y col., 2006, Bakali y col., 2008). Algunos péptidos antimicrobianos forman poros en la membrana plasmática (Fatner y col., 2010), mientras que otros compuestos, tales como algunos constituyentes de los AEs tienen un efecto fluidificante (Cristani y col., 2007). Los compuestos antimicrobianos que actúan sobre la membrana pueden causar despolarización o incrementar la permeabilidad a través de varios mecanismos. Por ejemplo, algunos péptidos antimicrobianos forman poros (Cotter y col., 2005; Fantner y col., 2010), mientras que otros compuestos, tales como ciertos constituyentes de los aceites esenciales tienen un efecto fluidificante sobre la membrana (Trombetta y col., 2005; Cristani y col., 2007). Un efecto secundario de la disrupción de la membrana radica en la inhibición de la producción de toxinas (Boudid y col., 2009; Oussalah y col., 2006).

Disminución de producción de ATP. La disrupción de la membrana por los AEs compromete una serie de funciones vitales, principalmente los procesos de conversión

de energía, procesamiento de nutrientes, síntesis de macromoléculas estructurales y secreción de muchas enzimas claves para el crecimiento. Las moléculas hidrocarbonadas presentes en los AE pueden acumularse en la bicapa lipídica, destruir la interacción lipoproteica e interactuar con las proteínas integrales de membrana. Se ha demostrado que los AEs interactúan con las ATPasas presentes en la membrana citoplasmática. Gill y col. (2006) demostraron el efecto inhibitorio de varias plantas aromáticas sobre las ATPasa de membrana *E. coli* y *L. monocytogenes*. La disminución de la ATP intracelular puede ir acompañada de una menor salida de ATP.

..... *Aumento de la síntesis de proteínas de estrés.* (Di Pascua y col., 2010).

Alteración del pH. La membrana celular pierde su capacidad de bloquear los protones y se produce un significativo incremento del pH intracelular. En la membrana plasmática se encuentran numerosos enzimas relacionados con el transporte activo de proteínas como la ATPasa F1F10 encargada de regular el pH (Oussalah y col, 2006; Turgis y col., 2009).

.....*Cambios citoplasmáticos.* Se producen coagulaciones de material y los espacios periplasmáticos muestran cambios irregulares e invaginaciones (Becerril y col , 2007).

.....*Cambios en el ADN.* Se ha demostrado que los AEs tienen efectos mutagénicos y antimutagénicos (Mezzoug y col., 2007)

.....*Efecto anti-quorum sensing.* Los aceites de rosa, geranio, romero, y clavo son muy efectivos como inhibidores de Quorum Sensing, inhibiendo la transcripción de genes involucrados en el proceso de quórum sensing, fenómeno mediante el cual los microorganismos son capaces de producir pequeñas moléculas para comunicarse entre sí y producir biofilms, incrementar la virulencia o la resistencia al estrés (Khan y col., 2009; Szabo y col., 2010).

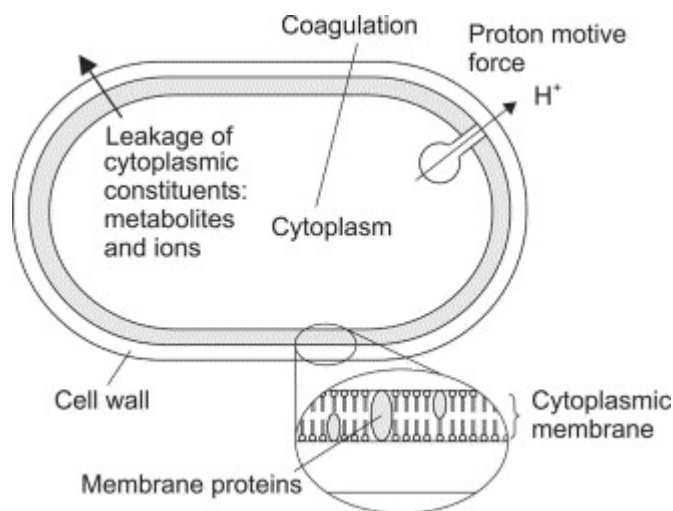


Figura 13. Lugares y sitios de acción en la célula bacteriana para los componentes de AEs: degradación de la pared celular (Thoroski y col.,1989, Helander y col.,1998); daños a membrana citoplasmática (Knobloch y col.1989; Sikkema y col.,1994; Oosterhaven y col.,1995; Ultee y col.,2000); daños a las proteínas de membrana (Joven y col.,1994; Ultee y col.,1999); filtración de los contenidos celulares (Oosterhaven y col., 1995; Gustafson y col., 1998; Helander y col.,1998; Cox y col., 2000); la coagulación de citoplasma (Gustafson y col., 1998) y el agotamiento de la fuerza motriz de protones (Ultee y Smid, 2001; Ultee y col., 1998). Fuente: Burt (2004).

1.3.4 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en alimentos

En los alimentos se ha demostrado que se necesitan más cantidades de AEs que la que se ha necesitado en experimentos previos in vitro, lo cual se explica por factores intrínsecos del propio alimento (grasa, proteína, agua, antioxidantes, conservantes, pH, sal y otros aditivos) y por factores extrínsecos, como la temperatura, pH, tipo de envasado y características del microorganismo. La matriz física de los alimentos también puede limitar la actividad antibacteriana de los AEs (Burt, 2004). En la tabla 1. se presentan un resumen de algunos de los estudios realizados sobre la actividad bacteriana de los alimentos

Tabla 1. Estudios realizados sobre la actividad bacteriana de los AEs y sus componentes en los alimentos

Grupo	Alimento	AE o componente	Microorganismo	Referencias
Carne	Cordero	Clavo	<i>L. monocytogenes</i>	Menon y Garg., 2001
	Vacuno	Eugenol	<i>L. monocytogenes</i>	Hao y col.,1998
	Pollo	Eugenol	<i>L.monocytogenes</i>	Hao y col., 1998a
	Salchichas	Romero	<i>L.monocytogenes</i>	Pandit y Shelef, 1994
	Ternera	Salvia	<i>B. cereus, S. aureus</i>	Shelef y col., 1984
	Cerdo	Aceite de clavo	<i>A. hydrofila</i>	Stecchini et al., 1993
	Paté	Menta	<i>L. monocytogenes</i>	Tassou y col., 1995
	Cerdo	Mostaza	<i>E. coli</i>	Lemay y col., 2002
Pescado	Gambas	Tomillo	<i>Ps. putida</i>	Ouattara y col.2001
	Mero	Geraniol, Carvacrol	<i>S. typhimurium</i>	Kim y col., 1995b
	Bacalao	Orégano	<i>Photobacterium</i>	Mejlholm y Dalgaard, 2002
	Salmón	Orégano	<i>Ps. phosphoreum</i>	Mejlhoon yDalgaard, 2002
Lácteos	Mozarella	Clavo	<i>L. monocytogenes</i>	Menon y Garg, 2001
	Leche	Carvacrol	<i>L. monocytogenes</i>	Karatzas y col., 2001
	Yogurt y	Clavo, Canela	<i>S. termophilus</i>	Tassou y col., 1995
	Queso	Clavo, Canela	<i>L.monocitogenes</i> <i>S.thyphimurium</i>	Smith y Parlmer, 2001
Vegetales	Alfalfa	Cinamaldehido,	<i>Salmonella</i>	Weissinger y col., 2001
	Berenjena	Orégano	<i>E. coli O157:H7</i>	Skandamis y Nychas, 2000
	Lechuga	Orégano	<i>E. coli O157:H7</i>	Singh y col., 2002
	Alfalfa seeds	Cinamaldehido y Timol	<i>Salmonella spp</i>	Weissinger y col., 2001
Frutas	Kiwi y melon	Cinamaldehido y	Flora natural	Roller y Seedhar, 2002
	Cerezas	Carvacrol Eucaliptol,eugenol,	Mohos y levaduras	Serrano y col., 2005

Fuente: Adaptado de Burt (2004), Holley y Patel, (2005), Rassoloi, (2000)

- Perspectivas y limitaciones en la aplicación de AEs en los alimentos. Ciertos componentes de los AEs han sido aceptados por la Comisión Europea para ser usados como aditivos en alimentos (linalool, timol, eugenol, carvona, cinanaldehido, vainillina, carvacrol, citral y limoneno) ya que se considera que no presentan riesgo para la salud del consumidor en la dosis admitidas. Algunos AEs también han sido clasificados como GRAS por la FDA incluyendo entre

otros el clavo, orégano, tomillo, nuez moscada, laurel, mostaza y canela y que pueden ser consultados en la lista que publica la FDA sobre los aditivos que pueden ser usados en los alimentos (Everything Added to Food in the US) (FDA, 2013).

A pesar del demostrado potencial de los aceites *in vitro*, su uso en alimentos se ha restringido debido a las altas concentraciones necesarias para conseguir suficiente actividad microbiológica. En los alimentos los constituyentes de los AEs se ven afectados por interacciones con los componentes de la matriz alimentaria como son la grasa y las proteínas. También se ven afectados por el pH, la temperatura y el nivel de contaminación microbiana. La extrapolación de los resultados de las pruebas *in vitro* a los alimentos es por lo tanto difícil y siempre es más alto en los alimentos.

El intenso aroma de los AEs, incluso a muy baja concentración pueden causar efectos sensoriales negativos que exceden el umbral aceptable del consumidor (Lv y col., 2011). El incrementar la concentración de AE para compensar las interacciones con la matriz del alimento es por otro lado es desaconsejable y limita su aplicación en los alimentos donde el umbral de especie aceptado es relativamente alto. Una opción es usar los AEs en envases activos en vez de como un ingrediente más en el producto. Los AEs pueden encapsularse en polímeros biodegradables o bolsitas (sachets) que se liberan lentamente a la superficie del alimento desde el espacio de cabeza del envase (Pelissari y col., 2009; Sánchez-González y col., 2011) (Ahvenainen, 2003). La ventaja de incorporar los componentes volátiles de los AEs en películas de envasado que pueden ser comestibles es que la tasa de migración de los agentes activos al alimento puede ser reducida al mismo tiempo que los compuestos activos se mantienen en el espacio de cabeza o en la superficie del producto por extensos periodos de tiempo (Phillips y Laird, 2011; Sánchez-González y col., 2011). Otra forma de minimizar los efectos organolépticos de los AEs es añadirlos al alimento encapsulados en forma de nanoemulsiones. Esta forma de aplicación incrementa la estabilidad de los componentes volátiles y los protege de interactuar con la matriz del alimento e incrementa la actividad antimicrobiana (Donsí y col, 2011). Bajar la concentración del AE sin comprometer su actividad antimicrobiana puede obtenerse también al aplicarlos en combinación con otros antimicrobianos que proveen una actividad sinérgica (Nguefack y col., 2012). Se sabe que ocurren efectos sinérgicos en combinaciones de

antimicrobianos y es por lo tanto un campo lleno de oportunidades para encontrar mezclas de antimicrobianos potentes, los cuales pueden servir para ser aplicados en la conservación de alimentos a dosis más reducidas y por lo tanto sin efectos organolépticos en los alimentos.

1.3.5 Mezclas de aceites esenciales. Sinergismo y antagonismo

En el campo médico el valor terapéutico de las interacciones synergísticas de diversos antimicrobianos se conoce desde la antigüedad, y muchos sistemas han descansado en el principio de que la terapia de combinación de agentes puede mejorar la eficiencia terapéutica, particularmente en la lucha contra las enfermedades infecciosas. Los textos antiguos sobre medicina tradicional china describen formulas de numerosas mezclas de compuestos naturales de plantas. Recientemente la aplicación de terapias de combinación ha ganado una amplia aceptación en la medicina moderna, especialmente en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La Organización Mundial de la Salud, por ejemplo ha urgido a las compañías farmacéuticas a usar las terapias combinadas para curar la malaria y la tuberculosis. El concepto de sinergia antimicrobiana está basada en el principio de que en combinación, la formulación puede mejorar la eficacia, reducir la toxicidad, disminuir los efectos adversos, bajar la dosis y reducir el avance de la resistencia antimicrobiana. La interacción puede ser sinérgica, aditiva, indiferente o antagónica (Vuuren y col., 2011).

A pesar de la alta eficiencia de los aceites esenciales y sus constituyentes frente a microorganismos patógenos y de microorganismos de deterioro cuando se realizan las pruebas in vitro, el mismo efecto en los alimentos se consigue sólo con altas concentraciones de AEs. Este hecho implica un elevado impacto organoléptico, causado por la alteración del sabor natural de los alimentos, que exceden el umbral de sabor aceptable. Pocas soluciones se han propuesto para minimizar las concentraciones de los AEs y reducir el efecto sensorial. Una de estas soluciones consiste en combinar AEs con extractos de plantas o sus componentes activos principales, de esta forma la combinación de unos componentes con otros con una actividad mas débil, podría resultar en un efecto sinérgico, antagónico o aditivo. Esta estrategia abre la posibilidad de reforzar su efecto natural antimicrobiano por la adición a los AEs de pequeñas

cantidades de conservantes naturales, lo cual puede ser un camino de alcanzar un balance aceptable entre la aceptabilidad sensorial y la eficiencia antimicrobiana (Goñi y col., 2009).

La interacción entre los antimicrobianos puede ser sinérgica, aditiva o antagónica. La palabra sinergia se deriva de la palabra griega “syn-ergo” que significa trabajar juntos. La sinergia ocurre cuando los dos antimicrobianos juntos tienen una actividad mayor que la suma de los componentes individuales. Un efecto aditivo ocurre cuando la combinación de los antimicrobianos tiene un efecto combinado igual a la suma de los compuestos individuales. El antagonismo ocurre cuando una mezcla de los compuestos antimicrobianos tiene un efecto combinado menor que cuando se aplican separadamente (Burt, 2004).

Las mezclas de los AEs han mostrado también efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos. El AE de orégano (*Origanum vulgare*) ha sido el más usado en combinación con AE de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), laurel (*Ocimum basilicum*), mejorana (*Ocimum majorana*) y Melissa (*Melissa officinalis*). En la mayoría de los casos sólo se encontraron efectos aditivos y sólo en un caso se encontraron efectos sinérgicos (Bassolé y col., 2010).

La mayoría de los estudios atribuyen efectos aditivos y sinérgicos a los compuestos fenólicos y alcoholes. Generalmente los compuestos con estructuras similares exhiben efectos aditivos más que sinérgicos. La ocurrencia de interacciones aditivas de algunos AEs se ha relacionado con sus principales compuestos fenólicos (carvacrol y timol) (de Azeredo y col., 2011). El efecto antagónico se ha atribuido a la interacción entre hidrocarburos monoterpenos oxigenados y no oxigenados (Goñi y col., 2009). Poco se conoce acerca de cómo se producen los fenómenos de sinergismo y antagonismo pero se reconocen cuatro mecanismos teóricos:

- 1) Inhibición secuencial de numerosos pasos en una particular vía metabólica
- 2) Inhibición de los enzimas que degradan los antimicrobianos
- 3) Interacción de varios antimicrobianos con la pared celular o membrana que conduce a la entrada de otros antimicrobianos
- 4) Interacción con la membrana plasmática

1.3.6 Métodos para evaluar la acción antimicrobiana de los AEs

En los últimos años (1987-2011) se ha demostrado la actividad antibacteriana y antioxidante de un extenso número de AEs. Los principios y prácticas de las pruebas para determinar esta actividad, o pruebas de susceptibilidad microbiana (AST o antimicrobial susceptibility testing) han sido standarizadas por diferentes comites o autoridades regulatorias europeas y americanas. Estos métodos fueron diseñados inicialmente para determinar la actividad de compuestos antimicrobianos convencionales de uso médico como son los antibióticos y no están standarizadas específicamente para aceites esenciales o para microorganismos relacionados con los alimentos. El método NCCLS (actual CLSTI) para determinar la susceptibilidad bacteriana, el cual fue dirigido a la determinación de la actividad de los antibióticos ha sido modificado para determinar la actividad de los AEs. Sin embargo, con menores modificaciones, estos métodos pueden ser convenientemente adaptados para determinar la actividad antimicrobiana de AEs y extractos de plantas (CLSTI, 2013) (Kahlmeter y col., 2006).

Los métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana se dividen en métodos *in vitro* y pruebas de aplicación en alimentos. Los primeros incluyen cualquier prueba en la que el compuesto no se aplica de manera directa al sistema alimenticio; generalmente, este tipo de pruebas proporcionan información para determinar la eficacia del compuesto. Las pruebas de aplicación son aquellas en las que el agente antimicrobiano se aplica directamente al producto (Davidson y Paris, 1989, 1993)

Pruebas “in vitro”

Los métodos *in vitro* se subdividen en métodos exploratorios y métodos aplicados. Los métodos exploratorios se dividen en métodos de evaluación de punto final, métodos descriptivos y métodos autobiográficos (Davidson y Paris, 1989, 1993)

Métodos de evaluación del punto final

Existen cuatro tipos de pruebas de evaluación del punto final (Davidson y Paris, 1989):

1. Pruebas de difusión en agar. Esta prueba fue utilizada inicialmente para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los antibióticos. Más tarde sin embargo, el agar no se encontró adecuado para evaluar ciertas moléculas antimicrobianas, ya que éste contiene componentes de efectos antimicrobianos, así como sustancias extrínsecas o contaminantes que impiden la difusión del producto en ensayo, lo cual ha conducido alguna vez a sustituir el agar por agarosa (Toit and Rautenbach, 2000).

Las pruebas preliminares de los AEs para la actividad antimicrobiana también es a menudo hecha por el método de difusión en disco, en el cual un disco de papel humedecido con el AEs puesto sobre una placa de agar inoculada con la cepa bacteriana diana o testigo. El compuesto se difunde a través del agar, estableciéndose un gradiente de concentración. La zona de inhibición se mide físicamente con un calibrador tipo pie de rey para determinar la actividad antimicrobiana de la sustancia a evaluar (Schelz y col., 2006). Esto es generalmente usado como un método rápido preliminar para detectar la actividad antibacteriana. Factores tales como el volumen del AE colocado sobre los discos de papel, el espesor de la capa de agar e incluso el solvente utilizado varía considerablemente entre estudios, lo cual significa que este método es útil para poder seleccionar entre los AEs pero no para hacer comparaciones. La prueba de los pocillos de agar en la cual los aceites esenciales son depositados en los pocillos cortados en el agar puede ser también usado como un método de screening cuando se tienen que probar varios AEs o varios microorganismos.

En general, los ensayos de difusión en agar son costosos, consumen mucho tiempo y las medidas tienden a ser más cualitativas que cuantitativas. La hidrofobicidad de los componentes de los AES limita el valor de las pruebas de difusión para estimar la potencia antimicrobiana adecuadamente (Burt, 2004; Dorman and Deans, 2000; Holley and Patel, 2005). El CLSTI (Clinical Laboratory Standards Institute), anterior NCCL (National Committee for Clinical Laboratory Standards), recomienda una metodología para realizar las pruebas de difusión en gel (CLST, 2012). Dentro de este tipo de pruebas encontramos el método de la microatmósfera y la fumigación, mediante el cual se determina la actividad antimicrobiana de los vapores de los AEs en contacto con el medio de crecimiento y los microorganismos (Arras and Usay, 2001; Lopez y col., 2005). En estos casos el problema de un mezclado inadecuado es minimizado y los AEs y su CMI se pueden determinar utilizando un método de impregnación de los

volátiles en discos que se colocan en la cubierta de la placa de Petri o por sistemas de microextracción de la fase sólida combinados con cromatografía de gases. Estas metodologías de las sustancias volátiles son bastante adecuadas para determinar de forma preeliminar la actividad antimicrobiana de las sustancias que van a ser utilizadas en envases activos o en fumigación de las cosechas, mientras que los agentes menos inhibitorios se deben ensayar mediante métodos de dilución.

Shur and Nielsen (2003) evaluaron la actividad antifúngica de AEs de canela, clavo, lemongrass, mostaza, naranja, salvia, tomillo y romero por el método de la microatmósfera y por el de la dilución en agar. Los resultados demostraron que los compuestos fenólicos de bajo peso molecular y los compuestos volátiles no fenólicos, tales como el citral y el limoneno son más efectivos cuando se aplican a través de la fase aérea. Sin embargo los AEs con compuestos de compuestos fenólicos de mayor peso molecular, tales como timol y eugenol se usan mejor directamente. Obaidat y col. 2009, lograron la inactivación de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 sobre tomates cortados por acción del carvacrol, alil isothiocianato y cinamaldehído en fase de vapor. De acuerdo a estos autores la metodología de la microatmósfera debería ser considerada en futuras aplicaciones creando de esta manera una atmósfera protectora que permita extender la vida útil de los alimentos envasados mientras que minimiza las alteraciones organolépticas y sobre todo debería emplearse para la fumigación o para propósitos de envase activo.

2. Gradiente en placas. El agar fundido se vierte en placas de Petri y se deja que solidifique, después se vierte una segunda capa de agar con el antimicrobiano. El resultado es una placa con un gradiente de concentración.

3. Pruebas para desinfectantes. El coeficiente de fenol es uno de los métodos más antiguos para determinar la actividad de los desinfectantes, se obtiene por determinación del recíproco de la máxima dilución del compuesto capaz de eliminar al microorganismo en 10 minutos; éste es dividido por el recíproco de la concentración de fenol con la misma actividad.

5. Pruebas de dilución en caldo o en agar. Este tipo de pruebas permiten

determinar la concentración mínima inhibitoria o CMI y la concentración mínima bactericida o CMB. Son parámetros ampliamente usados en la investigación de los AEs, aunque en la literatura se encuentran a veces diferencias significativas para definir estos parámetros. Una de las definiciones de CMI atribuida a Carson y col. (1995) es la “concentración mas baja que resulta en el mantenimiento o reducción de la viabilidad del inóculo del microorganismo diana después de un periodo de incubación determinado (Burt, 2004). La CMB se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano necesaria para eliminar el 99% del inóculo inicial después de incubación por 24 h bajo condiciones estandarizadas. Este ensayo es una prueba que se realiza generalmente empleando diluciones dobles en caldo y posteriormente a la determinación del MIC. Los métodos estandarizados para alcanzar la CMI y la CMB a través de la microdilución en caldo se encuentra en los protocolos del CLST (2013).

La determinación del MIC involucra una serie de pruebas que dan una aproximación a la menor concentración que se necesita de un antimicrobiano para prevenir el crecimiento. Para las pruebas de difusión en caldo el inóculo se siembra en tubos con caldo nutritivo que contienen diferentes concentraciones de la sustancia antimicrobiana y la MIC es determinada después de la incubación. El resultado de la pruebas es la concentración mínima de antimicrobiano que da una solución clara sin crecimiento visual (Feng and Zheng, 2007). La eficacia de la actividad antimicrobiana es verificada por el cambio en densidad óptica, por colorimetría o por conteo de célula viables (Faleiro, 2011). Las medidas de conductancia/conductividad y determinación del punto final por monitoreo visual también se usan para comprobar la actividad de los antimicrobianos. Esta técnica se basa en la correlación entre el cambio de los parámetros eléctricos y el crecimiento microbiano. Los resultados de esta evaluación se expresan por el tiempo de detección (TD), o tiempo requerido para que el microorganismo alcance un umbral (Rohner y col. 2004).

Para las pruebas de difusión en agar, a tubos con agar tripticasa de soja fundido se añade una concentración de AE y este se diluye serialmente usando el mismo modelo para obtener la concentración adecuada, se vierte en placas de Petri y se deja solidificar. Posteriormente las placas se siembran con el microorganismo diana y se incuban a la temperatura adecuada (Hammer y col., 1999; Oussalah y col., 2006). De acuerdo a estudios realizados por Gutierrez y col. (2009), no se han encontrado diferencias

significativas entre las pruebas por dilución en caldo y en agar. Aunque la macrodilución en tubos aún se usadavía hay una mayor confianza en el uso de sistemas de microplacas conteniendo inhibidores y microorganismos diana en el caldo. Algunos autores han sugerido que las pruebas de difusión en agar podrían usarse como un método de selección cuando un largo numero de AES y bacterias tienen que ser probados, puesto que la comparación de datos publicados no es posible (Dorman and Deans, 2000, Burt 2004).

Métodos descriptivos

Son aquellos en los que los microorganismos se muestrean periódicamente para determinar cambios en el número de células viables en función del tiempo. El efecto bactericida puede determinarse mediante análisis de las curvas de supervivencia, en las que las medidas de la DO o la enumeración de células viables por recuento en placas de agar después de la adición de los aceites esenciales se grafica versus el tiempo. Mediante los conocimientos provenientes de la microbiología predictiva, el análisis de estas curvas permite obtener información sobre la fase de latencia, la velocidad máxima de crecimiento y densidad máxima de población y estos datos pueden ser usados para calcular los índices de inhibición. Una revisión de los diferentes modelos desarrollados para evaluar el efecto de inhibidores naturales y de síntesis química puede encontrarse en (Geeraerd y col., 2004).

La determinación de la CMI basadas en el punto final es considerada una técnica semicuantitativa. Lambert and Pearson (2000) describieron una técnica utilizando una microplaca de 100 pocillos y desarrollaron un método de análisis de los datos cuantitativo, que permite usar toda la información de crecimiento obtenida por turbidometría, de cada uno de los pocillos de la microplaca. Una función modificada de Gompertz se usa para ajustar los datos para obtener un valor más preciso para el MIC. Esta técnica también muestra que a cierta concentración del inhibidor, no hay ningún efecto sobre el crecimiento en relación al control, sin inhibidor. Por encima de un valor umbral, el cual se ha llamado concentración no inhibitoria o CNI, el crecimiento se ve limitado hasta que se alcanza el MIC, donde no se observa ningún crecimiento en relación al control. Lambert y col., 2001 desarrollaron un nuevo modelo basado en la metodología del área bajo la curva para determinar el efecto antimicrobiano de los

desinfectantes. En general estas funciones, introducen un límite al número de microorganismos capaces de ser desinfectados y ajustan mejor los periodos de latencia y las colas de las curvas de supervivencia que generalmente son no lineares.

Métodos autobiográficos. Se basan en la separación de los distintos componentes de los AEs por cromatografía de capa fina y posterior correlación de los componentes con la inhibición del crecimiento microbiano. Esta técnica se ha usado recientemente para ensayar la actividad de los AEs de tomillo, lavanda, eucaliptos, y canela (Horwath y col., 2010).-

El daño a la pared bacteriana y la pérdida del contenido celular pueden ser escaneadas por microcopia electrónica (Burt and Reinders, 2003) y servir a la vez para determinar la efectividad de los AEs, sin embargo se debe de tener cuidado para asegurarse de que las diferencias entre el control y las células tratadas sean debidas al efecto de los AEs y no a la preparación del método.

El efecto de los AEs sobre los microorganismos se ha determinado también usando marcadores que ayudan a entender el mecanismo molecular de los agentes que interactúan con el DNA (Hamedo, 2009)

Métodos aplicados

En este tipo de pruebas el agente antimicrobiano es evaluado en el propio alimento o en sistemas modelo y su actividad antimicrobiana puede variar mucho de la información obtenida de los experimentos in vitro (Gutierrez y col., 2009). Se clasifican también en métodos de evaluación del punto final y en métodos descriptivos basados en la elaboración de curvas de inhibición o muerte. Los microorganismos usados como diana son generalmente los propios contaminantes del alimento o patógenos de interés y las temperaturas de incubación son las generalmente usadas o de abuso. Los últimos investigaciones aplicadas sobre la actividad antimicrobiana de los AEs en alimentos se han hecho incorporandolos en películas comestibles o con encapsulación (Raibauidy y Matan, 2012) (Ponce y col., 2010)

1.3.7 Métodos para determinar las combinaciones de antimicrobianos

Las combinaciones de antimicrobianos ha sido extensivamente estudiadas en la industria farmacéutica y los métodos han sido desarrollado para determinar el tipo de interacciones entre dos antimicrobianos. Sin embargo es en los últimos años que se están aplicando estas metodologías para investigar su aplicabilidad en la industria alimentaria.

Las metodologías empleadas para determinar el poder antimicrobiano de las mezclas abarcan hasta la fecha desde los primarios ensayos de difusión en agar o en dilución en caldo hasta los más recientes estudios basados en las pruebas del epsilonmetro (Lewis y col., 2001), las curvas de letalidad en el tiempo o (Brady y col., 2006) y el tablero de ajedrez (Barry y col., 1976), pero no todas se adaptan para ser usadas con antimicrobianos naturales en los alimentos.

Para construir las curvas de letalidad, se realizan ensayos en caldo y la tasa de muerte de un inóculo fijo se determina comparando la tasa de muerte en la muestra con agentes antibacterianos con la muestra control (sin agentes antibacterianos). Para determinar el efecto sinérgico o antagónico entre dos o más agentes antimicrobianos, las curvas se construyen a partir de una concentración fija de cada agente sólo y en combinación, los resultados se comparan con el control, libre del agente antibacteriano. La metodología del tablero de ajedrez (*chekerboard*) se hace en un microplaca de pocillos en los cuales se dispensan diluciones seriadas a partir del MIC de cada uno de los dos antimicrobianos. El resultado es un tablero de ajedrez, que da nombre a la metodología que describe esta técnica de evaluación antimicrobiana. Como es muy difícil comparar la MIC de diferentes pruebas, los datos se transforman para producir una concentración inhibitoria Parcial. La CFI o concentración fraccionada inhibitoria para un agente antimicrobiano se define como la concentración inhibitoria de un agente antimicrobiano con un segundo agente antimicrobiano dividida por la CMI de este mismo agente cuando este actúa individualmente

$$CFI_A = CMI_{de A con B} / CMI_{de A}$$

$$CFI_B = CMI_{de B con A} / CMI_{de B}$$

Los CFIs individuales de los agentes en combinación se suman para conocer las concentraciones inhibitorias en la mezcla,

$$\text{Indice mezcla o } CFI_i = CFI_A + CFI_B$$

Aunque el cálculo del CFI de la mezcla para calcular la interacción parece ser un método simple, presenta una limitación ya que se basa en la suposición de que la mitad de la concentración provee la mitad del efecto. Sin embargo esto no es siempre el caso (Lambert y Lambert, 2003). El uso de isobogramas que toma en consideración varias combinaciones de los antimicrobianos proporciona una forma de medida más realística de medir las interacciones. El método del isobograma es probablemente una de los métodos mas antiguos de medir las interacciones, y datan publicaciones desde 1870, pero no es hasta que recientemente los resultados obtenidos con el isobograma se han validado mediante modelos matemáticos, que esta metodología es ahora una de las favoritas para evaluar la interacción. El procedimiento se basa en la combinación de dos muestras a varias proporciones. El CMI para cada muestra se determina independientemente y se compara con el CMI obtenido en la combinación. Pueden construirse usando directamente los datos de la CMIs o calculando los CFIs y graficando estos. Los puntos situados en los dos ejes representan las dosis individuales y el isobograma se construye examinando los puntos de inhibición representados por una combinación determinada de los antimicrobianos (Vuuren y Viljoen, 2011).

La interacción de los antimicrobianos en las combinaciones también se puede determinar usando la metodología del área bajo la curva dosis-respuesta (Lambert y Lambert, 2003). Dufur y col., 2003, desarrollaron una metodología usando cuatro criterios para determinar el grado de sinergismo entre varias concentraciones de antimicrobianos, usando el sistema microtiter y basándose en los siguientes criterios: incremento en la fase lag, reducción en la densidad del cultivo y viabilidad residual después después de 24 horas.

1.4 La leche pasteurizada

1.4.1 Tecnologías emergentes en la conservación de la leche pasteurizada

El consumo de la leche fluida ha venido disminuyendo en los últimos veinte años, sin embargo desde los últimos diez años este descenso es de mayor intensidad, a favor del consumo de bebidas carbonatadas, agua embotellada, zumos, bebidas para deportistas y té listo para el consumo. En Estados Unidos el consumo de leche fluida disminuyó en el año 2012 con respecto al año 2011 en un 4,3 %, estando por debajo de los 54 millones de libras (USDA, 2013; Cai y Stiegert, 2013). El mercado de leche fluida en Europa es de aproximadamente 30 millones de litros por año y la disminución en el consumo es de aproximadamente 0.7% al año. La situación del mercado de lácteos en 2013 en muchos países de Europa es muy similar a la ocurrida en 2008 y 2009, con precios de la leche que descendieron a niveles preocupantes, pero con la diferencia que ahora los costos se encuentran en aumento (Richarts, 2013).

:

Hace veinte años un embotellador de leche sólo se desarrollaba en el negocio de la leche fluida exclusivamente, sin embargo en la actualidad la elevada competitividad del mercado ha empujado a los embotelladores a envasar otras bebidas, como por ejemplo agua, zumos y bebidas para deportistas. Para que una planta industrial sea rentable es preciso que funcione a total capacidad, por lo que este movimiento se ha hecho imperativo debido a la falta de crecimiento en el consumo de leche. Además los costos de distribución han incrementado dramáticamente y se hace más rentable para los industriales procesar productos adicionales para comerciar y distribuir, ya que muchos distribuidores prefieren hacer negocios con un procesador que provee una línea completa de bebidas.

En la actualidad se pueden procesar grandes volúmenes de producto fluido con reducidos costos de mano de obra y envase gracias a los avances tecnológicos, lo que ha permitido reducir los márgenes de ganancia para ofrecer productos más competitivos y a la vez ha llevado a que las plantas sean cada vez de mayor escala. Esto ha hecho muy difícil la supervivencia de pequeños productores en el negocio de leche líquida, que apenas han podido sobrevivir con las nuevas tendencias y escasamente pueden establecer contratos para procesar líneas adicionales de productos, lo cual resulta en

costos más altos de producción y por consiguiente su salida de muchos mercados (Prasad y col., 2004).

Durante los últimos diez años la industria de las bebidas de leche fluida ha intentado innovar y satisfacer las nuevas demandas de los consumidores enfocándose principalmente en mejorar la calidad percibida de los productos lácteos, incrementando la vida útil implementando nuevas tecnologías de procesamiento, produciendo bebidas elaboradas con leche ecológica (organic farming), aumentando los canales de distribución, adecuando los envases a las nuevas demandas de los consumidores y produciendo bebidas con nuevos ingredientes, aromas y sabores (Davis y col., 2012).

1.4.1 Tratamientos térmicos

La leche cruda es un alimento nutricionalmente muy rico, de baja acidez y contiene todos los nutrientes requeridos por las bacterias para crecer, incluyendo las potencialmente patógenas para el hombre, por lo que tiene unos pocos días de vida útil. Los microorganismos patógenos ocurren normalmente en la leche cruda debido a la contaminación fecal o directamente por las mastitis de la vaca. Entre los patógenos más frecuentes asociados con la leche cruda se encuentran *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Brucella spp.*, *E. coli O157:H7*, *Bacillus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Coxiella burnetii* y *Micobacterium avium* (Olivier y col., 2000; Pearce, 2001).

El objetivo de la pasteurización es eliminar los patógenos y microorganismos de deterioro sin afectar las propiedades organolépticas y nutricionales de la leche. La elección de la temperatura y el tiempo adecuado viene condicionada por la necesidad de inactivar la carga bacteriana inicial y al mismo tiempo evitar la desnaturalización de las proteínas de la leche, inactivación de las vitaminas y todos los casos la aparición de los gustos a cocido que deterioran irreversiblemente las bebidas lácteas. Una correcta pasteurización combinada con un envase adecuado y una adecuada refrigeración elimina la posibilidad de cualquier enfermedad debida a los patógenos tradicionales, aunque la identificación de nuevos patógenos emergentes hace que este concepto siempre esté sometido a cambio. Asimismo las contaminaciones postproceso han sido causantes de brotes en la leche pasteurizada adecuadamente. (Fleming y col., 1984, Dalton y col., 1997, MMWR. 2007).

La producción de bebidas de leche fluida combina las operaciones de clarificación, separación de la grasa (para la producción de leches de diferente contenido graso), normalización, tratamiento térmico y homogenización. Mientras que el contenido de grasa de la mayoría de la leche crudas es 4% o mayor, el contenido de grasa en la mayoría de las bebidas de leche se ha reducido a 3.4%, 2% de grasa, 1% de grasa o hasta <0.1% en leche descremada. Estos productos se elaboran por descremamiento total de la leche entera o /y adición de la cantidad apropiada de grasa. Algunas vitaminas como la A y la D (solubles en grasa) se añaden en la forma de emulsiones solubles en agua, para suplementar la pérdida que pudo tener lugar en el proceso de desnatado o descremada.

Los principales avances tecnológicos en el procesamiento de la leche fluida en los últimos 25 años incluyen significantes mejoras en las operaciones de separación, pasteurización, homogeneización y envasado, siendo considerables los avances relacionados con la capacidad de producción, automatización y operaciones higiénicas. (Boor y Griiffin, 2006). El mejoramiento de la calidad higiénica de la leche esta íntimamente relacionada con el desarrollo del mercado, los primeros estudios que demostraron esta relación fueron desarrollados por el profesor David Bande en Estados Unidos, los cuales revelaron que el consumo de leche en los distintos escolares esta directamente relacionado con su calidad sensorial y ésta a su vez depende directamente de su calidad microbiológica.

Los objetivos actuales de cualquier programa que se proponga para mejorar la calidad higiénica de la leche se basan en tres aspectos fundamentales: buenas practicas higiénicas, optimización de los tratamientos térmicos, pasteurización y esterilización mediante el uso de modelos predictivos que aseguren la eficiencia de estos tratamientos y el uso de sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control durante todo el sistema de producción (Smith y col., 2004).

El crecimiento microbiano es la primera y más peligrosa limitación de la industria alimentaria. En la industria láctea, la principal finalidad del tratamiento térmico es destruir todos los microorganismos patógenos presentes en la leche. La tendencia hacia el consumo de alimentos más naturales parece haberse extendido también en la leche, y

en muchos consumidores manifiestan preferencia por la bebida que presenta un sabor más parecido a la leche cruda, por lo cual los tratamientos de conservación tienden a ser lo menos drásticos posibles (Claeys y col., 2013). Por otro lado la centralización de la industria láctea, el incremento de la competencia y las compras menos frecuentes del consumidor han aumentado la necesidad de aumentar la vida útil de la leche pasteurizada, la cual debido a los frecuentes rupturas de la cadena de frío, debe enfrentar el reto de prevenir el deterioro y garantizar la inocuidad a elevadas temperaturas (Rysstad, y Kolstad, 2006).

Los tratamientos térmicos más comúnmente usados son las combinaciones de baja temperatura, bajo tiempo (LTLT), (63,5°C por 30 min) y los de alta temperatura, corto tiempo (HTST) (72-75°C por 15-30 seg) y deben presentar una reacción negativa a la fosfatasa y positiva a la peroxidada. La vida útil de una leche pasteurizada (HTST) depende de múltiples factores entre los que destacan la calidad de la leche cruda, las condiciones de pasteurización, la posibilidad de contaminaciones post-proceso y del mantenimiento de una adecuada cadena de frío. Si todas estas condiciones son adecuadas el tiempo de vida útil de una leche pasteurizada es de aproximadamente 10 días. La leche esterilizada implica la utilización de temperaturas más altas, 140 °C por 3° o 4 seg (UHT). Es un proceso que destruye toda forma vegetativa e inactiva las esporas y el producto se puede almacenar a temperatura ambiente y la refrigeración solamente es requerida al abrir el envase. La vida útil de este producto es de aproximadamente 6 meses. Sin embargo, la necesidad de obtener un producto con las características de la leche pasteurizada pero con mayor vida útil ha conducido al desarrollo de la leche UP (ultrapasteurizada), la cual requiere de tratamientos térmicos más intensos que la pasteurización (123-127 °C por 1-5 seg) y que proporcionan una mayor vida útil, alrededor de 45 días. El producto queda prácticamente libre de microorganismos capaz de crecer bajo refrigeración (<7 °C) durante el almacenamiento o transporte y pueden así tener vida útil mayor de cuatro semanas si no se altera la cadena de frío (Lorenzen y col., 2011).

En Estados Unidos estas diferencias en el procesamiento han generado distintos tipos de leche fluida, tales como la leche pasteurizada, la ultrapasteurizada y la leche comúnmente llamada de larga vida o leche esterilizada. El mercado de la leche fluida en Europa está dividido entre la leche fresca pasteurizada distribuida en cadena de frío y la

leche UHT distribuida a temperatura ambiente, según la legislación de la UE (EC milk Hygiene Directive 92/46/EEC). La proporción difiere entre países pero la tendencia es que la leche UHT sea cada vez más consumida es debido a la conveniencia de almacenamiento y distribución. Sin embargo en muchas zonas este tipo de leche no ha tenido aceptación suficiente debido a que los consumidores perciben el sabor a cocido en la leche esterilizada (Zabbia y col., 2011). Por el mismo motivo la leche UP tiene presenta un gran potencial por sus propiedades organolépticas similares a las de la leche pasteurizada pero con una vida útil de varias semanas (Rysstad y Kolstad, 2006).

Las nuevas tecnologías de envasado se están desarrollando para procurar bebidas lácteas, fácilmente trasportables y listos para consumir en envases accesibles elaborados con cartones asépticos tetrapak o botellas de plástico de polietileno de alta densidad (que impide el intercambio de oxígeno) para consumo individual o fácilmente acomodables en un bolso o maletín. Los consumidores ahora pueden disfrutar de bebidas aromatizadas con fresa, chocolate, café con leche, con un sellado que se puede abrir fácilmente y que les acompañan en sus activos estilos de vida actuales.

La búsqueda de nuevas tecnologías de conservación de la leche fluida que aumenten la vida útil de la leche y mantengan su características sensoriales ha dado lugar a la investigación en tecnologías no térmicas que incluyen pulsos eléctricos (Bermudez-Aguirre y col, 2011), altas presiones hidrostáticas (Escobar y col., 2010), ultrasonido de alta intensidad (Cameron y col., 2010), campos magnéticos pulsantes (Sotelo y col., 2007) e irradiación (Corbo y col, 2009). Sin embargo estas tecnologías aún no están aprobadas legalmente y se necesita más investigación para poder introducir las comercialmente en los productos lácteos. En la actualidad las tecnologías emergentes usadas para en la conservación de la leche están basadas en la combinación de diferentes métodos de conservación, así por ejemplo además de las tecnologías convencionales que usan la refrigeración en combinación con la pasteurización en leche HTST y que garantizan a la leche un tiempo de vida útil de unos días o del envasado aséptico con la leche UHT que le garantiza unos meses sin refrigeración, se han incorporado técnicas de microfiltración, bacto-fugación o inyección de CO₂ en combinación con envasado aséptico que permite aumentar la duración de la leche UP hasta unos 45 días, obteniéndose la denominada UP-SEL o leche ultrapasteurizada de vida útil extendida (ultrapasteurized shelf-extended life).

En la conservación de la leche se han usado algunos aditivos químicos que resultan en la creación de ambientes indeseables para el crecimiento microbiano, como el azúcar en la leche condensada o la sal en las cremas de leche, antimicrobianos naturales como las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas (Balcienas y col., 2013), o sistemas naturales de la leche como la lactoperoxidasa, lactoferrinas o xantin-oxidasa. Sin embargo estos antimicrobianos naturales presentan aún muchas limitaciones legales y su uso no está aprobado salvo en determinadas circunstancias.

El uso de antimicrobianos naturales procedentes de plantas en la leche está siendo estudiado recientemente. Como ejemplos se encuentra el trabajo realizado por Amalaradjou y col., 2009 sobre el efecto antimicrobiano del cinamaldehído sobre *Enterobacter sagazaki* en leche maternizada, el efecto sinérgico obtenido por la combinación de la vainillina o la canela y las altas presiones para pasteurizar una bebida láctea (Pina-Perez y col., 2009) o el estudio realizado por Ettayebi y col., 2000, sobre la actividad antimicrobiana resultante de la combinación de nisina y thymol sobre *Bacillus subtilis* en leche. Tserennadmid y col., 2011 encontraron que combinaciones de salvia, limón y mejorana inhibieron el crecimiento microbiano de ciertas especies de levaduras en la leche descremada. Turki y col. (2008) encontraron que los AEs de orégano, mejorana, salvia y regaliz presentaron efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *Bacillus subtilis* en leche.

1.4.2 Envases

En la actualidad la tendencia en el mercado de las bebidas lácteas pasteurizadas es extender sus redes de distribución y poder comercializar las bebidas en sitios donde antes pareciera impensable, como en los colegios y sistemas de dispensación automáticos. Esto se ha conseguido Parcialmente debido a los productos de mayor vida útil que están saliendo actualmente en el mercado. De nuevo gracias a las nuevas tecnologías de procesamiento y envasado aséptico los nuevos productos de leche fluida tienen garantizado periodos de caducidad muy grandes que permiten acceder a puntos de venta antes inalcanzables, aumentando la red de distribución y favoreciendo ampliamente no solo el sector de los consumidores, sino de distribuidores, procesadores y comerciantes de estos productos.

El envase cumple una función muy importante: proteger el alimento de una manera segura y eficiente desde el momento en que se elabora hasta que se consume. El envase por lo tanto debe garantizar al alimento: protección de la luz, microorganismos, el aire y el ambiente. Los envases deben garantizar una conservación adecuada, deben proveer la información suficiente sobre ingredientes, cantidades, valores nutricionales, vida útil, y deben ser manejables, prácticos y livianos.

Los envases utilizados en la industria láctea están evolucionando de acuerdo a estos conceptos. En general los que más adelantos e innovaciones han experimentado han sido aquellos destinados a los productos UHT y los dirigidos a conservar leches ultrapasteurizada de larga vida útil (UP-ESH), así por ejemplo las técnicas de envasado aséptico en envases estériles garantizan que el producto después de una ultrapasteurización tenga una vida útil de más de 60 días después en refrigeración. En estos últimos procesamientos la combinación de envasado en ambiente estéril en envases previamente esterilizados (envasado aséptico) garantiza productos de mayor conservabilidad. En general los cartones asépticos Tetra-Pack[®] o botellas de plástico de polietileno de alta densidad HDPE, están dominando las últimas tendencias en el envase de la industria láctea. Un envase tetra-pak está elaborado con tres materiales básicos, papel (75%), polietileno (20%) y aluminio (5%), cuya combinación provee un material con óptimas propiedades, que garantiza alto grado de seguridad, higiene y retención de nutrientes, conserva el gusto y la frescura y es poco pesado. Para garantizar la máxima vida útil en estos productos las botellas de HDPE se han innovado con una estructura de tres capas, con una coloreada en negro intermedia que impide la transmisión de la luz y mantienen los aromas y el sabor por más tiempo. Actualmente las botellas de HDPE están alcanzando una posición de ventas muy alta en el mercado frente a los cartones Tetra Pack^R.

Las nuevas tecnologías de envasado se están desarrollando para procurar bebidas lácteas de productos, fácilmente transportables y listos para consumir en envases accesibles, para consumo individual o fácilmente acomodables en un bolso o maletín. Este tipo de productos está teniendo una amplia aceptación en los mercados estadounidenses y en general a escala mundial. Los consumidores ahora pueden disfrutar de bebidas aromatizadas con fresa, chocolate, café con leche, con un sistema de cierre que se puede abrir fácilmente y que les acompañan en sus activos estilos de

vida actuales. Actualmente la industria láctea necesita llegar a un sector del mercado que esta mostrando un crecimiento en lo últimos años: niños y adolescentes. El gran reto es como comercializar la leche en las escuelas, con envases individuales y anuncios llamativos. Tetra Pack se ha dado cuenta de esta gran oportunidad y está trabajando en diseños de envases que sean de fácil uso (convenience foods) y que se vendan fácilmente en este sector de consumidores

1.4.3 Bebidas lácteas funcionales

El rápido auge de los alimentos funcionales y la incorporación de ingredientes biológicamente activos han permitido también ampliar enormemente las posibilidades del mercado de la leche fluida. La innovación en la elaboración de bebidas lácteas es una herramienta fundamental para revertir la tendencia en la disminución de las ventas en leche fluida y frenar su consumo.

La producción de bebidas lácteas con alto valor añadido, que combinan diferentes ingredientes, sabores y texturas ha sido una de las áreas en que la industria láctea se ha diversificado para aumentar las ventas y cubrir las necesidades particulares de cada cliente. Bebidas innovativas basadas en la leche están continuamente saliendo al mercado y son responsables del aumento en las ventas de este tipo de productos. Los consumidores saben que beber leche es bueno para la salud, pero con nuevas formulaciones, y nuevos sabores, estarán mucho más dispuestos al cambio. Así por ejemplo, los consumidores buscan actualmente consumir leches bajas en grasa y esto en general disminuye su sabor, sin embargo se ha comprobado que la adición de fibra a las leches lácteas desnatadas parece mejorar su consistencia y sabor, haciéndola más parecida al natural. En los últimos años, tratando que la leche no fuera una bebida tan monótona, se han introducido en el mercado leches con mayor contenido de sólidos, lo cual potencia el sabor y les aumenta su valor nutricional, siendo muchos los consumidores que pagan un plus por este producto.

Como ejemplos representativos de esta tendencia en el consumo de bebidas lácteas funcionales, una nueva bebida que está aumentando en ventas entre los estudiantes y adolescentes de EEUU es una bebida láctea de tres sabores, enriquecida con cafeína, en la misma cantidad que pudiera tener una Coca Cola[®]. En Europa

destacan una enorme variedad de bebidas lácteas combinadas con zumos de frutas y aromatizadas con diferentes sabores, que aumentan la gama de productos basados en leche que se ofrecen al consumidor.

Conseguir el peso saludable con los productos lácteos ha sido el centro de campañas publicitarias lanzadas al mercado con tremendo éxito. Las bebidas lácteas bajas en carbohidratos las cuales son esencialmente leche con menos lactosa y más proteínas, sin azúcar añadido, con edulcorantes o sin colores artificiales se han unido con otros diseños de leche: leches fortificadas en calcio, e incluso leche con proteína de soja. Otro ejemplo de preparados lácteos dirigidos a combatir el sobrepeso lo encontramos en la leche con Tonalin o ácido linolénico conjugado, comercializada por la compañía Central Lechera Asturiana en España.

Ejemplos de productos que han redimensionado el mercado de las bebidas lácteas los encontramos alrededor del mundo en leches enriquecidas en calcio o en ácidos grasos omega 3. Estudios animales han demostrado las propiedades beneficiosas de los omega 3 para prevenir el cáncer y reducir el colesterol. New Zealand Milk, recientemente introdujo Herat Wise, una bebida baja en colesterol y grasa, enriquecida con ácidos grasos omega 3, para ayudar a mantener la salud del corazón. En España la compañía Puleva comercializa una línea de productos enriquecidos con este ácido graso.

En Corea del Sur se comercializa leche fortificada con lactoferrina, calcio de leche y bifidobacterias. También se comercializan con éxito leches maternizadas con lactoferrina, péptidos biológicamente activos (ej. glycomacropeptidos), vitamina C y hierro. La lactoferrina es una proteína del suero ligadora del hierro que incrementa su absorción, exhibe propiedades antimicrobianas contra una amplia variedad de microorganismos y aumenta las propiedades del sistema inmune. Los péptidos bioactivos producidos a partir de la hidrólisis o de la fermentación de las proteínas de la leche tienen numerosas propiedades beneficiosas, entre las cuales encontramos que bajan el colesterol o reducen la presión de la sangre. Los glicomacropeptidos (GMP) son péptidos derivados de la caseína encontrados en el lactosuero que tienen demostradas propiedades inmunológicas, son fuente de proteína libre de fenilalanina y puede ser útiles para tratar personas con fenilketonuria. En países tales como Francia y Scandinavia las compañías de alimentos usan GMP para bajar el peso, aludiendo que el

GMP es un estimulador de la colescystokinina, un supresor de la hormona del apetito. De efectos digestivos saludables, estilos de vida activos, beneficiosos para el corazón están entre las plataformas que utilizan las compañías que mercadean los productos lácteos. Los probióticos son los ingredientes básicos entre los productos que se promueven como digestivos saludables. En este amplio ya encontraríamos las leches fermentadas que contienen microorganismos *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bijdus* y *Lacotbacillus casei*. También contienen inulina para ayudar al mantenimiento de los cultivos en el intestino. En este último rubro en España se comercializan actualmente las leches enriquecidas con benecol, un fitosterol útil para reducir el colesterol. Cuando se trata de promover la salud de los niños, el calcio es indispensable como nutriente esencial. En Europa y Estados Unidos también se mercadean leches enriquecidas con calcio, vitaminas A y D, dirigidas a niños y adolescentes, que están en los primeros años de construcción de huesos.

Por último destacan una enorme variedad de bebidas lácteas combinadas con zumos de frutas y aromatizadas con diferentes sabores, que aumentan la gama de productos basados en leche que se ofrecen al consumidor. A las bebidas aromatizadas tradicionales de vainillina, fresa, chocolate, plátano, canela y limón, también se están incorporando nuevos sabores como por ejemplo galletas con crema o chocolate.



Figura 14. Nuevas tendencias en envases y bebidas en el mercado lácteo.

1.5 Microorganismos patógenos de interés en la leche pasteurizada

1.5.1 *Listeria monocytogenes*

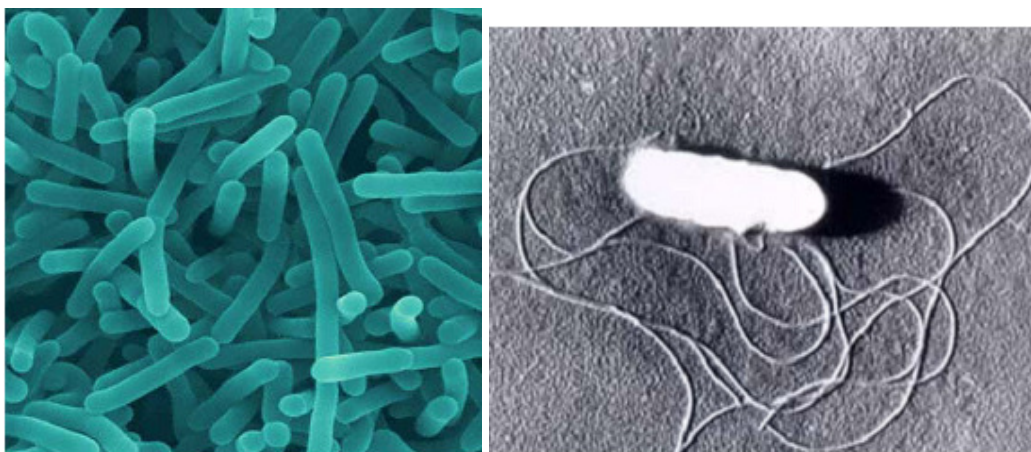


Figura 15. *Listeria monocytogenes*

La bacteria patógena *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram + anaeróbico facultativo, no esporulado causante de la listeriosis, enfermedad con alta tasa de hospitalización y con alto índice de mortalidad (20-30 %). Las diversas manifestaciones clínicas asociadas a la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva, la primera deriva en la invasión de partes del organismo como el útero grávido, el sistema nervioso central o la sangre. La listeriosis no invasiva causa gastroenteritis aguda, con fiebre y se autolimita en personas sanas. El género *Listeria* consiste seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, y *L. gravi*, de las cuales sólo *L. monocytogenes* es patógena para el ser humano, aunque se han registrado enfermedades producidas por *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. innocua* (Jeyaletchumi y col., 2010). Los ancianos, mujeres embarazadas, recién nacidos y poblaciones inmunocomprometidas son las más susceptibles a la listeriosis, la cual se manifiesta con un largo periodo de incubación, que hace difícil identificar al patógeno y el alimento contaminado. A pesar de presentarse con baja frecuencia, debido a la severidad de la enfermedad en la actualidad es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos que causa mayor preocupación (FDA/ CFSAN, 2013).

En EEUU se registran anualmente aproximadamente 1.600 casos de listeriosis, más de 1.400 hospitalizaciones y 250 muertes (Scallan y col., 2011). En Europa según los datos registrados por el EFSA-ECDC (2011) en el año 2011 se confirmaron 1.476 casos de listeriosis, con 604 hospitalizaciones y 134 muertes. Entre 1995 y 2009, en la literatura disponible, se reportaron en el mundo 11 brotes, con 545 personas afectadas de listeriosis asociada al consumo de quesos, con tasas de mortalidad entre el 14% y 30% y de hospitalización de hasta el 100%. En la Unión Europea (UE), entre 2004 y 2008, se estimaron 0,3 casos por cada 100.000 habitantes

Esta bacteria muestra relativa resistencia a las condiciones ambientales adversas comparada con otras bacterias no esporuladas. Es capaz de crecer bajo extremas condiciones acídicas (4,5 a 9), soportar altas concentraciones de sal (>13%) y en un amplio rango de temperatura (0,4 - 46 °C) por extensos periodos de tiempo, debido a varios mecanismos de adaptación que han sido demostrados. Estas propiedades se han atribuido a varios mecanismos, bien estudiados como son: cambios en la composición de la membrana (aumento de la proporción de los ácidos grasos no saturados, los cuales favorecen la fluidez de la membrana citoplasmática (Beales, 2004), acortamiento de la longitud de la cadena de los ácidos grasos (una disminución en C_{17:0}) y cambios de isómero (i-C_{15:0} a C_{15:0})), cambios en la expresión genética y producción proteínas de shock, (Lui y col ., 2004), acumulación de solutos como glicina, betaina, carinitina, los cuales actúan como crioprotectores (Angelidis y Smith, 2003), inducción de un factor general de stress : sigma (σ^B) que hacen posible cambios en la transcripción de genes relacionados con la resistencia microbiana, empleo de varios sistemas enzimáticos específicos como la FoF1-ATPasa o la glutamato descarboxilasa, involucrados en el mantenimiento de la homeostasis interna de la célula (Yoshida y col. 2001).

La resistencia antimicrobiana en *Listeria* es un tema emergente en los últimos años. Numerosos estudios han mostrado que numerosas especies de *Listeria* aisladas de humanos o de la cadena alimentaria son resistentes a uno a varios antibióticos (Prazak y col , 2002). La resistencia a antimicrobianos y desinfectantes usados en industria de los alimentos también está en aumento y es un tema de gran preocupación, especialmente por la capacidad de adherirse a las superficies y formar biofilms (Borucki y col., 2003). *L. monocytogenes* también ha desarrollado resistencia a las bacteriocinas, entre ellas la

nisina usada como conservante en la industria láctea y cárnica para el control de patógenos. El uso de métodos de procesamiento combinado, que se enfoquen en destruir los mecanismos que permiten a *Listeria spp* sobrevivir en condiciones adversas de baja temperatura, pH ácido o alta presión osmótica supone en los últimos años una esperanza para acabar con el peligro que representa este microorganismo.

L. monocytogenes debe considerarse como una bacteria ubicua medioambiental que se encuentra en el intestino de animales y personas que actúan como portadores y, también está ampliamente distribuida en ambientes naturales como suelo, agua, efluentes, pastos y ensilados donde sobreviven durante períodos extensos de tiempo. Hay también indicios de que la bacteria reside en el intestino humano sin sintomatología del 2 al 10% de la población. La transmisión al hombre se produce fundamentalmente mediante el consumo de alimentos que se han contaminado durante su producción y elaboración. Además de encontrarse en la mayoría de las materias primas (carne, leche, pescado fresco, frutas y verduras, huevos) las condiciones de procesamiento más suaves que prevalecen hoy en día en la industria alimentaria favorecen que *L. monocytogenes* esté presente con alta probabilidad en los productos listos para el consumo como las carnes crudas fermentadas, ensaladas preparadas, derivados lácteos y pescado ahumado en crudo. Actualmente En EEUU la FDA (Food and Drug Administration) tiene una política de tolerancia cero para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo en Estados Unidos. En la UE se permite una concentración de 100 ufc/ml en alimentos que no están dirigidos a infantes o poblaciones vulnerables o en productos listos para el consumo que no permitan el crecimiento de esta bacteria. La U.S. FDA (The United States Food and Drug Administration), el Centro para Nutrición y la Seguridad Alimentaria (CFSAN), junto con el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) y el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) han realizado un análisis de riesgo para la salud pública para determinados alimentos listos para el consumo, los cuales se han clasificado en varias categorías de acuerdo a la probabilidad de que estos alimentos estén contaminados con *L. monocytogenes* y provoquen listeriosis o muerte asociada con su consumo (FDA/CFSAN, 2003). Los alimentos de riesgo son aquellos que presentan ingredientes que facilitan el desarrollo de *L. monocytogenes* son alimentos, permanecen durante mucho tiempo en refrigeración y con posibilidades de contaminación cruzada.

La leche y sus derivados, quesos, mantequillas y bebidas lácteas son alimentos considerados de riesgo y han sido responsables de gran número de brotes en los últimos años (Tabla 2). La prevalencia de *L. monocytogenes* en leche cruda es del 2,5-6 % en Europa y del 7-12% en USA (Latorre y col., 2010; Kessel y col., 2011). La leche pasteurizada presenta riesgo moderado reproducir listeriosis de acuerdo a un análisis de valoración de riesgo para los alimentos listos para el consumo realizado por la FDA. En esta categoría se incluyen leche de cabra y vaca, leches chocolatadas y otras leches malteadas. En este estudio de valoración de riesgo también se toman en consideración la cantidad de este producto que es consumido diariamente y la vulnerabilidad de la población que la consume.

La presencia de *L. monocytogenes* en leche se debe al contacto directo con fuentes de contaminación del ambiente de la granja y a la excreción por la ubre del animal infestado. Condiciones normales de pasteurización (Doyle y col., 1987) garantizan la total destrucción de *L. monocytogenes*. Entonces ¿porque la leche pasteurizada sigue siendo una preocupación de la industria láctea? Hay varias razones:

- 1) aparición de brotes de la enfermedad en humanos por el consumo de leche pasteurizada
- 2) posibilidad de entrada de leche cruda contaminada con *L. monocytogenes* en las plantas de procesamiento de leche que puede llevar a la persistencia de este patógeno, con la contaminación subsiguiente de los productos lácteos procesados.
- 3) una pasteurización inadecuada o fallida.

Algunos estudios han demostrado también que las condiciones normales de pasteurización a veces son insuficientes: Saunder y col. (2005), Jayamanne y Samarajeewa (2010) encontraron que la termorresistencia de *L. monocytogenes* aumenta cuando se encuentra en poblaciones entre 10^5 y 10^6 cfu/ml. Estos autores también han demostrado que *L. monocytogenes* puede existir dentro de los leucocitos polimorfonucleares y sobrevivir dentro de estas células a altas pasteurizaciones. Otros factores que incrementan la resistencia térmica de este patógeno son el contenido graso de la leche, siendo mayor en leche entera que descremada (Schobitz y col., 2001) y la incorporación de chocolate y azúcar, compuestos que favorecen el crecimiento y mantenimiento de *L. monocytogenes* en la leche (Kenendy y Beuchat, 2004). Se ha encontrado también que *L. monocytogenes* presenta mayor resistencia a altas

temperaturas, mientras mayor sea su permanencia en la leche cruda bajo condiciones de refrigeración (Pitt y col, 1999) o si se expone a temperaturas subletales previo tratamiento térmico (Farber y col., 1992).

Un efectivo control de la temperatura durante el transporte y el almacenamiento es también muy importante para asegurar la inocuidad de la leche pasteurizada pues la posibilidad de crecimiento de este patógeno en leche a temperaturas de refrigeración ha sido demostrada por estudios experimentales (Allavi y col. 2001). Sin embargo estas condiciones caen fuera de la responsabilidad directa del productor y las medidas de control son muchas veces insuficientes (Kennedy, 2005). Estos fallos en el control de la temperatura pueden permitir que las poblaciones de *L. monocytogenes* alcancen niveles $> 10^2$ ufc/ml, poniendo en peligro la salud del consumidor.

Tabla 2. Principales brotes de listeriosis debido al consumo de leche o queso a nivel mundial en los últimos años

Año	Casos/Muertes	Alimento	País	Referencia
1983	49/18	Leche pasteurizada	EEUU	Fleming y col 1983
1983	122/34	Queso	Suiza	Bula y col.,1995
1985	142/48	Queso	EEUU	Linnan y col.1995
1995	36/0	Queso	Francia	Goulet y col.,1995
1994	45/0	Leche pasteurizada	EEUU	Dalton ycol.,1997
2000-01	12/0	Queso	EEUU	Boggs ycol.,1997
2002	17/0	Queso	Canada	Gaulin y col.,2003
2005	10/3	Queso	Suiza	Bille y col 2006
2006-07	75/13	Queso	Rep. Checa	EFSA, 2006
2006	189/25	Queso	Alemania	Koch y col.,2010
2007	5/3	Leche pasteurizada achocolatada	EEUU	CDCP, 2008
2008	69/0	Queso	Chile	Noriegay col., 2008
2009	14/0	Queso	Austria/Alemania	Fretz y col.,2009
2012	20/4	Queso	EEUU	CDCP, 2012

Fuente:

Foodborne Illness Outbreak Database (<http://www.outbreakdatabase.com>)

CDC Database (<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>)

CSPI's Database (<http://www.cspinet.org/foodsafety/outbreak/pathogen.php>)

1.5.1 *E. coli* O157:H7

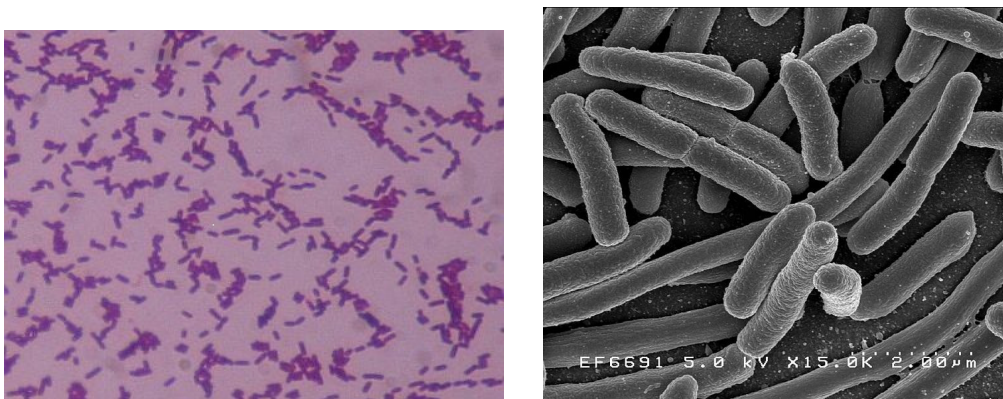


Figura 16. *E. coli* O157:H7

Escherichia coli es un bacilo Gramnegativo de la familia Enterobacteriaceae comúnmente encontrado en el intestino de los humanos y animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son benignas y forman parte de la flora normal del intestino, sin embargo otras son patógenas y pueden causar serias enfermedades. Seis grupos bien definidos son catalogados como patógenos con base a criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa o enteroadherente (ECEAgg o ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* shigatoxigénica (ECST), dentro de las que se encuentra *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). Cada uno de estos grupos tiene factores de patogenicidad específicos que sirven para su identificación y clasificación, así como diferentes serotipos basados en los antígenos O y H (Tamaki y col., 2005).

ECST ha recibido diversas designaciones, una de ellas es *E. coli* verotoxigénica (ECVT), nomenclatura que le fue dada, haciendo mención a que la bacteria produce una citotoxina con actividad sobre las células Vero (108, 109), la otra denominación empleada es *E. coli* shigatoxigénica (ECST), o productor de toxina Shiga Stx. Estas diferentes denominaciones que le ha dado la literatura, han generado confusión, pero en ambos casos (ECVT y ECST), se está refiriendo al mismo "patotipo", es decir, productoras de una o más toxinas de la familia Stx, una toxina con características similares a la que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1. El término *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), del cual está ampliamente estudiado el serotipo O157:H7,

fue asignado a las cepas que ocasionan colitis hemorrágica (CH), y síndrome urémico hemolítico (SUH), que a su vez sintetizan Stx, causando lesiones A/E (adherencia y esfacelación) sobre las células epiteliales, y poseen un plásmido de 90 Kb que codifica para una enterohemolisina. Por lo tanto, ECEH pertenece a un subgrupo de ECST, e incluye una connotación clínica importante, ya que no todas las ECST son patógenas, mientras que todas las ECEH sí lo son (Nataro y col., 1998).

ECST es un patógeno emergente en Norteamérica, Europa, Japón Nueva Zelanda y también se ha encontrado en países de América Latina como México, Chile, Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela. El grupo ECEH comprende un conjunto de *E. coli* patógenas, que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos. Las *E. coli* enterohemorrágicas son ECVT que poseen factores de virulencia adicionales. Una característica fundamental que se encuentra en la ECEH, pero que no es exclusiva de estos organismos, es la capacidad para causar lesiones de adherencia/destrucción (A/E) en el epitelio intestinal humano. Los síntomas de la enfermedad causados por EHEC incluyen calambres y diarrea que en muchos casos progresan a diarrea sanguinolenta, con vómitos y fiebre en algunos casos. El periodo de incubación puede oscilar entre 3 y 8 días, con una media de tres a cuatro días. En ocasiones, la colitis hemorrágica deriva en síndrome urémico hemolítico (SUH), una causa importante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos. En los ancianos, la tasa de letalidad por el SUH puede elevarse al 50%. La *E. coli* O157:H7 (ECEH O157:H7) ha sido reconocida como la causa de este síndrome desde la década de 1980. La dosis infectiva es muy baja, entre 10 y 100 células, lo cual incrementa el riesgo de contraer la enfermedad. Sin embargo las infecciones con ECEH de otros serogrupos, incluyendo miembros de O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128 y O145, se reconocen cada vez más como las causas de colitis hemorrágica y SUH. Algunos de estos organismos pueden ser tan importantes en la enfermedad de los humanos como la ECEH O157:H7; sin embargo, no son reconocidos en los medios que se utilizan para aislar este organismo, y muchos laboratorios no realizan exámenes de rutina para detectar otras cepas (Rodríguez-Angeles, 2002)

Los reservorios de la ECEH O157:H7 son los rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, que se infectan sin presentar síntomas y eliminan el organismo en las heces. Otros animales como conejos y cerdos también pueden transportar este organismo. Los humanos adquieren la ECEH O157:H7 por contacto directo con los

portadores animales, sus heces y el suelo o agua contaminados, o a través de la ingestión de carne molida mal cocida, otros productos derivados de animales o vegetales y frutas contaminadas. En el ambiente de hatos bovinos *E. coli* O157:H7 puede persistir por varios años. La cama de los animales, canales de agua y el estiércol pueden ser también fuentes de *E. coli* O157:H7. Estos patógenos fecales pueden entrar al ambiente a través de las deposiciones directas a la tierra o a través de la escorrentía superficial de la materia fecal depositada en los suelos, sobre todo después de fuertes eventos de lluvia. De acuerdo a los datos suministrados por el Centro de Enfermedades las brotes producidas por ECEH han ido en aumento en los últimos años, causando alrededor de 73.000 enfermedades al año en EEUU (CDC, 2011). En Europa, de acuerdo a la EFSA, en el año 2011 se confirmaron 9.458 casos de infecciones por ECEH, lo cual supuso un incremento de 4-5 veces comparado con el 2.010. De los casos en los cuales el serogrupo se conocía, la mayoría fueron causados por el serogrupo O157. Sin embargo en 2.012, 1.064 casos fueron sin embargo pertenecientes al serogrupo O104, debido al brote que se produjo en Alemania atribuido al consumo de germinados.

Las ECEH se transmiten por vía fecal–oral. Se pueden propagar entre animales por contacto directo o a través de bebederos, alimento compartido, lugares de pastaje contaminados u otras fuentes ambientales. Las aves y las moscas son vectores potenciales. La ECEH O157:H7 se transmite principalmente a los humanos a través del consumo de alimentos y agua contaminados, o por el contacto con animales, heces y suelo contaminado. La transmisión de persona a persona puede contribuir con la propagación de la enfermedad durante los brotes; sin embargo, los humanos no parecen ser huésped de mantenimiento de este organismo. La mayoría de los casos en humanos han estado vinculados con el contacto directo o indirecto con el ganado bovino, pero algunos han estado asociados con otras especies, entre ellas ovejas, cabras (leche de cabra no pasteurizada), cerdos (salami de cerdo fermentado), ciervos, caballos, conejos y aves (Fegan y col. 2004; Callaway y col., 2009).

ECEH puede crecer en un rango de temperaturas entre 7 °C y 50°C, con un óptimo de 37 °C, algunas pueden crecer en alimentos ácidos, con pH por debajo de 4,4 y en alimentos con una actividad de agua de 0.95. Es destruida por calentamiento del alimento hasta que todas las partes alcanzan una temperatura de 71 °C o más. ECEH

O157:H7 puede permanecer viable por largos periodos en muchos productos alimenticios. Tolerancia a la acidez, y permanece viable de semanas a meses en alimentos ácidos tales como la mayonesa, salchichas, sidra de manzana y queso cheddar a temperaturas de refrigeración, se ha demostrado que puede sobrevivir durante 9 meses en carne molida almacenada a -20 °C. Además, resiste la desecación. (Doyle, 1991).

Las epidemias de ECEH O157:H7 de origen alimentario generalmente son causadas por la ingesta de productos de origen animal mal cocidos o no pasteurizados, en especial, carne molida pero también otras carnes y embutidos y leche y queso no pasteurizados. En la Tabla 3 se presentan los brotes más importantes de ECEH O157:H7 asociados con productos lácteos, generalmente leche no pasteurizada o quesos elaborados con leche cruda, sin embargo ha habido casos de contaminación postproceso. Otros brotes han estado vinculados a germinados de alfalfa o brotes de rábanos, lechuga, espinaca y otros vegetales contaminados, así como también sidra no pasteurizada. El agua de riego contaminada con heces es una fuente importante de ECEH O157:H7 en los vegetales. Este organismo se puede adherir a las plantas, y sobrevive bien en la superficie de una variedad de frutas, vegetales y hierbas culinarias frescas. De acuerdo con las condiciones ambientales, pequeñas cantidades de bacterias que permanecen en los vegetales lavados pueden multiplicarse de manera significativa durante varios días. ECEH O157:H7 puede internalizarse en los tejidos de algunas plantas, entre ellas la lechuga, donde es posible que no sea susceptible al lavado. Las moscas de la fruta pueden transmitir este organismo a las plantas, donde se pueden multiplicar en los tejidos dañados.

Una vez que *E. coli* O157:H7 ha entrado al alimento, el único medio efectivo para eliminar ECEH de los alimentos consiste en la aplicación de calor. En la planta se puede destruir con numerosos desinfectantes, tales como hipoclorito de sodio al 1%, etanol al 70%, desinfectantes fenólicos o a base de yodo, glutaraldehído y formaldehído. Además, este organismo se puede inactivar por medio de calor húmedo (121 °C durante al menos 15 min.) o calor seco (160–170 °C] durante al menos 1 hora. Los alimentos pueden ser seguros, si se cocinan a una temperatura mínima de 71 °C. La radiación ionizante o el tratamiento químico con una solución de hipoclorito de sodio pueden reducir o eliminar las bacterias en los productos alimenticios.

Los antimicrobianos están siendo usados exitosamente para inhibir o destruir células de *E. coli* en los alimentos y aguas, así Rhaman y col., 2011, demostraron el efecto antimicrobiano de los extractos de lima, ajo y jengibre sobre células de *E. coli* en aguas. Sellim (2011), demostró el efecto antimicrobiano del aceite de tomillo, eucalipto, clavo y junipero en queso feta y carne de ternera. Kisko y Roller (2005) encontraron que el carvacrol y el p-cimeno inactivaban células de *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana, Burt and Reinders, 2003 encontraron efectos antimicrobianos de los AEs de orégano y tomillo frente a *E. coli* O 157:H7 y Moreira y col. (2007) demostraron el efecto antimicrobiano del AE de clavo y del árbol del té sobre *E. coli* O157:H7 en espinacas escaldadas y ternera.

Tabla 3. Brotes producidos por *E. coli* O157:H7 en productos lácteos

Año	Vehículo	Casos/Muertes	Localización	Referencia
1986	Leche de vaca cruda	2/0	EEUU	Hussein y Salcuma, 2005
1986	Leche de vaca cruda	74/0	Canada	Martin y col, 1986
1991	Yogurt	16/0	UK	Morgan y col.,1993
1992	Leche de vaca	1470	UK	Hussein y col. 2005
1994	Leche de vaca pasteurizada.	>100/1	UK	Roberts y col., 2000
2000	Leche de vaca cruda	6/0	UK	Anónimo
2001	Leche de vaca cruda	5/0	Canada	Keene y col. 2000
2001	Leche de vaca cruda	2/0	Austria	Allerberger y col., 2001
2002	Queso	13/0	Canada	Honish y col., 2005
2003	Leche cruda	9/0	Slovakia	Liptakova y col., 2004
2004	Leche pasteurizada	25/0	Dinamarca	Jensen y col., 2006
2005	Leche cruda	18/0	USA	Beecher , 2005
2006	Leche cruda	6/0	USA	CDCP, 2006
2008	Leche cruda	4/0	USA	CDCP,2008
2010	Queso	33/0	USA	CDCP,2010
2012	Leche cruda	3/0	USA	CDCP,2012
2012	Leche cruda	14/0	USA	CDCP,2012

Fuente:

Foodborne Illness Outbreak Database (<http://www.outbreakdatabase.com>)

CDC Database (<http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>)

CSPI's database: www.cspinet.org/foodsafety/outbreak/pathogen.php

1.6 Determinación de la termoresistencia de los microorganismos.

1.6.1. Métodos para estimar la destrucción microbiana

Hasta hace algunos años el clásico método de D y z desarrollado por Bigelow, Ball y Stumbo (Stumbo 1973) para caracterizar la destrucción microbiana como consecuencia de la aplicación de altas temperaturas es ampliamente aceptado. Este método asume cinéticas de primer orden como un modelo para describir la muerte de los microorganismos como consecuencia de un tratamiento a altas temperaturas. Al representar la variación del logaritmo del número de células sobrevivientes a un tratamiento térmico realizado a una temperatura dada en función del tiempo de tratamiento, se obtiene una gráfica del descenso del logaritmo de supervivientes que es lineal con el tiempo.

$$dN/dt = -kN$$

La recta tiene una pendiente que permite calcular la velocidad de termodestrucción. Se define el valor D como el tiempo necesario para que el número de supervivientes caiga al 10% del valor inicial (o lo que es lo mismo para que el logarítmico del número de supervivientes se reduzca en una unidad). Si se considera N_0 como el número de células al inicio del tratamiento y N_x el número de células supervivientes después de un tratamiento de t minutos a una temperatura T, el tiempo de termodestrucción se calcula de la siguiente manera: $D_t = x / \log(N_0/N_x)$, donde la magnitud D es el tiempo de reducción decimal ($D = 2,303/k$, unidades en minutos o segundos) y es entonces un recíproco de una constante de primer orden. La dependencia de la temperatura de D es usualmente expresada mediante el valor Z: el incremento de la temperatura que produciría una reducción de 10 veces en D y que puede relacionarse con la energía de activación mediante la siguiente fórmula: $Z = 2,303RT^2/EA$

El tiempo de destrucción (D) varía para cada temperatura de forma que a mayores temperaturas el valor D es menor y es diferente para cada microorganismo, distintos entornos y condiciones fisiológicas. Si se aumenta la temperatura de tratamiento el valor D disminuye de forma logarítmica. El valor z indica el incremento en la temperatura medido en grados necesario para que el valor D se reduzca a la décima

parte del inicial. $Z = \Delta T / [\log(Dt_1/Dt_2)]$, donde ΔT es el incremento de la temperatura y Dt_1 y Dt_2 , los valores de D a las dos temperaturas estudiadas. En los últimos años los estudios de termorresistencia han demostrado que las curvas de supervivencia pueden presentar concavidades hacia arriba o hacia abajo o ser sigmoides dependiendo de las características de la distribución de la sensibilidad al calor, complicando la cinética y reduciendo el valor de conceptos tan fácilmente entendibles como el tiempo D . Los hombros representan un periodo de tiempo en el que el microorganismo no es destruido tan rápidamente como en el periodo siguiente de muerte térmica. Las colas representan una velocidad de destrucción reducida (incrementan el valor D) en una hipotética subpoblación más resistente al calor. El daño al ADN ha sido identificado como el probable evento letal clave. Las desviaciones de la cinética logarítmico-lineal en la muerte térmica probablemente reflejen una mayor multiplicidad de sitios blancos para la inactivación térmica tales como la membrana citoplasmática, los enzimas esenciales, el ARN y los ribosomas. Este tipo de daño puede ser acumulativo más que instantáneamente letal. Es posible que los eventos de inactivación aislados no causen la muerte de la célula pero le infligirán un daño subletal que la hará más vulnerable a otros factores de estrés. Sin embargo, si se concede tiempo a las células dañadas en un medio no inhibitorio, son capaces de restablecerse y recuperar su viabilidad.

Otro factor que puede intervenir en las desviaciones del comportamiento logarítmico-lineal es que los microorganismos reaccionen y se adapten al régimen de calentamiento modificando su sensibilidad. En general, las temperaturas más bajas producen curvas no lineales más pronunciadas, con hombros y colas. Si las curvas son cóncavas, es decir la derivada del $\log_{10} (N(t)/N(0))$ con respecto a t , es decreciente, entonces los valores D que se utilizan para caracterizar la letalidad resultan conservadores, es decir estiman menos letalidad que la que realmente se obtiene. Sin embargo si las curvas son convexas, entonces los valores D representan letalidades sobreestimadas, más letalidad que la que realmente se obtiene. Una de las explicaciones a este fenómeno es que la población microbiana está formada por numerosas subpoblaciones, cada una con su propia cinética de activación, siendo la curva de supervivencia el resultado de numerosos modelos de inactivación.

Las curvas no lineales serían entonces una forma acumulativa de una serie de sucesos letales, la relación $\log_{10} S(t)$ vs t no es lineal y por lo tanto la curva de

supervivencia sería un reflejo de una cinética de diferente orden. Se han venido usando funciones que ajusten mejor estas curvas y que nos permitan estimar más fielmente los parámetros que caractericen la letalidad obtenida mediante la aplicación de un tratamiento térmico. La función modificada de Gompertz se ha usado para ajustar la inactivación térmica de *L. monocytogenes* (Chhabra y col., 2002). Una de las ventajas de esta función es que es capaz de modelar las curvas de supervivencia que son lineales y las que tienen hombro y cola. Una revisión de los modelos mecanísticos usados para ajustar estas curvas no lineales basadas en este concepto determinístico es hecha por Geereard y col. (2000).

Otro punto de vista a la inactivación microbiana es el considerar a los sucesos letales como probabilidades, es decir un simple microorganismos esta vivo o muerto debido a una causa letal tal como el calor y tal suceso letal es considerado como una probabilidad. La curva de supervivencia es entonces el resultado acumulativo de una distribución temporal de eventos de letalidad que dan lugar a curvas no lineales, donde la inactivación de los microorganismos se puede describir por una función de distribución. Considerando este punto de vista, habrá una distribución de tiempos de inactivación. Weibull es un modelo que representa este punto de vista probabilístico de la inactivación. Los resultados experimentales obtenidos nos dicen que modelo se puede ajustar mejor, la mayoría de las curvas que tienen una concavidad hacia arriba o hacia abajo o tienen un hombro o un “lag time” se pueden ajustar muy bien con Weibull (Boekel, 2002).

El modelo usado tiene dos parámetros, el parámetro escala δ (tiempo) y el de la forma p . Cuando $p > 1$, la curva presenta una concavidad hacia arriba, cuando $p = 1$ la curva es lineal y cuando $p < 1$ presenta una concavidad hacia abajo. Aunque el modelo Weibull es de naturaleza empírica, se puede obtener una relación del valor p con efectos fisiológicos, así $p > 1$ indica que las células remanentes se adaptan al estrés aplicado, mientras que $p < 1$ indican que las células incrementan el daño con el tiempo.

El modelo “log linear + shoulder” propuesto por Geeraerd y col., 2000, permite obtener mediante el parámetro S , la longitud del hombro de la curva de supervivencia, la cual se corresponde con la longitud de la fase lag y el valor D o tiempo de reducción decimal, a partir de los valores de K_{max} , de acuerdo a la ecuación $D = (1/\ln(10)) * k_{max}$

Existen numerosos estudios de la inactivación de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157H7 en bebidas con tratamientos térmicos o no térmicos, con o sin aditivos añadidos, en las cuales las curvas no lineales de supervivencia se modelan matemáticamente y se ajustan mediante los modelos anteriormente mencionados (Dallas y Hoover 2003; Periago y col., 2004; Hasani y col., 2005; Ferrante y col., 2007; Chen y col., 2003; Bruzul y col., 2008; Garcia y col., 2009).

1.6.1 Termorresistómetro

En la actualidad existen diversos métodos disponibles para estudiar la termorresistencia de los microorganismos se han descrito diferentes métodos que pueden clasificarse en directos e indirectos, de partícula y de mezcla, pero en ninguno de ellos se configura la simulación de rampas de calentamiento y de enfriamiento complejas ni de tratamientos térmicos completos, tanto discontinuos como continuos.

Los métodos de partícula son los denominados integradores tiempo-temperatura (ITTs). Se trata de partículas que se introducen en los alimentos para evaluar la intensidad del tratamiento térmico al que son sometidos. Más que métodos de determinación de resistencia se han empleado como sistemas para validar los tratamientos térmicos. Los métodos de mezcla pretenden reducir la fase de inercia del calentamiento de la suspensión de microorganismos al mezclar pequeños volúmenes de la misma con volúmenes mucho mayores de substratos precalentados. Existen distintos métodos de mezcla tales como el método del matraz, que se utiliza para microorganismos de baja resistencia o el método de Kooiman y Geers (1975), cuya limitación radica en el tiempo de inercia durante el enfriamiento.

En los métodos indirectos, la suspensión microbiana, introducida en finos capilares o en tubos de vidrio se calienta al ser éstos introducidos en un baño termostático a la temperatura de tratamiento. El principal inconveniente de estos métodos es el retraso inherente en el calentamiento y enfriamiento de las muestras, lo que impide su uso a temperaturas elevadas, en el rango UHT.

Los métodos directos son complejos, no permiten trabajar a temperaturas bajas (por debajo de 100 °C) y en la mayoría de ellos, no se puede trabajar con alimentos. Se trata

de termorresistómetros, o instrumentos diseñados para la determinación de la resistencia de los microorganismos al calor. Este instrumento permite la aplicación directa de un tratamiento térmico preestablecido, durante un tiempo determinado en condiciones controladas, a una muestra de alimento o a un medio sintético (Palop, 2007). Existen distintos tipos: Stumbo, 1948; Pflug y Esselen (1953); David y Merson (1990); de Campdem (David y Merson, 1990), TR-SC (Condón y col., 1989; Condón y col., 1993) o Mastia (Palop y col. 2003). Este último fue diseñado por los doctores Sala y Condón y su funcionamiento consiste en precalentar con una resistencia eléctrica dispuesta en un pequeño tanque el substrato donde se va a determinar la termorresistencia, que a su vez es homogeneizada con una hélice de agitación. El calentamiento de los microorganismos es instantáneo y los substratos pueden ser líquidos fluidos o viscosos, o líquidos con partículas. Su diseño permite trabajar desde temperaturas de pasteurización hasta temperaturas de la gama de UHT, así como esterilizar en su interior el substrato a emplear.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Equipos

Estufa BINDER (37 °C)

Estufa BINDER (5°C)

Termorresistómetro Mastia (TR-SC) con algunas modificaciones: Tanque cilíndrico de acero, de 8,5 x 12 cm, con tapa de rosca provista de una junta tórica para lograr un cierre hermético, revestido con un forro aislante. En la tapa se ubica un septo de silicona, a través del cual se inoculan las cepas bacterianas por inyección, un tubo de muestreo, una resistencia eléctrica para el calentamiento del substrato, un termopar, una hélice y una válvula de tres vías conectada a la fuente de presión (una botella de aire comprimido). Su funcionamiento consiste en el precalentamiento con una resistencia eléctrica dispuesta en un pequeño tanque de aproximadamente 300 ml de capacidad, donde se va a determinar la termorresistencia del microorganismo objeto de estudio. Su diseño permite trabajar desde temperaturas de pasteurización hasta temperaturas de la gama de UHT (135,8°C), así como esterilizar en su interior el substrato a emplear.

La resistencia eléctrica se controla tanto manualmente como con un controlador proporcional para mantener estable la temperatura. La hélice está acoplada a un motor eléctrico de velocidad variable. Cuando se estabiliza la temperatura del substrato, manteniéndose una agitación continua con la hélice a 2500 rpm, se inocula por inyección a través del septo de silicona hasta 2 ml de la suspensión bacteriana. La agitación rápida logra una distribución homogénea del inóculo y un calentamiento casi instantáneo del mismo. Mediante un sistema de aire comprimido se extraen alícuotas a intervalos regulares se van tomando muestras de forma automatizada que se recogen en tubos estériles y se enfrían en un baño de hielo para su posterior siembra en medio de cultivo, incubación y por último el recuento de microorganismos supervivientes al tratamiento térmico.

El termorresistómetro de Sala y Condón (TR-SC) lleva acoplado también un electrodo de medición del pH, sin embargo el termorresistómetro en el que se realizó este trabajo no está provisto de electrodo de pH, aunque se le puede adaptar.

En el termorresistómetro usado en este estudio la construcción es totalmente metálica en acero inoxidable con tres patas en lugar de un mueble de madera y un acoplamiento mediante cables externos de los diferentes módulos de control, lo cual permite introducir el aparato en el interior de una cabina de flujo laminar dejando en el exterior el sistema de control. Esto es particularmente útil para trabajar con microorganismos patógenos



Figura 17. Termorresistómetro usado en los estudios de inactivación térmica

2.1.2 Medios de cultivo

Agar Bacteriológico Tipo Europeo, Cultimed (Barcelona, España)

Agar Tripticasa de Soja (ATS), Cultimed, (Barcelona, España).

Agua Peptonada Triptonada (APT), Cultimed, (Barcelona, España)

Caldo Tripticasa de soja (CTS), Cultimed, (Barcelona, España)

Agar Mac Conkey Sorbitol (Valdemorillo, Madrid, España)

Agar Palcam, Merck (Darmstadt, Alemania)

2.1.3 Leche

La leche utilizada para preparar las muestras fue leche pasteurizada El Prado (Cervera, S.L. Valencia, España), con pH entre 6.7-6.8 y 3.5, 2,5 y 0,3% de materia grasa. La leche se compró 1 día antes de que el experimento se realizara y 5 a 6 días antes de la fecha de expiración. Tubos estériles con 10 ml de leche se expusieron a vapor fluido por 30 minutos a 100°C y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. La esterilidad de las muestras se confirmó al inocular 1ml en Placas de Petri con ATS que se incubaron a 35 °C por 24 horas. Las muestras de leche se usaron para preparar las muestras con las diferentes concentraciones de antimicrobianos e inóculos en la leche.

2.1.4 Antimicrobianos de origen vegetal (AEs)

Los productos estudiados para evaluar su actividad antimicrobiana fueron los aceites esenciales de clavo, hojas de canela y hojas de canela suministrados por la compañía Soteal, S.A. (Murcia, España) y eugenol, cinamaldehído y vainillina (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).

2.1.4.1 Soluciones madre

CTS: Previamente a cada experimento se prepararon soluciones madre en caldo CTS (Cultimed, Barcelona, España) con 4.000 ppm, 3.200 ppm, 2.800, 2.400 ppm y 80 ppm de los aceites esenciales de hojas de canela, hojas de canela y de clavo y de los compuestos eugenol y cinamaldehído. Para la vainillina se prepararon soluciones patrón con, 8.000 ppm, 7.400, 5.600 ppm, 4.800 y 160 ppm. Para determinar estas concentraciones se hicieron experimentos preeliminares. El pH de las soluciones madre se ajustó a 6 y 7 con hidróxido de sodio y ácido cítrico y se esterilizaron por filtración a través de membranas estériles de 0.22 µm (Millipore, Maryland).

Leche: Basándose en los valores obtenidos para las MICs en CTS y de acuerdo a experimentos preliminares, se ensayaron en leche las siguientes concentraciones de los AEs antimicrobianos:

L. monocytogenes :

clavo y hojas de canela: 4.500, 4.000, 3.000, 2.000, 1.500, 1.000 y 500 ppm

hojas de canela: 2.000, 1.000, 500 y 250 ppm .

vainillina: 4.000ppm, 3.500 ppm, 2.500 ppm, 2.000 ppm y 1.500 ppm

E. coli O157:H7:

clavo y hojas de canela: 3.000, 2.000, 1.500, 1.000 y 500 ppm.

hojas de canela: 2.000, 1.500, 1.000, 500, 250 y 125 ppm.

vainillina: 3.000, 2.000, 1.500, 1.000 y 500 ppm.

Las soluciones madre se prepararon en tubos de ensayo con 10 ml de leche estéril y al doble de la concentración a ser ensayada. Los tubos se calentaron previamente a 50°C y se agitaron vigorosamente hasta conseguir la homogenización de cada antimicrobiano (Delakis y col., 2005).

2.1.5 Microorganismos e Inóculos

2.1.5.1 Cepas microbianas

Para todos los experimentos se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* Scott A suministrada por la FDA (Food and Drug Administration, EEUU), aislada de una epidemia humana, y una cepa de *E. coli* O157:H7 con el factor de virulencia eliminado, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las cepas se mantuvieron congeladas a -80°C en viales Microbank TM (Pro-labo Diagnostics, Neston , Wirrall, Reino Unido) y cada dos meses, de los viales se preparó un cultivo en CST, que se incubó por 24h a 35 °C. La cepa de *L. monocytognes* Scott A se sembró en placas de Agar Palcam y se incubó por 48 horas a 37 °C. La cepa de *E. coli* O157:H7 se sembró en placas de Agar Mac Conkey con sorbitol, que se incubaban por 48 horas a 37 °C. Una colonia obtenida en cada una de las placas se transfirió de nuevo a CST, que se incubó por 24 horas a 37 °C. De este cultivo se preparó una solución de glicerina (60%) y CST (40%) que se congeló -20°C y a partir de la cual se preparaban los cultivos frescos en CTS para los experimentos.

2.1.5.2 Preparación de inóculos

Los inóculos se prepararon estandarizando los cultivos de CST mediante un espectrofotómetro (Thermo Nicolet Evolution 300, Thermo Fisher Scientific S.A., Finlandia) hasta que se alcanzó una densidad óptica (DO) de 0,1 a 595 nm, a partir de las cuales se prepararon diluciones seriadas para alcanzar una concentración entre 2 y 5×10^6 UFC/ml de *L. monocytogenes* y *E. coli*. Para ello se estableció la relación entre la DO a 595 nm y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada patógeno mediante curvas de calibración establecidas previamente. Ambos, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 presentaron una relación linear entre la DO y el recuento de UFC dentro del rango escogido de DO entre 0,01 y 1,00. UFC/ml. Este nivel de inóculo fue confirmado mediante de diluciones decimales seriadas en agua de peptona tamponada y su posterior siembra y recuento en placas de agar Trypticase de Soja, las cuales se incubaron a 35 °C por 24 h.

2.1.6 Reactivos

-hidróxido de sodio y ácido cítrico (0.1 y 1N) esterilizados en autoclave

2.2 Actividad de los antimicrobianos en Caldo Trypticase de Soya

2.2.1 Diseño experimental

La determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Concentraciones No Inhibitorias (CNI) y Concentraciones Parcialmente Inhibitorias (CPI) se llevó a cabo mediante la metodología de microdilución recomendada por la (NCCLS, 2004), usando microplacas de 96 pocillos y un lector de DO (MultiScant Ascent, Thermo Fisher Scientific S.A., Finlandia). La DO en CTS con 0,15% de agar como agente estabilizante (Mann y Markham, 1998) se asoció directamente al crecimiento microbiano. El pH del CTS también se ajustó a valores 6 y 7 previamente a su esterilización. Para cada pH y cada microorganismo diana se prepararon dos tipos de microplacas:

1ª microplaca: los primeros pocillos de las 10 primeras columnas recibieron 300 µl de la solución madre. Todos los demás pocillos recibieron 150 µl de CTS con 0,30% de agar, de tal forma que 150 µl de la solución madre del primer pocillo se añadió al siguiente pocillo y se mezclaron, asumiendo series de dilución ½ hasta el final de la columna. Cada pocillo recibió 150 µl del inóculo (excepto controles negativos), de tal forma que la población final inoculada fue de $1-2,5 \cdot 10^6$ UFC/ml. Los pocillos de las columnas 11 y 12 recibieron 300 µl de caldo CTS con inóculo (control positivo) y sin inóculo con antimicrobiano y sin antimicrobiano (control negativo). Las microplacas se incubaron a 35 °C por 24 horas y se registraron los valores de D.O. cada hora. Previo a cada lectura de DO las microplacas se agitaron automáticamente durante 15 segundos.

2ª microplaca. Para cada antimicrobiano se preparó como blanco una segunda microplaca de la misma forma señalada anteriormente pero sin inóculo para obtener los cambios de DO en el tiempo caldo con antimicrobiano y sin inoculo.

2.2.2 Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y las Concentraciones No Inhibitorias basadas en el modelado de la Curva Dosis-Respuesta

Las CMI y las CNI de las curvas de crecimiento obtenidas mediante la representación gráfica de DO vs t, se determinaron mediante el modelado del área bajo la curva establecido por Lambert y Pearson (2000).

En primer lugar se determinó el área bajo la curva (ABC) para cada una de las concentraciones de antimicrobianos ensayadas usando la regla trapezoidal:

$$ABC = \Delta t * \left[\left(\frac{OD_1 + OD_n}{2} \right) + \sum_{i=2}^{n-1} OD_i \right] \text{ (Ec. 1)}$$

donde Δt es el intervalo de tiempo entre las observaciones de densidad óptica, DO_i es la densidad optica de la observación i^{th} , DO_n es la lectura de la densidad óptica final.

En segundo lugar se estableció el valor de la fracción del área bajo la curva (AF) tomando como referencia las áreas del control positivo y las del control negativo.

$$AF = \frac{(Area_{test} - Area_{cn})}{(Area_{cp} - Area_{cn})} \quad (\text{Ec. 2})$$

En tercer lugar se graficaron los datos del área bajo la curva en relación al control versus el log de la concentración correspondiente y la curva resultante fue ajustada mediante una ecuación modificada de Gompertz (Lambert y Pearson, 2000):

$$y = A + C e^{-e^{*(B*(t-M))}} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde $y = AF$ A es la asíntota inferior de y (aproximadamente cero), B es el parámetro de pendiente, C es la distancia entre la asíntota superior e inferior (aproximadamente 1) y M es el logaritmo de la concentración del punto de inflexión. Los valores de CNIs y CMIs se determinan como las intersecciones de las líneas $y=A+C$ e $y=A$, con la ecuación de la línea tangencial al punto $(M, (A+Ce^{-1}))$ respectivamente. Así:

$$CMI = 10^{\left(M + \frac{1}{B}\right)} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

$$CNI = 10^{\left(M - \frac{1,718}{B}\right)} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

Los valores A, C, B y M los proporciona el programa Sigma Plot al ajustar la curva.

2.2.3 Concentraciones Parcialmente Inhibitorias

Las concentraciones situadas entre la CMI y la CNI son denominadas Concentraciones Parcialmente Inhibitorias (CPIs). Las diferencias potenciales entre las DO_{595} de cada pocillo por individual debidas a las variaciones de DO iniciales se eliminaron al substraer la DO_{595} a tiempo 0 de los valores medidos durante las 24 horas de incubación, dando así los cambios netos en la DO_{595} para cada pocillo (Holowachuk y col. 2003). Las curvas obtenidas para las concentraciones de antimicrobianos

subinhibitorias más significativas se representaron gráficamente mediante el programa SigmaPlot y se ajustaron mediante la ecuación Gompertz (Barbosa y col., 1994):

$$ABS = A + C e^{-e^{*(B*(t-M))}} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde :

ABS = unidades de absorbancia (DO)

A= nivel inicial DO de suspensión bacteriana a tiempo 0

C= incremento en la DO cuando el tiempo tiende a infinito.

M= tiempo al cual la velocidad absoluta de crecimiento es máxima

B= velocidad relativa de crecimiento a tiempo M

Estos parámetros de Gompertz permiten calcular la duración de la fase de latencia (FL), la velocidad de crecimiento exponencial (VCE), el tiempo de generación (TG) y la máxima densidad de población (MDP) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\text{FL (horas)} = M - (1/B)$$

$$\text{VCE (horas)} = BC/e \quad (e=2,718282)$$

$$\text{TG (horas)} = \log_{10} e/BC$$

$$\text{MDP (DO)} = A+C$$

2.2.4 Concentraciones Mínimas Bactericidas

Las Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMBs) se determinaron por duplicado mediante varias series de tubos de ensayo con volumen final de 5 ml de CTS y pH ajustado a 7. Las concentraciones de los antimicrobianos fueron preparadas a partir de las soluciones madre y estas estuvieron en un rango entre 500-10.000 ppm, con incremento de 500 ppm entre concentraciones sucesivas. Los tubos se inocularon con poblaciones de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 para dar una concentración final de aproximadamente 10^5 UFC/ml y se incubaron por 24 horas a 35 °C. Posteriormente 100 µl de cada tubo se estriaron en placas de ATS. La CMB se definió como la concentración mas baja de compuesto ensayada que no permitió el crecimiento

bacteriano en CTS y que tampoco creció cuando se sembraron 100 µl en superficie en placas con TSA (Burt, 2004). Para poder ser más específicos con el valor de CMB se volvió a repetir el experimento para cada uno de los antimicrobianos con rangos de concentraciones más estrechas, con incrementos de 100 ppm.

2.3 Actividad de las combinaciones de antimicrobianos en Caldo Trypticasa de Soya.

El efecto antimicrobiano de concentraciones binarias de canela, corteza de canela, clavo, vainillina y de los compuestos eugenol y cinamaldehído sobre los microorganismos *L. monocytogenes* y *E. coli* O 157:H7 se determinó mediante una modificación de la metodología del tablero de ajedrez descrito por Delaquis y col. (2005).

2.3.1 Diseño experimental

A partir de las soluciones madres se prepararon en caldo CTS concentraciones superiores al doble de la CMI de los compuestos antimicrobianos previamente determinada por el método del área bajo la curva. De esta forma se ensayaron concentraciones por encima y por debajo de las CMIs de ambos antimicrobianos, consiguiendo un rango bastante eficaz de condiciones de inhibición combinada. Alícuotas de la primera solución se dispensaron en los pocillos de microplacas con incrementos de 10 µl a lo largo del eje horizontal. Alícuotas de la segunda solución se dispensaron a lo largo del eje vertical para obtener una serie de pocillos conteniendo 100 µl de una combinación de los dos antimicrobianos. Posteriormente cada pocillo se inoculó con un volumen de inóculo ($2-5 \times 10^5$ UFC/ml) de 100 µl, diluyendo a la mitad tanto el inóculo como las concentraciones de los antimicrobianos en la mezcla y el contenido se mezcló adecuadamente con una micropipeta.

Como control positivo se utilizaron pocillos con 100 µl de medio y 100µl de inóculo y como control negativo se utilizaron pocillos con medio de cultivo y pocillos con medio de cultivo más el antimicrobiano en cuestión.

Las placas se taparon y se incubaron a 35 °C por 24 horas. Se tomaron lecturas de DO al principio y al final del período de incubación. Se considero que los pocillos que

presentaban ausencia de crecimiento eran aquellos en los que la diferencia entre las DO entre la dos lecturas era inferior o igual a 0,1. El análisis de los pocillos sin crecimiento permite combinar los criterios del índice CFI (CFI_i) con la posición en el cuadrante del isoblograma para clasificar el resultado de la mezcla.

Tomando como referencia los valores de absorbancia se buscaron las condiciones frontera entre pocillos con crecimiento y pocillos con inhibición, definiéndole una *línea límite* entre la cual se observa inhibición a un lado de la placa y crecimiento en otro lado. La concentración mínima inhibitoria (CMI) para los antimicrobianos individuales y para las combinaciones binarias de las mezclas se definió como la concentración mínima necesaria para no producir cambios en DO superiores a 0,1.

2.3.2 Cálculo de las Concentraciones Inhibitorias Fraccionadas. Construcción de isobogramas

Con la información obtenida al analizar la línea límite se calcularon las Condiciones Inhibitorias Fraccionadas (CIF), valor que representan la CMI de un antimicrobiano en presencia de un segundo antimicrobiano. Las CIF de un antimicrobiano se calcula dividiendo la concentración que presenta en el pocillo límite entre su CMI individual. Esto sería para dos antimicrobianos A y B, sus CIFs serán:

$$CIF_A = \left(\frac{MIC_{A \text{ en presencia B}}}{MIC_A} \right) \text{ (Ec. 5)}$$

$$CIF_B = \left(\frac{MIC_{B \text{ en presencia A}}}{MIC_B} \right) \text{ (Ec. 6)}$$

En cada pocillo límite se calculan dos CIF, uno por cada antimicrobiano. Los dos valores CIF forman un par (x,y) que se puede representar en un sistemas de coordenadas cartesianas, que da lugar a un isoblograma o Figura 19 que nos da una información sobre la combinación de los antimicrobianos. Si la serie de los pares CIF se ajusta a la recta $y=-x+1$, es decir una recta que contiene los puntos (1,0) y (0,1), es indicativo de un efecto aditivo. La clásica interpretación del isoblograma establece que si los valores CFI caen por debajo de la recta la combinación entre los antimicrobianos es sinérgica y si caen por encima antagónica. Sin embargo, para estandarizar los valores interactivos

con una aproximación más adecuada, se utilizaron dos líneas adicionales, a los 0,5:0,5 y 4,0:4,0 que permiten comparar e interpretar los valores CIF y el del isoblograma con criterios más actuales (Vuuren and Viljoen, 2011). La combinación de los criterios del índice CFI con la posición en el cuadrante A, B, C o D del isoblograma permite clasificar el resultado de la actividad antimicrobiana de la mezcla de una manera más precisa.

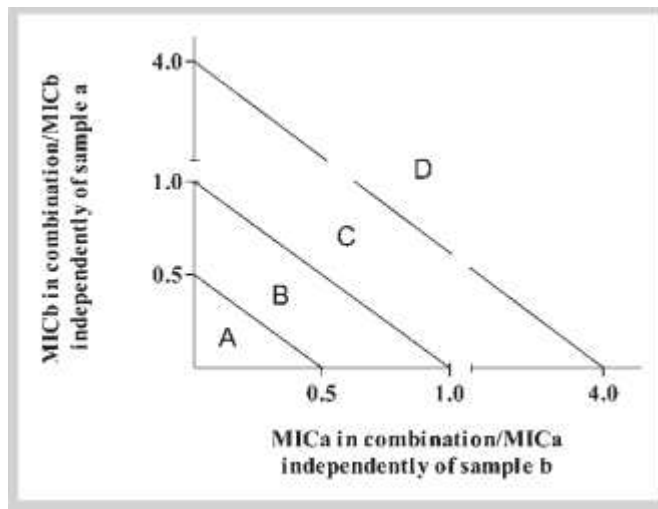


Figura 18. Interpretación de un Isoblograma.

Según el área donde se ubiquen los valores CIF de la mezcla el efecto es :

A: sinérgico, B: aditivo, C: indiferente y D: antagónico

Fuente : Vuuren and Viljoen, 2011

El índice CIF (CIF_i) se calcula sumando las CIFs de los antimicrobianos implicados en la mezcla. El CIF_i no tiene en cuenta la inhibición obtenida a lo largo de toda la línea límite y sólo las condiciones individuales.

Dados dos antimicrobianos A y B, el índice de cada combinación en la línea límite se calcula mediante la expresión:

$$CIF_i = CIF_A + CIF_B \quad (\text{Ec. 7})$$

Las CMI utilizadas para realizar el cálculo CIF_i fueron obtenidas independientemente como se ha explicado en epígrafes anteriores.

Para el cálculo del promedio del CIF_i existen diferentes métodos (Hsieh y col., 1993)

1. Media aritmética de todos los CIF_i a lo largo de la línea límite.
2. Media aritmética de los CIF_i máximo y mínimo de la línea límite.
3. CIF del primer antimicrobiano correspondiente al pocillo con el 25% de su CMI individual más el CIF del segundo antimicrobiano correspondiente al pocillo con el 25 % de su CMI individual.
4. Media aritmética de los CFI_i de los pocillos cercanos a $\frac{1}{2}$ de la CMI de cada antimicrobiano.
5. Media aritmética de los antimicrobianos más efectivos.

Sin embargo ninguno de ellos tiene prioridad sobre el otro. Diferentes autores introducen modificaciones para optimizar el resultado evaluando las condiciones que tienen más peso en el cálculo del efecto combinado y cuales son artefactos o alterantes del CFI_i .

En este trabajo se siguió el método número 5, porque según Hsieh y col, (1993) las concentraciones de antimicrobianos que se aproximan a la mitad de sus respectivas CMI son más informativas que el resto. Asimismo, en los casos en los que apareció más de una condición límite con un antimicrobiano en concentración fija y otro en concentración variable, se eligió el de la menor concentración de antimicrobiano variable siguiendo la modificación propuesta por Sing y col., (2000).

Para la interpretación de los resultados se siguió el criterio establecido por Odds (2003): La combinación tiene efecto sinérgico si el CFI_i es $< 0,5$, es aditiva si CFI_i es $>0,5-1$, indiferente cuando $1.0 < CFI_i < 4.0$ y antagónica cuando $CFI_i > 4.0$. Se realizaron dos ensayos por cada combinación de antimicrobianos. Los isobogramas finales son el resultado de unir ambos ensayos en uno solo (Hsieh y col., 1993).

2.4 Actividad de los antimicrobianos en leche pasteurizada.

2.4.1 Diseño experimental

Las concentraciones de los antimicrobianos a ser ensayados se prepararon asépticamente a partir de las soluciones madre (IV.2.2.1). Los inóculos se prepararon en

tubos de ensayo con 10 ml de leche estéril y una población de *L.monocytogenes* o *E. coli* O157:H7 de 5×10^4 UFC/ml aproximadamente.

Los experimentos se realizaron por triplicado en placas de microtiter de 96 pocillos. Cada pocillo recibió 150 μ l de leche conteniendo el inóculo y 150 μ l de leche con la concentración del antimicrobiano, de tal forma que cada pocillo presentó un volumen final de 300 μ l de leche con la concentración deseada del antimicrobiano y una población de *L. monocytogenes* o *E. coli* O 157:H7 aproximada de entre $1-2,5 \times 10^4$ CFU/ml..Cada concentración se ensayó por duplicado.

2.4.2 Concentraciones Mínimas Inhibitorias, Concentraciones Parcialmente Inhibitorias, Concentraciones Parcialmente Bactericidas y Concentraciones Mínimas Bactericidas.

La actividad antimicrobiana de los compuestos involucrados en este estudio en leche se determinó mediante la elaboración de curvas de supervivencia y/o muerte, graficando los Log (UFC/ml) en la leche suplementada con diferentes concentraciones de antimicrobiano versus tiempo. Las CMIs, CPIs, CPB y CMBs fueron determinadas para *L. monocytogenes* y *E. coli* teniendo en cuenta la temperatura de almacenamiento de la leche y la concentración de materia grasa.

2.4.3 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad antimicrobiana

Se prepararon dos placas para cada antimicrobiano y microorganismo, una de las cuales se incubó a 7 °C por 14 días y otra se incubó 35 °C por 24 h. Cada experimento se realizó tres veces. En cada microplaca se incluyó un control positivo con el inóculo y sin el AE y un control negativo con la leche estéril.

La población superviviente se enumeró a los 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 14 días para las placas incubadas a 7 °C y a los 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h para las incubadas a 35 °C. Para ello 100 μ l de cada pocillo diluido en APT estéril se sembraron para su reuentp en placas de ATS que se incubaron a 35 °C por 24 horas. Por motivos de las limitaciones de la técnica de siembra en placa, no fue posible obtener recuentos por debajo de 10 UFC/ml. Se consideraron como :

CMI (Concentración Mínima Inhibitoria): Concentración de antimicrobiano que mantuvo la población inicial sin cambios significativos al final del periodo de incubación ($p < 0,05$).

CPI (Concentración Parcialmente Bactericida) Concentraciones de antimicrobiano menores que la MIC que inhibió el crecimiento de la cepa microbiana pero permitió la supervivencia de una pequeña población al final del periodo de incubación, significativamente más baja ($p < 0,05$) que la alcanzada por el control positivo sin antimicrobiano añadido.

CPB (Concentración Parcialmente Bactericida) : Concentración antimicrobiana que redujo significativamente la población inicial de la cepa microbiana al final del periodo de incubación ($p < 0,05$).

Para obtener la Concentración Mínima Bactericida (CMB) el procedimiento experimental usado fue el mismo que el descrito para determinar la CMI, pero las muestras fueron sembradas para su recuento en placas de ATS para verificar el efecto bactericida solamente al finalizar el periodo de incubación, después de 24 horas a 35 °C y después de 7 días a 7 °C. La CMB fue definida como la concentración más baja a la cual el 99.9% del inóculo inicial de la leche fue destruido y no se observó ningún crecimiento cuando 100 µl de la leche se sembraron en TSA y se incubaron a 35 °C por 48 horas para *L. monocytogenes* y 24 h para *E. coli* O157:H7.

Para *L. monocytogenes* se usó un rango de concentraciones entre 3.000 y 12.000 ppm para clavo y hojas de canela, entre 3.500 y 2.000 para hojas de canela y entre 3.000 y 12.000 para vainillina.

Para *E. coli* O157:H7 se ensayaron entre 2.000 y 4.000 ppm de clavo y hojas de canela, entre 500 ppm y 2.000 ppm para hojas de canela y 1.500 ppm y 6.000 ppm para vainillina.

2.4.4 Efecto de la concentración de grasa de la leche en la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los AEs frente a *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 se estudió en leche descremada, semidescremada y entera (0,3, 2,5 y 3,9 % de grasa) siguiendo el mismo procedimiento que el usado para determinar la actividad antimicrobiana en leche semidescremada, usando las microplacas de 96 pocillos. Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes 2.000 y 3.000 ppm para hojas de canela, 2.000 y 3.000 ppm para clavo; 1.000 y 5.00 ppm para hojas de canela y 2.500, 2000 y 1500 para la vainillina. Para *E. coli* O 157:H7 las concentraciones ensayadas fueron 1.000 y 500 ppm, para hojas de canela y clavo 2.000 ppm, 1.500 ppm y 1.000 ppm y para hojas de canela 500 ppm y 250 ppm. Las microplacas se incubaron a 7 °C por 7 días. La población superviviente se enumeró a los 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 14 días. Para ello 100 µl de cada pocillo diluido en APT estéril se sembraron en placas de ATS que se incubaron a 35 °C por 48 horas para *L. monocytogenes* y por 24 horas para *E. coli* O157:H7. Para evaluar el efecto del antimicrobiano en los distintos tipos de leche se comparó estadísticamente la variación de la población final del microorganismo en relación a la población inicial.

2.4.5 Efecto de la actividad de las combinaciones de antimicrobianos en la leche

Las mezclas de antimicrobianos evaluadas en leche fueron combinaciones binarias de vainillina, corteza de canela, hojas de canela y clavo en concentraciones 1, ½, ¼ por encima y por debajo de sus respectivas CMIs. El experimento se realizó en microplacas, cada combinación fue ensayada por duplicado y cada experimento se realizó tres veces. Las microplacas se incubaron por 14 días a 7 °C y cada dos días se evaluó el crecimiento microbiano, sembrando por duplicado 100 ul de cada pocillo en placas de ATS, que se incubaron a 37 °C por 24 horas para *E. coli* O157:H7 y por 48 horas para *L. monocytogenes*. En cada microplaca se preparó un control negativo, con leche estéril sin inóculo y con el antimicrobiano correspondiente y un control positivo con leche y el inóculo, pero sin el antimicrobiano. La densidad de la población final se comparó estadísticamente con la población inicial para establecer diferencias significativas. Se consideró que la actividad de la mezcla fue sinérgica cuando esta fue

significativamente mayor que la suma de las actividades separadas y aditivas cuando fue igual. Otro criterio que se consideró fue el establecido por Pfaller y col., 2004, mediante el cual si la población final de la mezcla difiere en menos de 10 veces el efecto del componente individual más activo el efecto es aditivo. Si hay un aumento mayor de 10^2 ufc/ml con respecto a la del antimicrobiano más activo se dice que el efecto es antagónico.

2.5 Efecto del tratamiento térmico sobre *L. monocytogenes* en leche semidescremada suplementada con vainillina.

La cinética de inactivación térmica para *L. monocytogenes* en leche suplementada o no con vainillina fue determinada a temperatura constante en un termorresistómetro Mastia (Conesa y col., 2009).

Se utilizó leche semidescremada pasteurizada (1,7 % materia grasa) similar a la utilizada en los ensayos anteriores (IV.2.2). Frascos con 300 ml de leche se expusieron a vapor fluido por 30 minutos y se enfriaron inmediatamente. La esterilidad de las muestras se confirmó por siembra en placas de ATS. Las muestras de leche estéril se usaron para preparar las diferentes concentraciones de vainillina

2.5.1 Diseño experimental

Basándonos en la CMI de la vainillina determinada para *L. monocytogenes* en leche, se seleccionaron las siguientes concentraciones sub-inhedoras para ser ensayadas en combinación con el tratamiento térmico: 900 ppm, 1.400 ppm y 1.800 ppm. Estas concentraciones de vainillina se eligieron bajas para no interferir con el sabor, olor y sabor de la leche. El pH de la leche se midió siempre utilizando un pH metro Crison GLP 21 (Crison Instruments, SA, Barcelona, España).

Los tratamientos térmicos se realizaron a 55, 58, 60 y 62°C. En condiciones de esterilidad 300 ml de leche se introdujeron en el vaso del termorresistómetro. La inoculación de la cepa microbiana se realizó posteriormente a que la leche alcanzó la temperatura consigna en el equipo. El volumen de inoculación fue de 2 ml y la

concentración microbiana en la leche fue de 10^5 UFC/ml. A intervalos de tiempo regular, programado específicamente para cada temperatura de tratamiento, se recogió 1 ml de leche en 9 ml de AP estéril a 25°C, que se enfrió inmediatamente en hielo para evitar el efecto del tratamiento térmico residual sobre los microorganismos. A partir de estas alícuotas tomadas se prepararon diluciones decimales seriadas, se sembró en profundidad en medio ATS, se incubaron las placas a 35 °C y después de 48 horas se realizaron los recuentos de supervivientes al tratamiento térmico.

2.5.2 Modelización de curvas de destrucción térmica

Las curvas de supervivencia se obtuvieron al representar gráficamente LOG (UFC/ml) vs tiempo de tratamiento. Como los datos obtenidos no se ajustaron con los modelos lineales usuales de destrucción térmica debido al periodo de latencia que se obtuvo antes de la disminución de la población, se usaron dos modelos matemáticos que ajustan más fielmente los datos. El programa gratuito GInaFiT, versión 1.5 (Geeraerd y col., 2005), un complemento para Microsoft Excell, fue utilizado para modelar la inactivación cinética, teniendo en cuenta el hombro que se produjo antes de disminución del tamaño de la población (Geeraerd y col., 2005). La cinética de destrucción se calculó matemáticamente según los modelos:

- Modelo Geeraerd, Shoulder + Log-linear :

$$N = N_0 * e^{-k_{\max} * t} * \left(\frac{e^{k_{\max} * SI}}{1 + (e^{k_{\max} * SI} - 1) * e^{-k_{\max} * t}} \right) \text{ (Ec. 8)}$$

N- Concentración de células (UFC/ml) después de un tiempo de tratamiento (min)

N_0 - Concentración inicial de células (UFC/ml)

k_{\max} es la tasa máxima de inactivación (min^{-1})

SI - Longitud del hombro (min) (longitud de la fase lag).

Los valores D o el tiempo necesario para lograr la reducción de 1 log en la viabilidad fueron deducidos de la k_{\max} de acuerdo a la ecuación:

$$D = \left(\frac{1}{\ln 10} \right) * k_{\max} \quad (\text{Ec. 9})$$

Y los valores z se determinaron por regresión linear de los valores $\log D_T$. El tiempo necesario para lograr una reducción $4 \log t_{4D}$ de la población inicial se obtuvo directamente del programa GinaFit..

□ Modelo Weibull

$$\text{Log}_{10} N = \text{Log}_{10} N_0 - \left(\left(t / \delta \right)^p \right) \quad (\text{Mafart y col., 2002}) \quad (\text{Ec.10})$$

$N(t)$ - Concentración inicial de células (UFC/ml)

t – tiempo en minutos

δ o parámetro de escala- tiempo que conduce a la primera reducción decimal de la población superviviente.

p - es el parámetro de forma de la curva

Cuando $p > 1$, la curva de supervivencia muestra una forma convexa, $p < 1$ significa una forma cóncava y $p = 1$ corresponde a la forma log- linear.

Las curvas se ajustaron por separado y los modelos se compararon usando los coeficientes de correlación (R^2).

2.5.3 Distribución de frecuencias

Los valores δ y p de la distribución de Weibull se utilizaron para elaborar la distribución de frecuencias de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f(t) = \frac{p}{\delta} * \left(\frac{t}{\delta} \right)^{p-1} * \exp \left(- \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \right) \quad (\text{Ec.11})$$

2.6 Análisis estadísticos

Todos los experimentos se realizaron con al menos tres réplicas, la representación de los datos en Tablas y Figuras es el valor promedio de las réplicas \pm la desviación estándar de las mismas. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphic Plus for Windows versión 5.0. Para la comparación de dos muestras se utilizó la t de student y para varias muestras el análisis de varianza y test de Comparación de Rangos Múltiples (Duncan)) (StatPoint, Inc., Herndon, Va) ($p < 0.05$)

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Actividad de los antimicrobianos en Caldo Tripticasa de Soya

En las Figuras 19-30 se presentan las curvas de crecimiento en CTS obtenidas al graficar la DO vs tiempo para cada uno de los pocillos de las microplacas con cada antimicrobiano, AEs de canela, clavo, eugenol, cinamaldehido y vainillina, frente a los dos microorganismos ensayados, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 y a pH 6 y 7. Después de procesar el área debajo de cada una de las curvas, se construyeron los perfiles de inhibición graficando el área fraccionada versus el log de la concentración de antimicrobiano respectiva (Figuras. 31 -32).

La representación gráfica de estos perfiles correspondió a una curva sigmoideal típica y se ajustaron mediante la ecuación modificada de Gompertz (Ec.3). Las curvas de inhibición se dividen en tres regiones, una región donde el antimicrobiano no tiene ningún efecto sobre el crecimiento del microorganismo, una región donde hay una inhibición creciente del crecimiento y una región donde no hay crecimiento en relación al control. Dos concentraciones específicas marcan los límites de actuación del antimicrobiano, la CNI que marca el límite por encima de la cual no se observa ninguna diferencia en el crecimiento en relación al control y la MIC, por encima de la cual el antimicrobiano empieza a tener efecto negativo sobre el crecimiento y por debajo de la cual no existe ningún tipo crecimiento.

En la tablas 4 y 5 se presentan los valores medios de la CMI y CNI para cada microorganismo, estimados a partir de las gráficas del área bajo la curva ajustadas por medio de las ecuaciones 3.1 y 3.2 así como las diferencias estadísticas entre ellos y en la tabla 6 se presentan los valores de CMB.

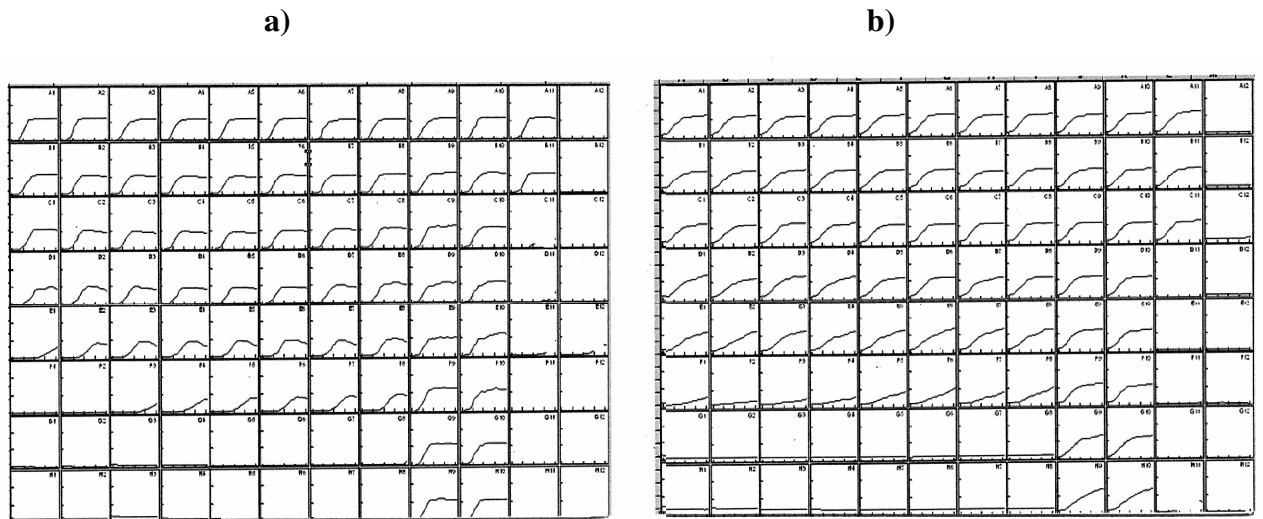


Figura 19. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en CTS con AE de hojas de canela, a) pH7 y b) pH 6-

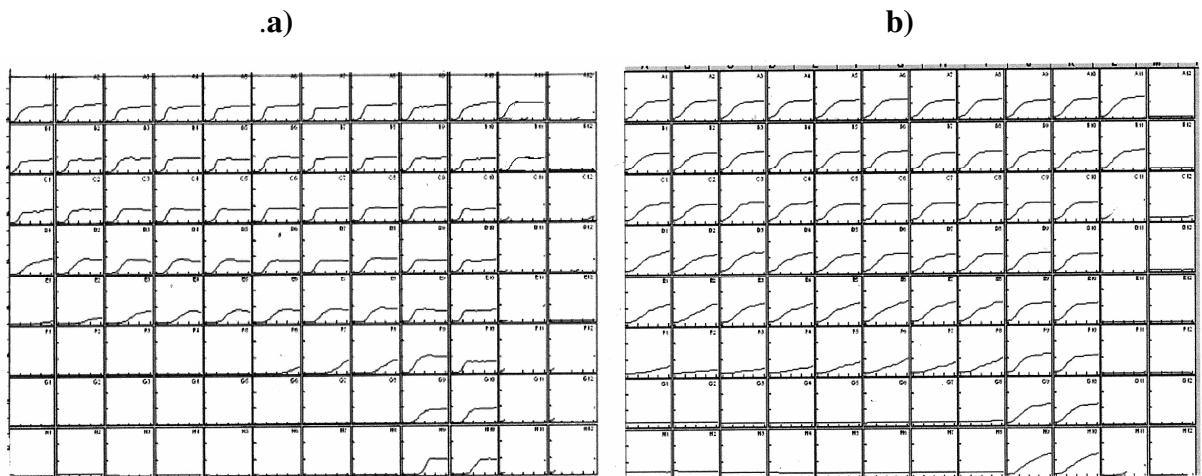


Figura 20. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en CTS con AE de clavo, a) pH 7 y b) pH 6.

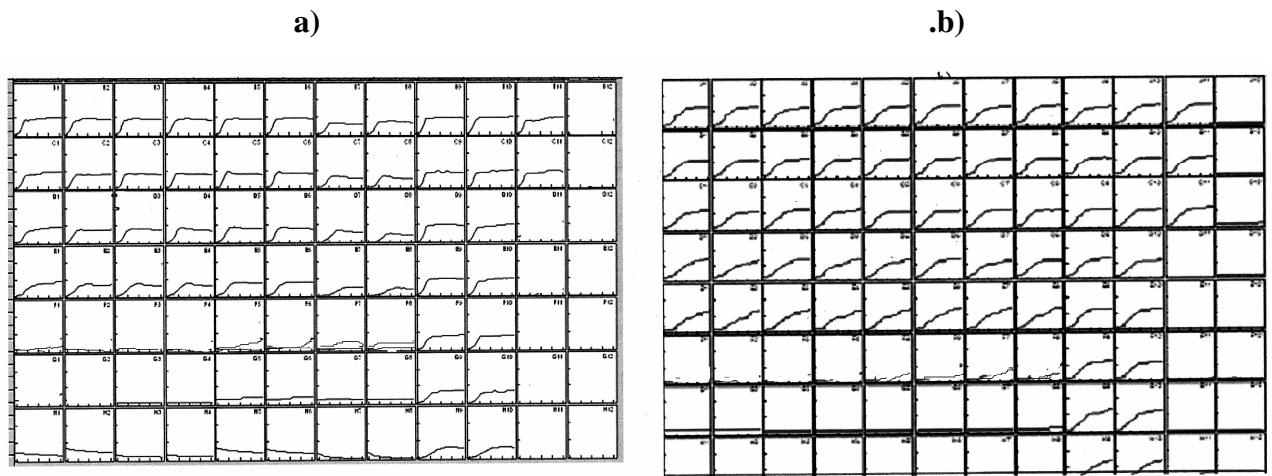


Figura 21. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en CTS con AE de corteza de canela a) pH 7 y b) pH 6

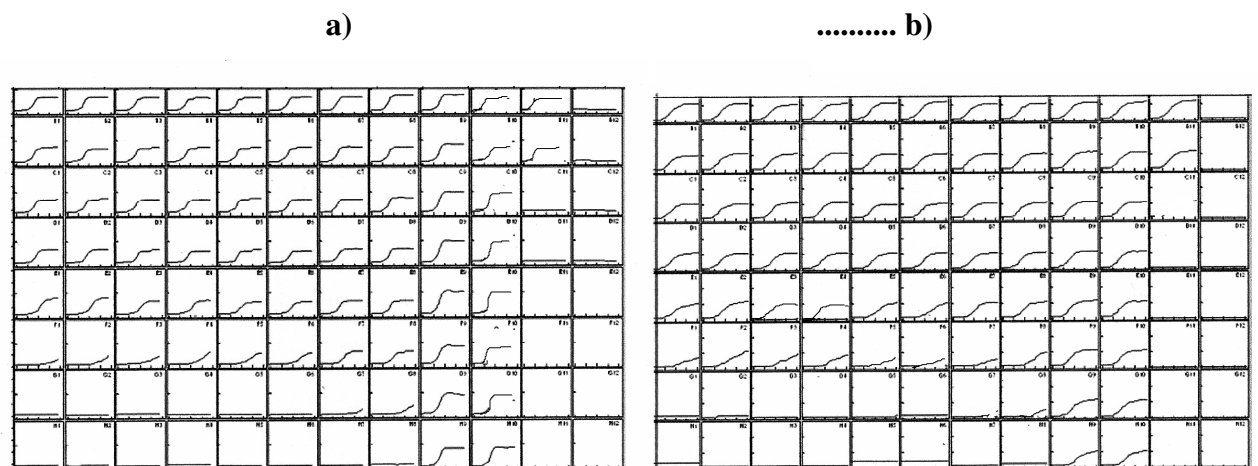


Figura 22. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en CTS con eugenol a) pH 7 y b) pH 6

a)

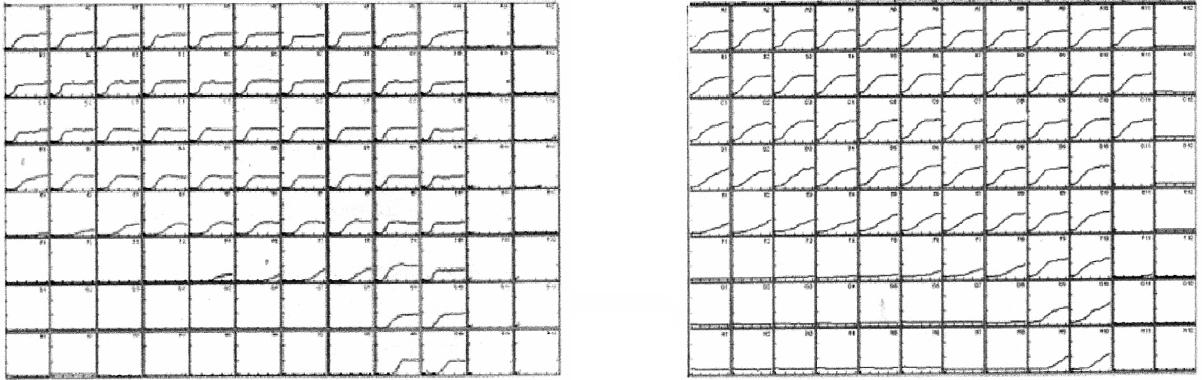


Figura 23. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* en CTS con cinamaldehído, a) pH 7 y b) pH 6.

a)

b)

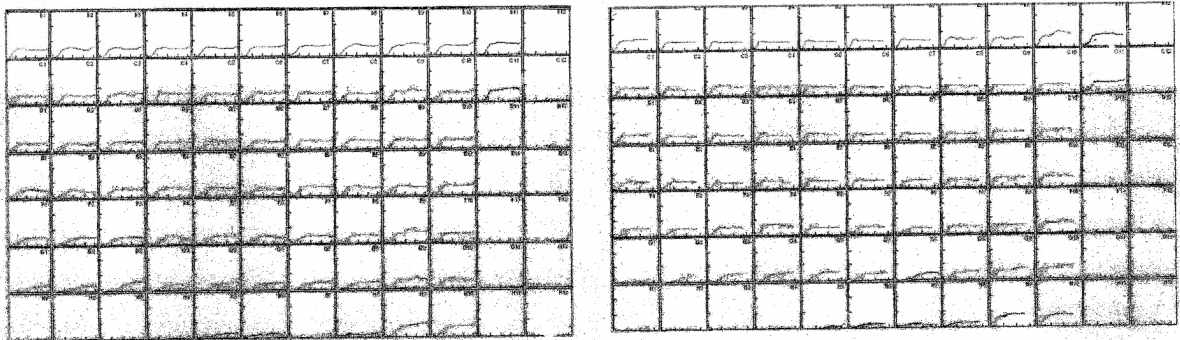


Figura 24. Curvas de crecimiento generadas por *L. monocytogenes* Scott A en CTS, con vainillina, a) pH 7 y b) pH6

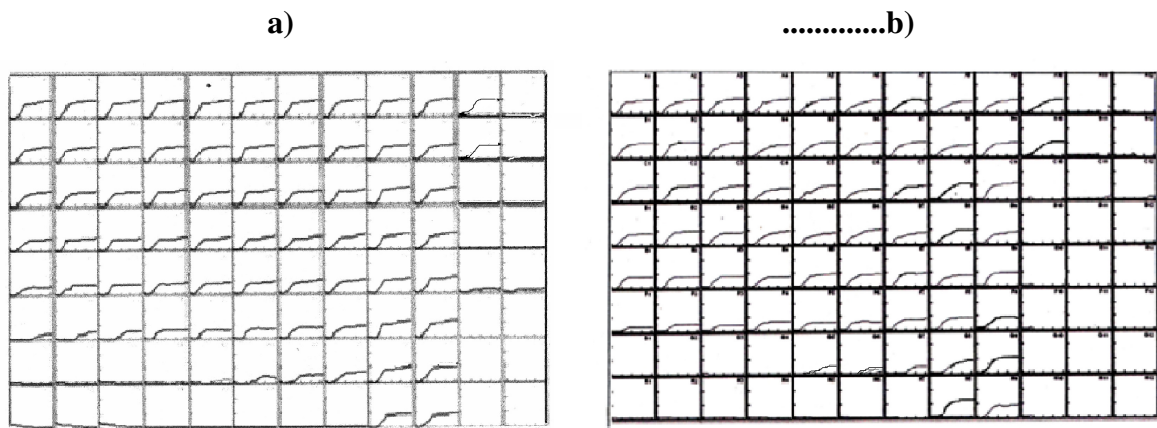


Figura 25 Curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en CTS con AE de hojas de canela a) pH 7 y b) pH 6.

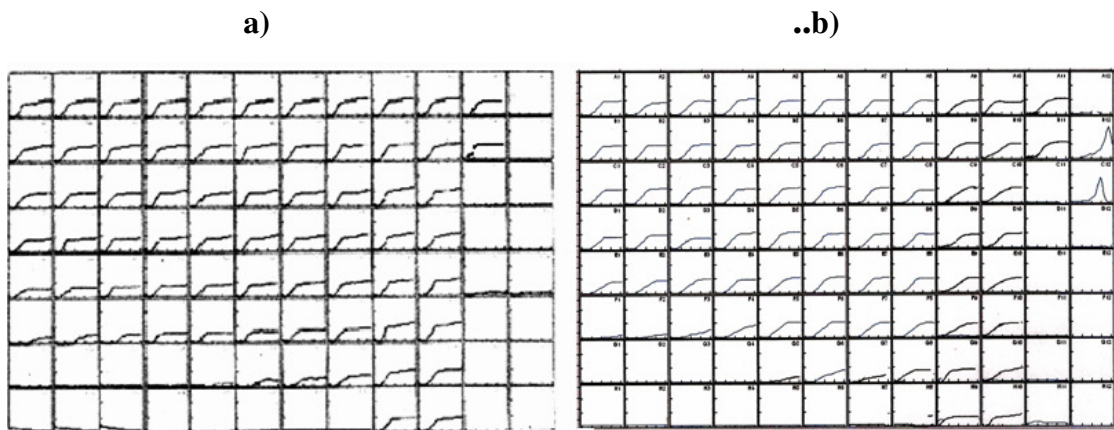


Figura 26. Curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en CTS con AE de clavo a) pH 7 y b) pH 6.

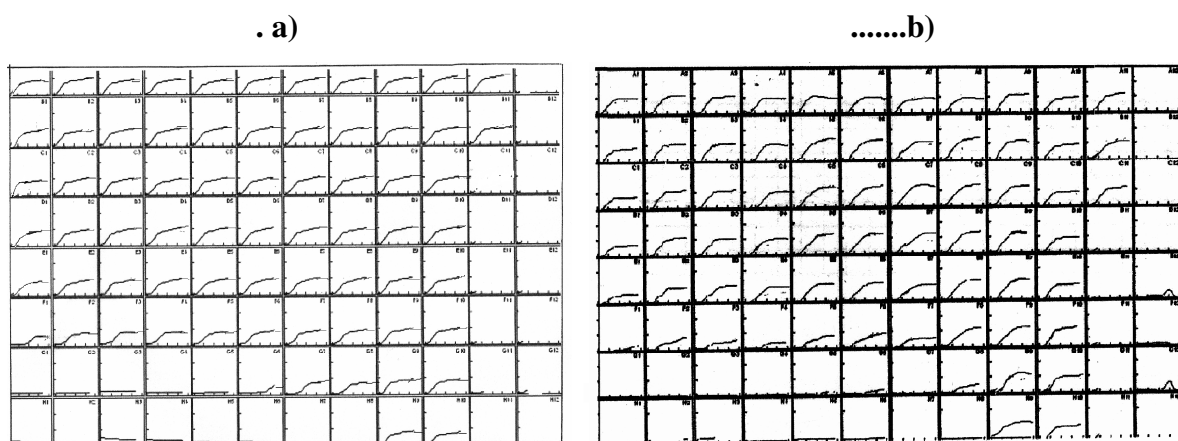


Figura 27. Curvas de crecimiento de *E. coli* O 157:H7 en CTS con AE de corteza de canela de canela a) pH 7 y b) pH 6.

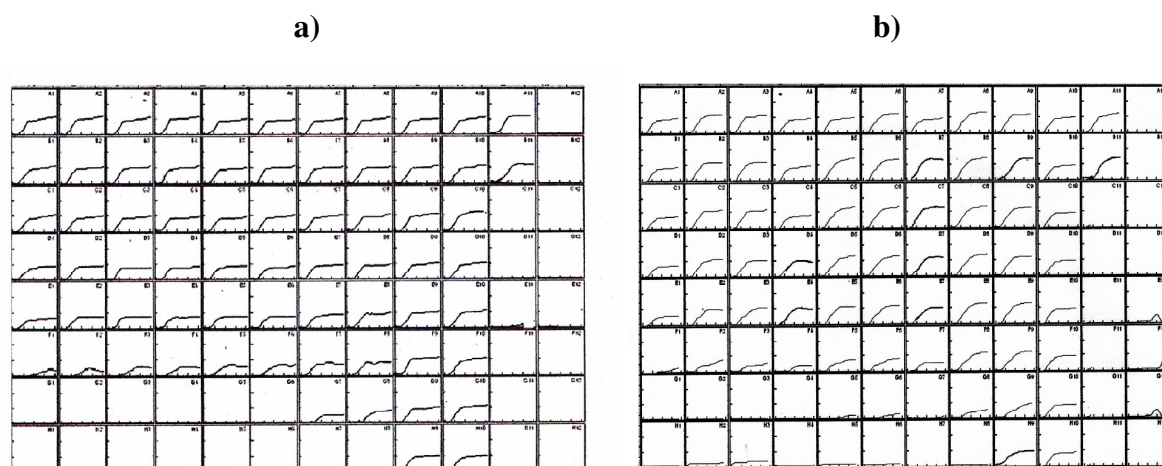


Figura 28. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* en CTS con eugenol a) pH 7 y b) pH 6.

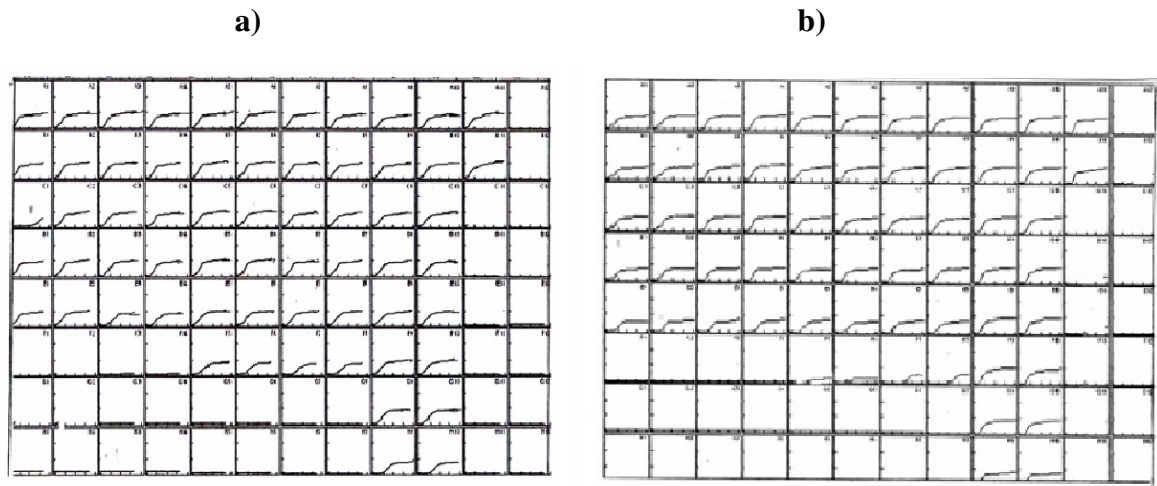


Figura 29. Curvas de crecimiento generadas por *E. coli* O157:H7 en CTS con cinamaldehido a) pH 7 y b) pH6

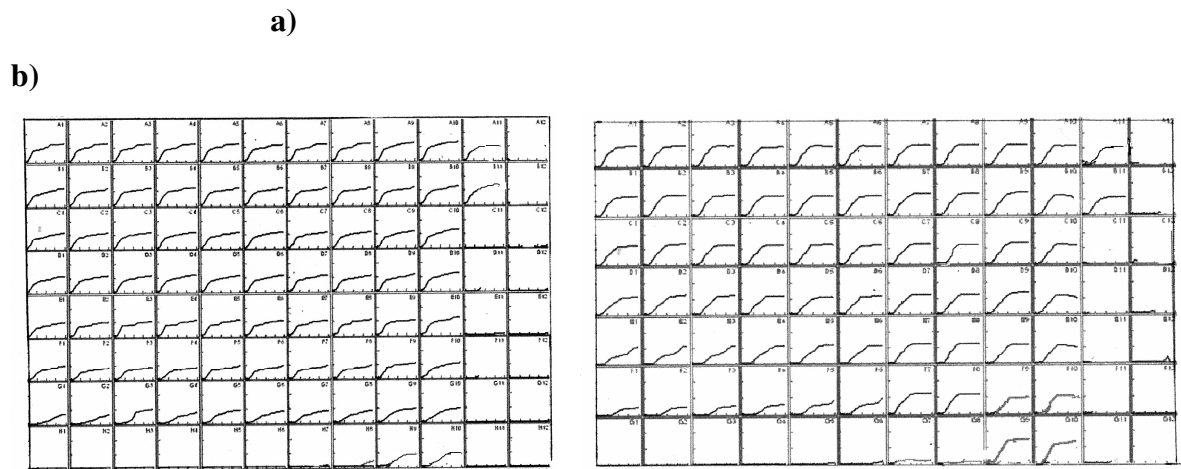
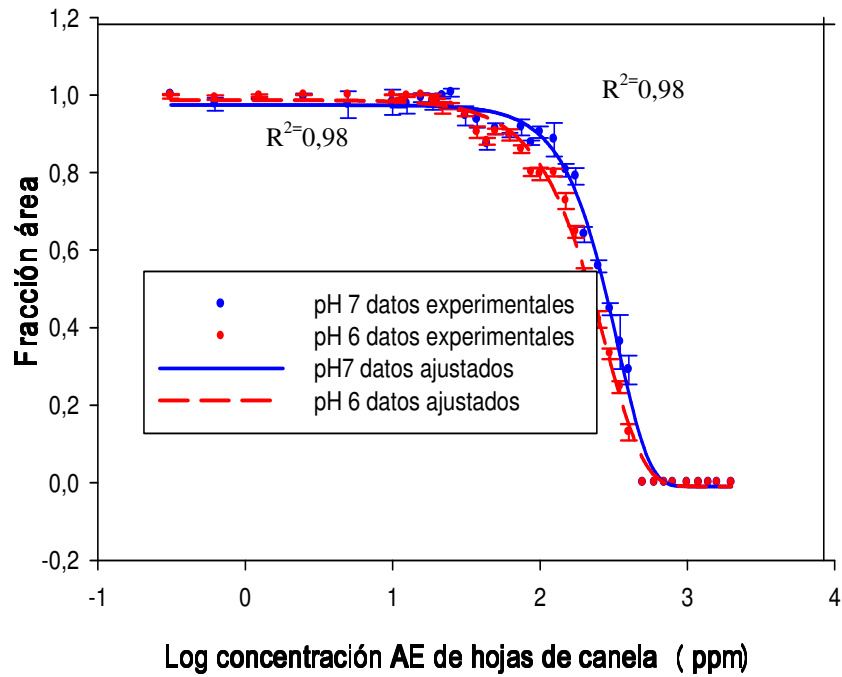
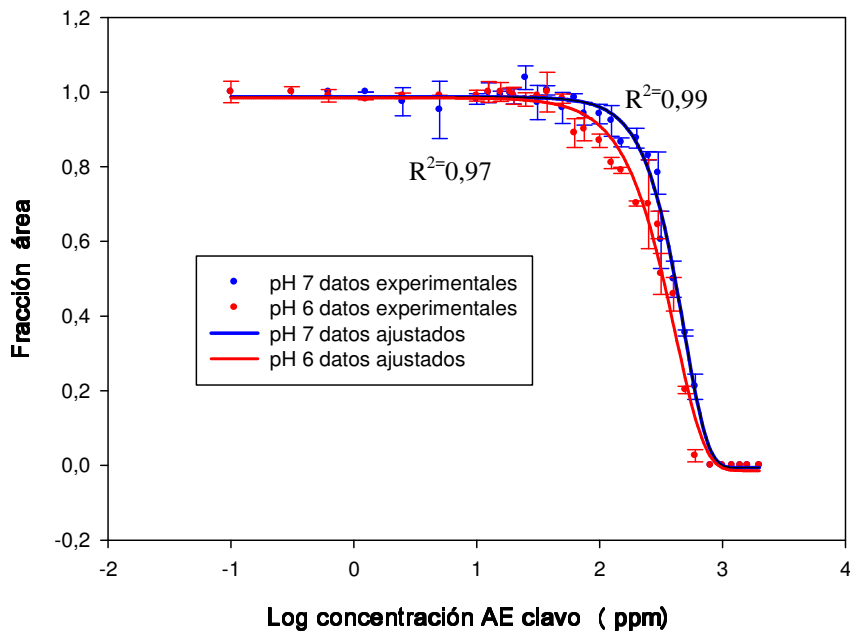


Figura 30. Curvas de crecimiento generadas por *E. coli* O157:H7 en CTS con vainillina a) pH 7 y b) pH6

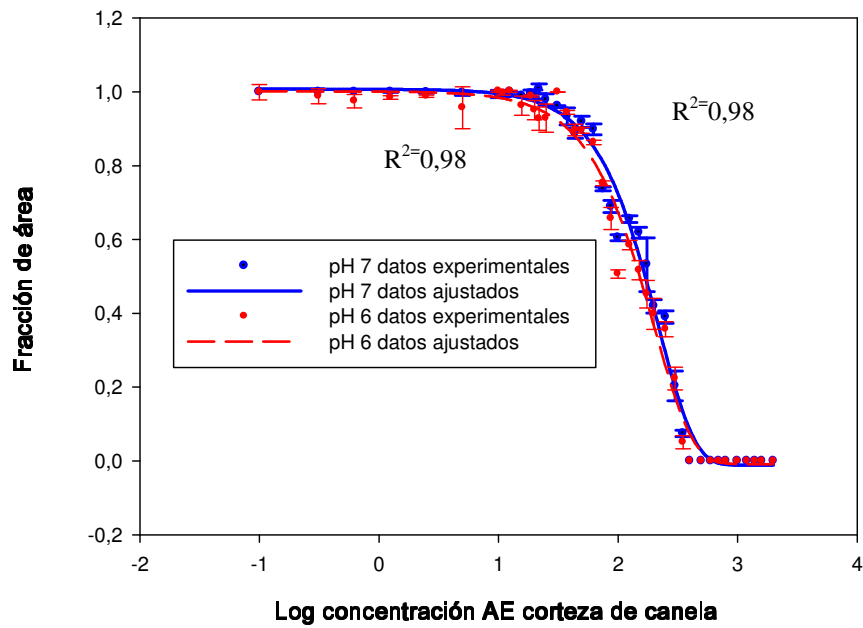
a)



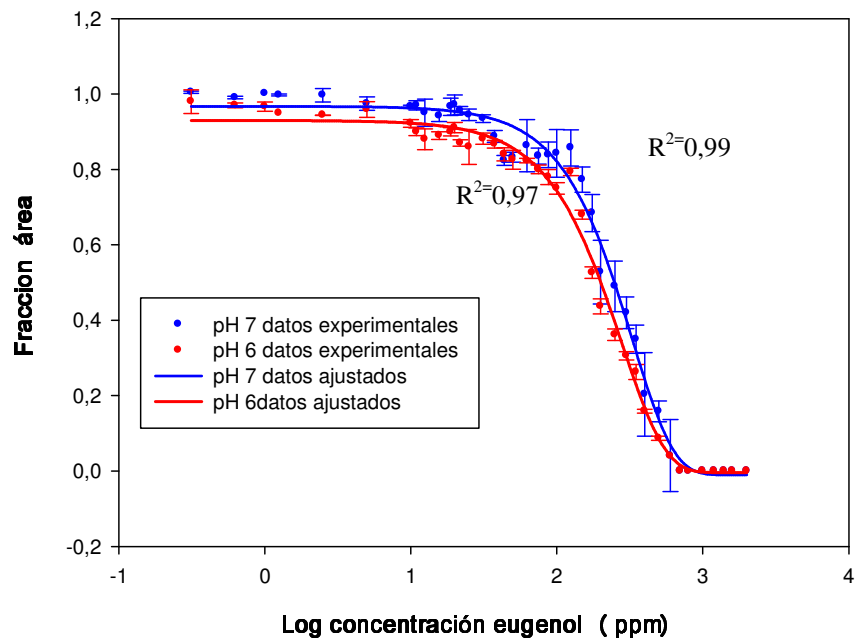
b)



c)



d)



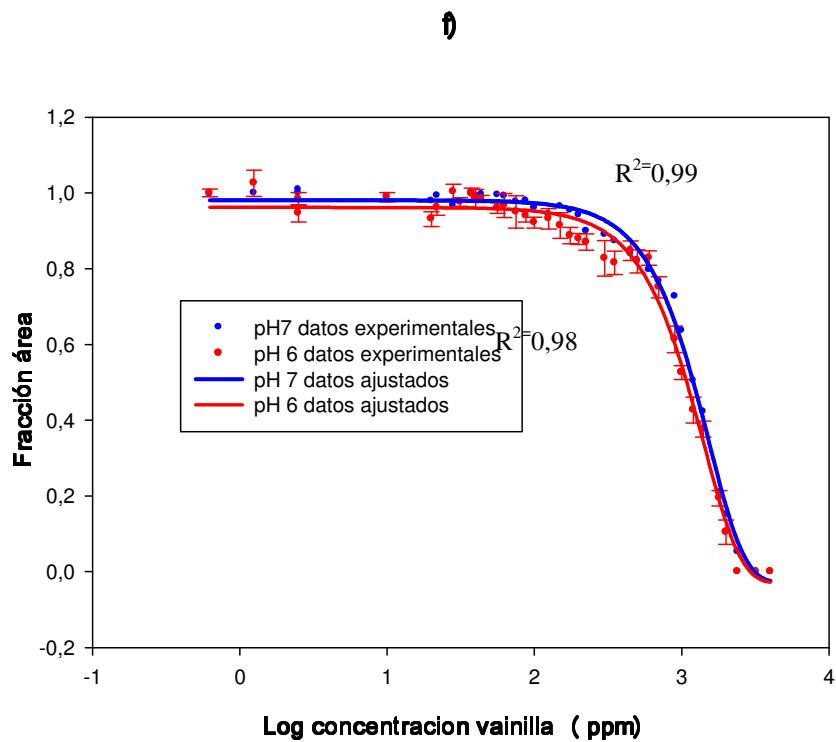
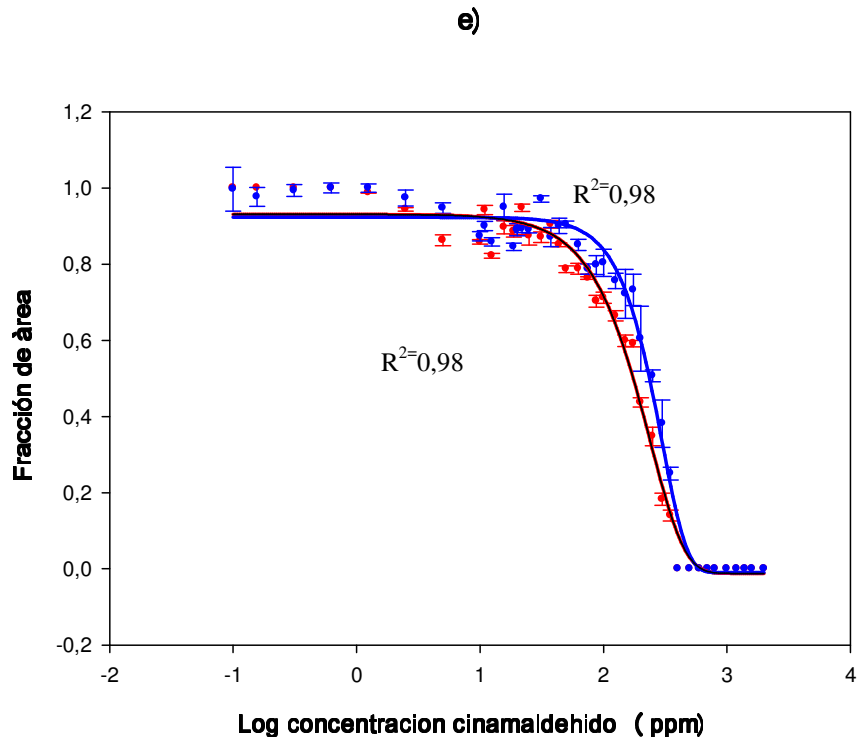
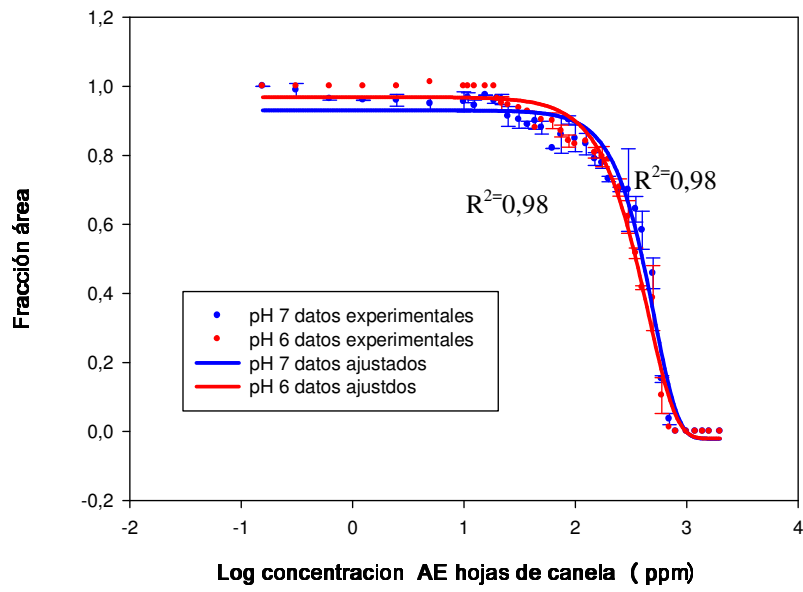
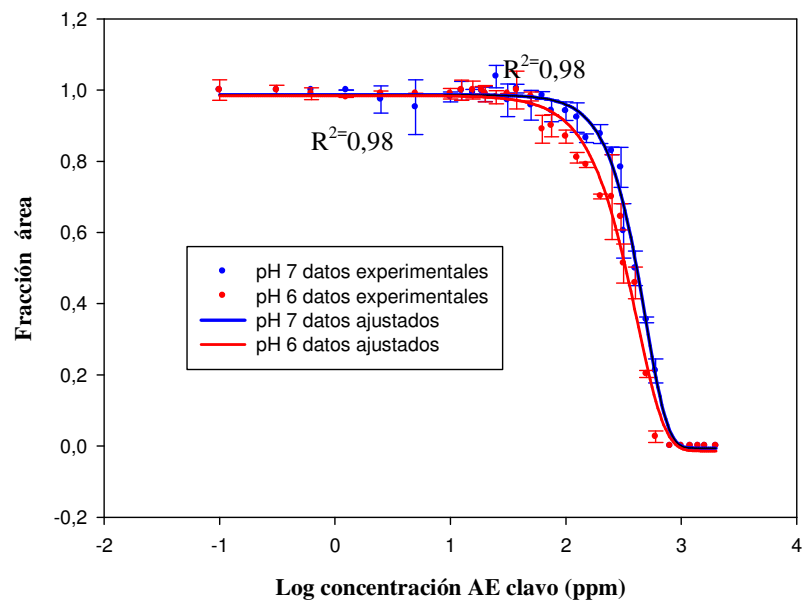


Figura 31. Perfiles de inhibición de *L. monocytogenes* Scott A en CTS a pH 7 y 6 con a) AE de hojas de canela, b) AE de clavo, c) AE de corteza de canela, d) eugenol, c) cinamaldehído y d) vainillina. Los diagramas de barras representan la desviación estandar correspondiente a la media aritmética de 3 repeticiones

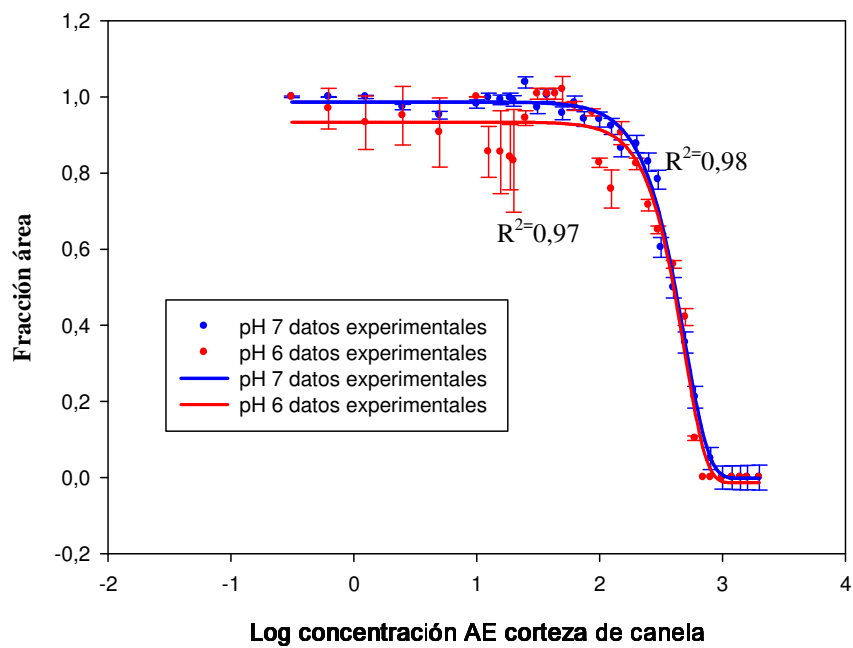
a)



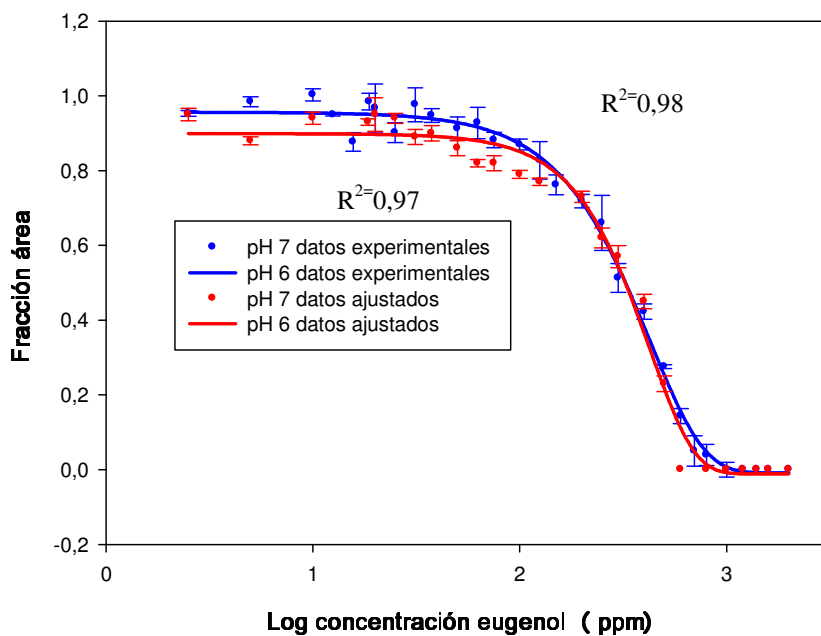
b)



c)



d)



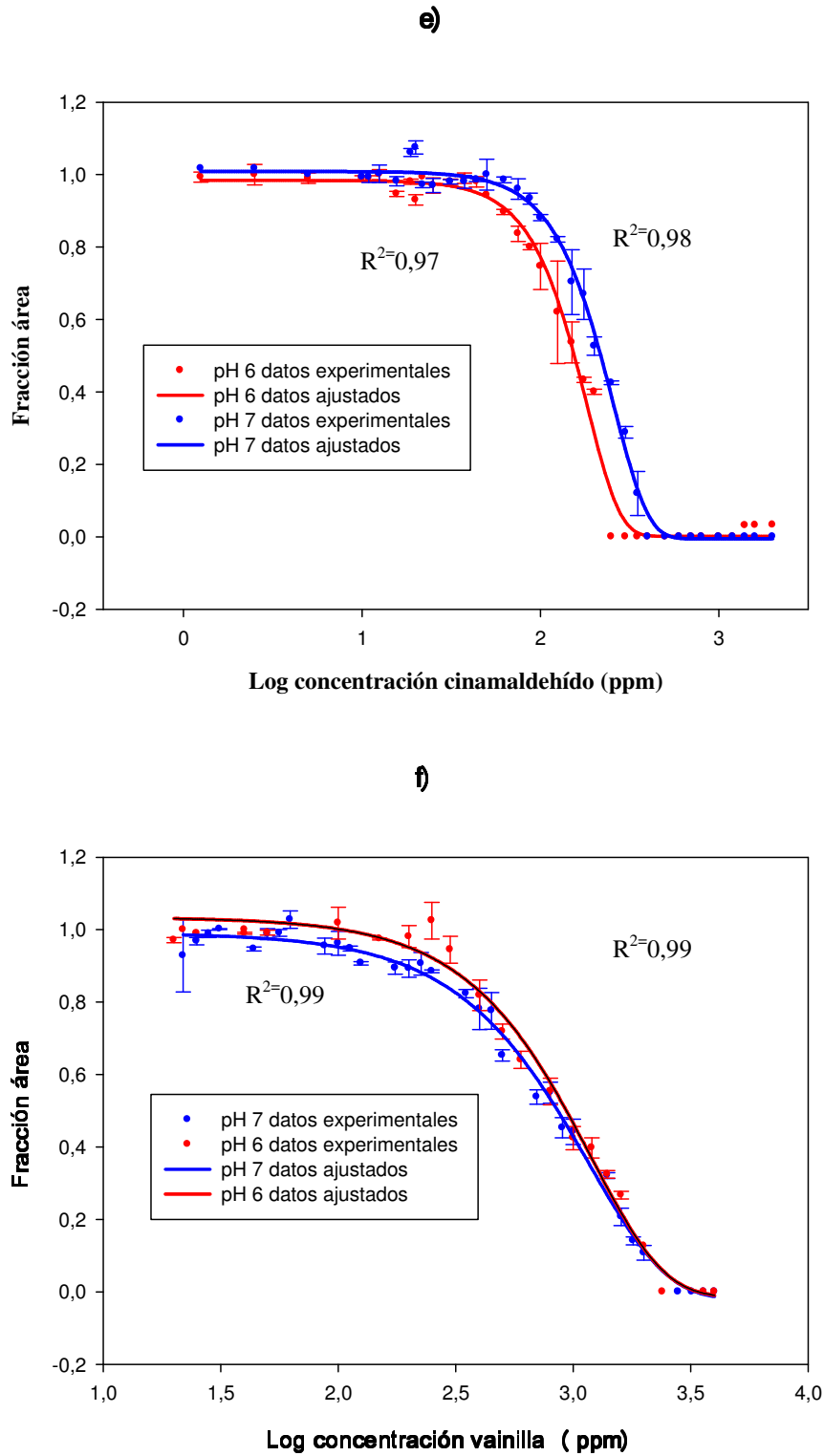


Figura 32. Perfiles de inhibición de *E. coli* O157:H7 en CTS a pH 7 y 6 con a) AE de hojas de canela, b) AE de clavo, c) AE de corteza de canela, d) eugenol, c) cinamaldehído y d) vainillina. Los diagramas de barras representan la desviación estandar correspondiente a la media aritmética de 3 repeticiones

Tabla 4. CMI y CNI en CTS a pH 7 y 6 de diversos antimicrobianos frente a *L. monocytogenes*

Antimicrobiano	pH 7		pH 6	
	CMI (ppm)	CNI (ppm)	CMI (ppm)	CNI (ppm)
AE h. canela	507,68±28,11	197,00±19,20	478,74±49,25	144,51±12,62
AE clavo	401,74±31,94	136,01±19,30	391,21±78,58	124,59±16,34
C. c de canela	404,11±31,94	114,89±23,92	390,00±37,22	112,58±30,38
eugenol	562,32±20,29	162,60±12,85	514,00±13,34	128,51±13,07
cinamald.	449,00±20,72	157,35±6,27	418,92±6,27	119,70±2,07
vainillina	3002,34±293,79	858,02±81,68	2762,16±111,63	838,02±36,23

Tabla 5. CMI y CNI en CTS a pH 7 y 6 de diversos antimicrobianos frente a *E. coli* O157:H7.

Antimicrobiano	pH 7		pH 6	
	CMI (ppm)	CNI (ppm)	CMI (ppm)	CNI (ppm)
AE h. de canela	843,31±29,32	301,23±12,17	788,78 ±23,77	243,50 ±12,62
AE clavo	778,45±50,94	234,94±49,53	746,21 ±17,58	258,04 ±31,50
AE c. de canela	720,86±99,76	298,00±13,22	706,89 ±16,29	301,58±20,38
eugenol	766,48±25,29	212,42±31,88	759,54 ±34,85	227,79 ±13,07
cinamaldehido.	454,89±15,36	216,87±6,27	438,92 ±18,56	219,70 ±14,13
vainillina	2795,29±102,8	524,02±81,68	2455,62±36,63	571,87 ±36,30

Tabla 6. CMBs de diversos antimicrobianos frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7.

Antimicrobiano	CMB (ppm)	
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
AE h de canela	1.000	1.200
AE clavo	800	1.200
AE c. de canela	1.200	1.500
eugenol	1.000	1.200
cinamaldehido.	1.400	1.400
vainillina	8.000	6.000

3.1.1 Concentraciones Mínimas Inhibitorias

El eugenol presentó para *L. monocytogenes* valores de CMI de 562,32 y 514,00 ppm a pH 7 y 6 respectivamente y una CMB de 1.000 ppm; para *E. coli* O157:H7 las CMI fueron 766,48 ppm y 759,54 ppm a pH 6 y 7 y la CMB fue 1.200 ppm. Las CMI encontradas por otros autores para el eugenol se encuentra alrededor de 500 ppm para *L. monocytogenes* (Kim y col., 1999, Oyedemi y col., 2008) y alrededor de 750-1.000 ppm para *E. coli* O157:H7 (Gill y Holley, 2006; Oyedemi y col., 2009).

Para el cinamaldehido, a pH 7 y 6, se han encontrado en nuestro trabajo CMI de 449,00 ppm y 418,92 ppm frente a *L. monocytogenes* y de 454,89±438,92 ppm frente a *E. coli* O157:H7 respectivamente. Chang y col. (2001) encontraron valores de CMI para el cinamaldehido de 500 mg/ml. Sin embargo, Utkun y Kunduhoglu (2012) encontraron CMI de 1.000 ppm frente a estos dos microorganismos y Kim y col., 2004 encontraron valores de CMI de 250 ppm para *E. coli* O157:H7

El AE con mayor actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* fue el AE de corteza de canela con una CMI de 404,11ppm-390,00 ppm. Las CMI obtenidas por otros investigadores para el AE de corteza de canela frente a *L. monocytogenes* oscilan entre 250 ppm (Chang y col., 2001), 500 ppm (Ojaghs y col. 2012), 640 ppm (Shaareff, 2011) y 1250 ppm (Gupta y col., 2008). Los valores de CMI para el aceite de corteza frente a *E. coli*

O157:H7 encontrados por otros autores se encuentran también dentro del rango de las concentraciones inhibitorias encontradas en nuestro trabajo y oscilan entre 250 ppm (Kim y col., 2004; Chang y col. 2000), 750 y 1.000 ppm (Ooi y col., 2006; Ojagh, y col., 2012).

La actividad antimicrobiana del aceite de corteza de canela se atribuye principalmente a su contenido en cinamaldehido ya que este compuesto es uno de los compuestos fenólicos con mayor actividad antimicrobiana y las diferencias entre las CMI encontradas para los AEs de corteza de canela se atribuyen principalmente a su diferente contenido en cinamaldehido, con variaciones que oscilan entre un 80% y un 40%, (Wen y col., 2003; Barakat y col., 2004).

La CMI del aceite de corteza de canela encontrada en este trabajo para *L. monocytogenes* fue algo menor (404,11 ppm-390,00ppm) que la CMI del cinamaldehido (449,00ppm-418,92 ppm). Este mismo efecto fue encontrado también por Chang y col. (2000), con un aceite extraído de hojas de canela con un elevado contenido de cinamaldehido (80%), lo cual este investigador atribuye a un efecto sinérgico entre los componentes minoritarios presentes en este aceite esencial. De acuerdo a análisis cromatográficos realizados a este AE los componentes minoritarios son los siguientes : eugenol (3,96 %), sabineno (4,58 %), β -cariofileno (6,70), α -cariofileno (1,49 %), β -linalol (3,03%) y el p-cimeno (2,79%) o el ácido hexadecanoico (3,11%). A estos compuestos se les ha reconocido su poder antimicrobiano (Rhayour y col., 2003; Bagamboula, 2004; Gupta y col., 2008). En el caso de *E. coli* O157:H7 el AE de corteza de canela presentó una CMI de 720,86ppm-706,89 ppm y fue menos inhibitorio que el cinamaldehido, la explicación puede deberse a que los componentes minoritarios del aceite de hojas de canela se comportan de un modo antagónico en el caso de *E. coli* O157:H7. Sin embargo presentó mayor actividad bactericida ya que la CMB de corteza canela (1.000 ppm) fue menor que la CMB del cinnamaldehido (1.400 ppm), efecto que también se atribuye también a los componentes minoritarios del AE.

Las hojas de canela presentaron unos valores de CMI frente a *L. monocytogenes* de 507,68-478,74 ppm y comparados con los encontrados en la literatura se sitúan en el mismo rango: 400 ppm (Smith and Palmer, 1998) y 500 ppm (Chang. 2000; Oussalah y col. 2006; Ojagh y col. 2012). Los valores de CMI encontrados en este trabajo para las hojas de canela frente a *E. coli* O157:H7 (843,31ppm-788,78ppm) se encuentran también en el rango

encontrado por otros autores: 500 ppm (Oussalah y col., 2006; Ooi y col., 2006), 625 ppm (Shenjai y col., 2007) 1.000 ppm y 2.000 ppm (Ceylan y col., 2004; Muthuswamy y col., 2008).

La CMI del AE de clavo para *L. monocytogenes* fue de 401,11ppm-391,21 ppm. Los valores hallados por otros autores para el AE de clavo oscilan entre 200-500 ppm para la CMI. La CMI del AE de clavo encontrada en nuestro trabajo frente a *E. coli* O157:H7 fue de 778,45ppm -746,21 ppm. Los valores de CMI para este mismo AE encontrados por otros autores frente a *E. coli* O157:H7 oscilan entre 500 y 750 ppm (Nzeako y col., 2006; Ouafae y col., 2007) Se han obtenido resultados inclusive alrededor de 2.350 ppm para la CMI del AE de clavo frente a *E. coli* (Pandey y Singh, 2011).

En general los AEs de clavo y la canela presentaron una actividad antimicrobiana parecida y en un rango de concentraciones similar a las encontradas en la literatura. Lopez y col. (2005) demostraron también una actividad microbiana similar entre AEs de canela y clavo frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* en fase gaseosa. Aureli y col. (1992) examinaron 32 aceites y entre ellos canela, clavo, orégano, pimienta y tomillo fueron los más eficaces para lograr la inhibición a la misma concentración de 500 ppm. Esta similitud se debe a que el componente mayoritario es el mismo, el eugenol, (76,77% en hojas de canela y 85,78 %, en el clavo). El mayor contenido de eugenol en el AE de clavo podría ser responsable de su mayor actividad antimicrobiana. La mayor proporción en el AE de clavo de otros compuestos minoritarios: cariofileno (1,40%) y β cariofileno (6,705%) o p -cimeno (2,79%) también pueden ser los responsables del incremento de la actividad antimicrobiana del clavo con respecto a las hojas de canela: β cariofileno (3,47), α -cariofileno (0,61) o p -cimeno (0,78%).

A diferencia de los AEs anteriormente mencionados, la vainillina mostró una actividad antimicrobiana similar o ligeramente menor para *E. coli* O157:H7 que para *L. monocytogenes* con valores de CMI de 3.002,34 ppm-2762,16 ppm para el primer microorganismo y 2.795,29 ppm±2.455,62 ppm para el segundo. Valores similares de CMI entre 3.000 ppm y 5.000 ppm fueron encontrados por Delaquis y col., (2005) para cuatro cepas de *Listeria spp.* Fitzgerald y col., 2004 encontraron CMI de 1.980 ppm para *E. coli* O157:H7 y alrededor de 5.000 ppm para *Listeria innocua*.

3.1.2 Concentraciones no Inhibitorias

Los valores de CNI obtenidos para los diferentes antimicrobianos ensayados al modelar matemáticamente el área bajo la curva se presentan en la Tabla 4 para *L. monocytogenes* y en la Tabla 5 para *E. coli* O157:H7. Al comparar los valores de CNI para los dos microorganismos se observa que existe diferencias para los antimicrobianos ensayados, siendo *L. monocytogenes* más sensible que *E. coli* O157:H7 para el cinamaldehído y los AEs de hojas de canela, corteza de canela, clavo, eugenol. Sin embargo *E. coli* O157:H7 mostró mayor sensibilidad frente a la vainillina que *L. monocytogenes* con un valor de CNI mas bajo. Para *L. monocytogenes* todos los valores estuvieron por debajo de 200 ppm, con excepción de la vainillina, alrededor de 850 ppm. El valor más bajo de CNI correspondió al AE de hojas de canela y el más alto fue para la vainillina. Para *E. coli* O157:H7 los valores de CNI estuvieron por debajo de 300 ppm, con excepción de la vainillina que presentó un valor de 571,87 ppm siendo la hojas de canela y el cinamaldehído los que presentaron los valores de CNI más bajos y la vainillina los más altos. El cociente de la CMI/CNI fue siempre <5 como corresponde a un antimicrobiano de origen vegetal (Guiller y col., 2007).

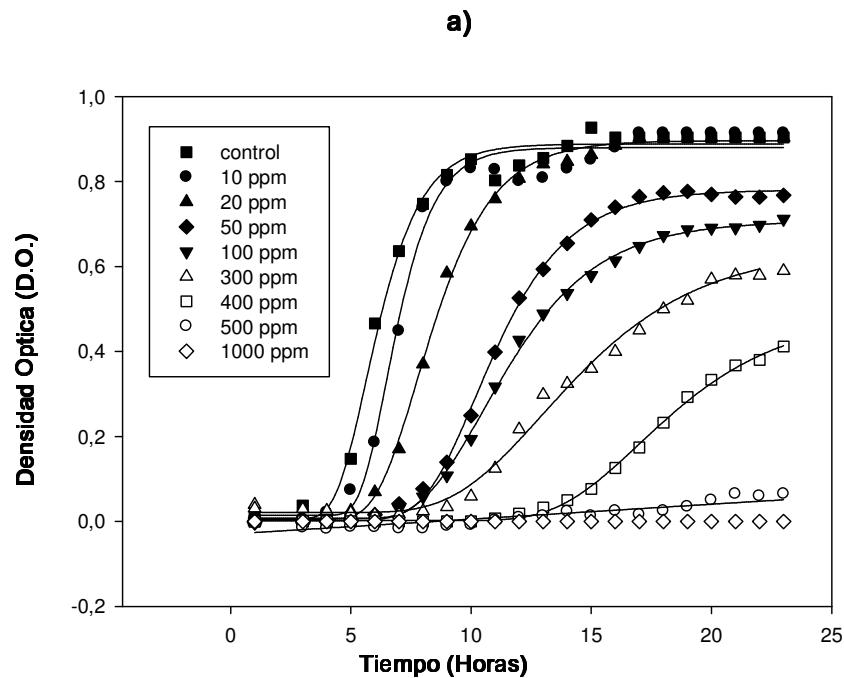
Pocos trabajos se han encontrado en la literatura que estimen la CNI de antimicrobianos de plantas. Gullier y col., 2007, encontraron valores de CNI para el cinamaldehído frente a *Salmonella Thiphimurium*, aproximadamente, unas 1,66 y 1,54 veces de la CMI respectivas. Falcone y col., 2005 determinaron valores de CMI y CNI para varias especies de *Bacillus*, *Lactobacillus* y levaduras y los valores de CNI fueron menores de 100 para casi todos los microorganismos evaluados, con excepción de los *Lactobacillus spp* que fueron mas resistentes..

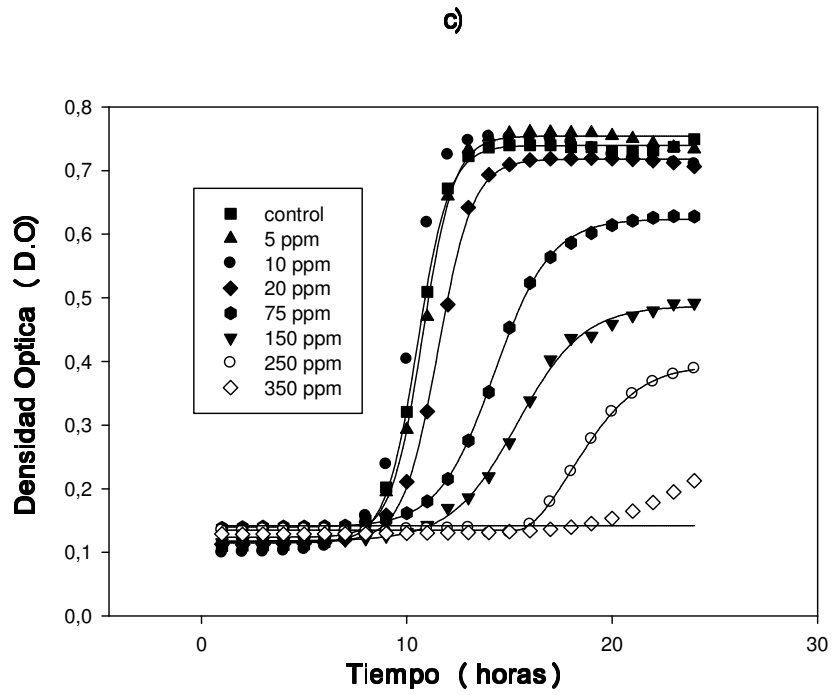
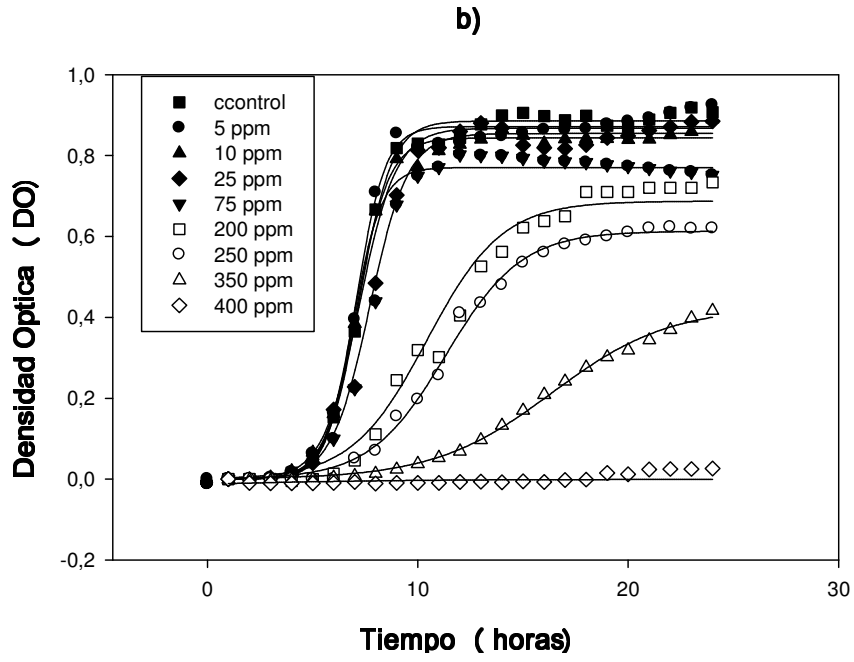
3.1.3 Concentraciones Parcialmente Inhibitorias

Las CPIs son aquellas concentraciones intermedias entre la CMI y la CNI señaladas en las Tablas (4 y 5) para cada microorganismo diana. Las CPIs más significativas para cada antimicrobiano se representan en las Figuras 33 y 45, donde se grafica directamente la DO frente al tiempo para cada concentración de antimicrobiano. El efecto de las CPIs sobre los microorganismos ensayados se determinó con mayor precisión estimando los parámetros de fase de latencia y tiempo de generación para algunas de las concentraciones CPI mas

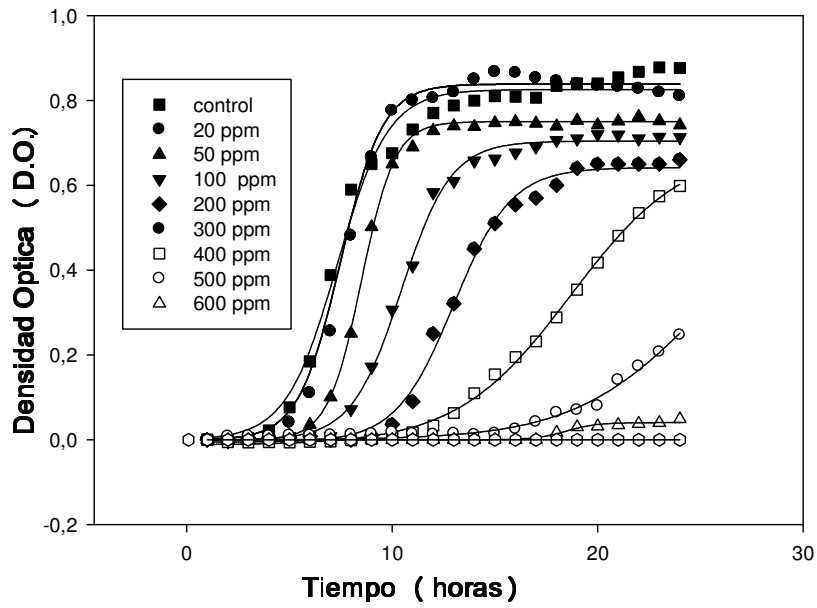
inhibitorias utilizando los parámetros obtenidos al ajustar las curvas mediante la ecuación Gompertz (ec.4) (Tabla 4 y 5).

Tomando en consideración que a mayor tiempo de latencia y de generación, mayor actividad antimicrobiana, se deduce que para *L. monocytogenes* los antimicrobina mayor actividad fueron el cinamaldehído y la corteza de canela, seguidos por el eugenol, el clavo y las hojas de canela. Para *E. coli* O157:H7 el cinamaldehído fue el compuesto de mayor actividad antimicrobiana, seguidos por el AE de corteza de canela, el AE de clavo, eugenol y hojas de canela. Estos resultados fueron similares a los obtenidos al comparar las CMI respectivas.

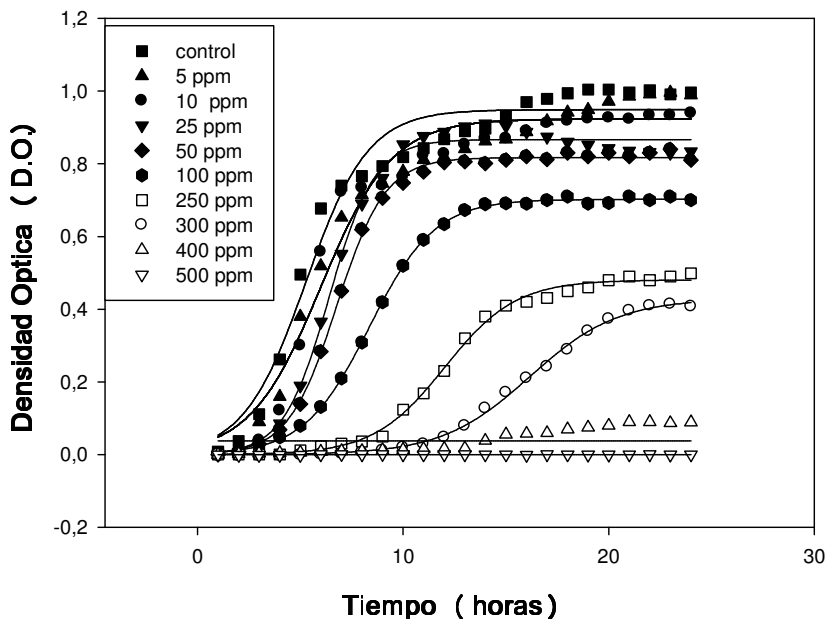




d)



e)



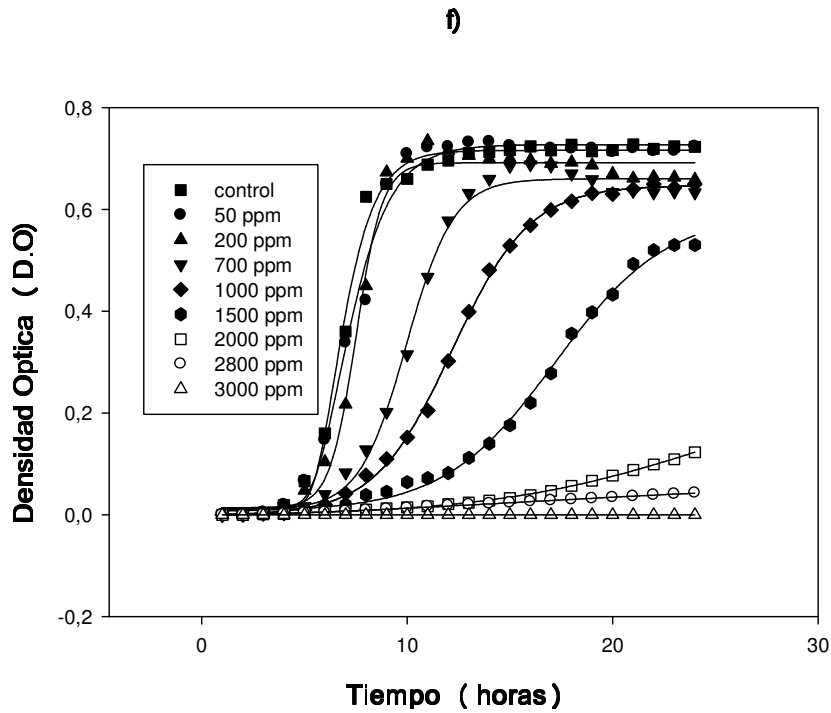
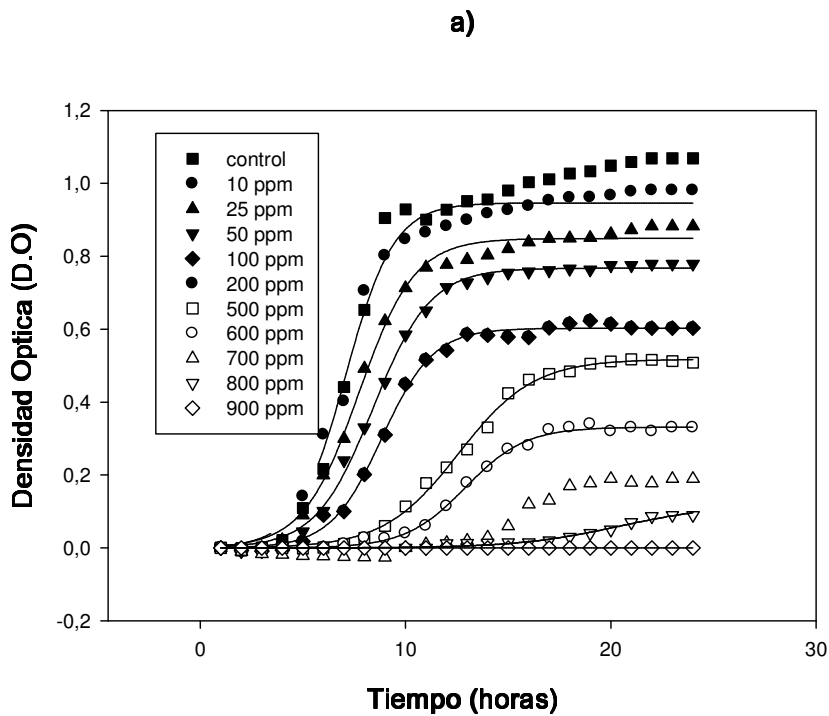
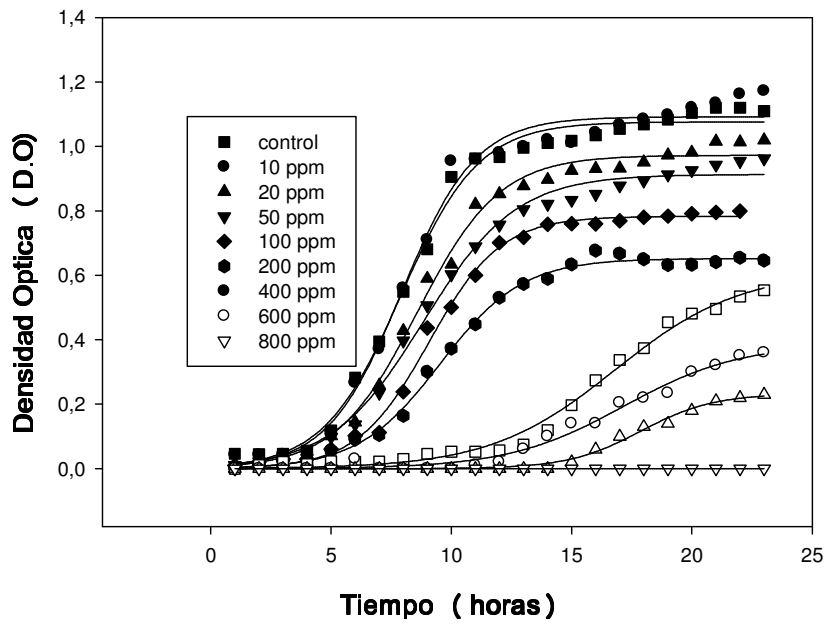


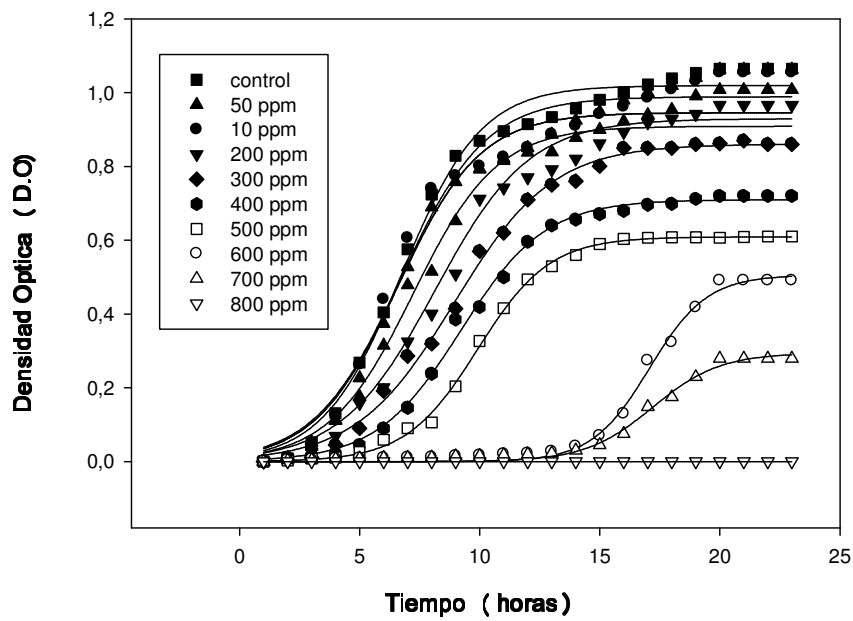
Figura 33. Concentraciones Parcialmente Inhibitorias (CPIs) de *L. monocytogenes* Scott A en CTS a pH 7 y 6 con a)AE de hojas de canela, b)AE de clavo, c) AE de hojas de canela, d) eugenol, c) cinamaldehido y d) vainillina

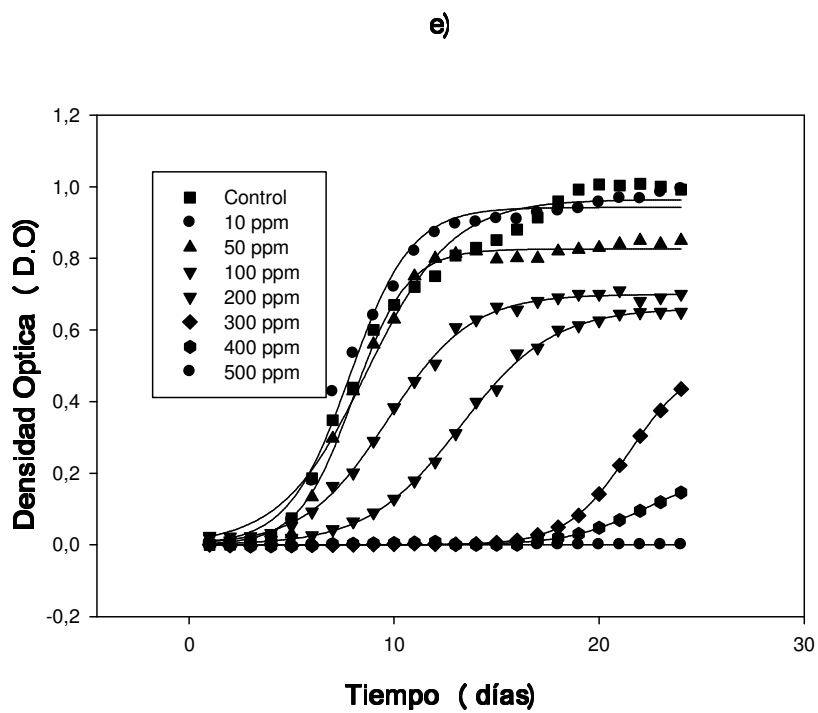
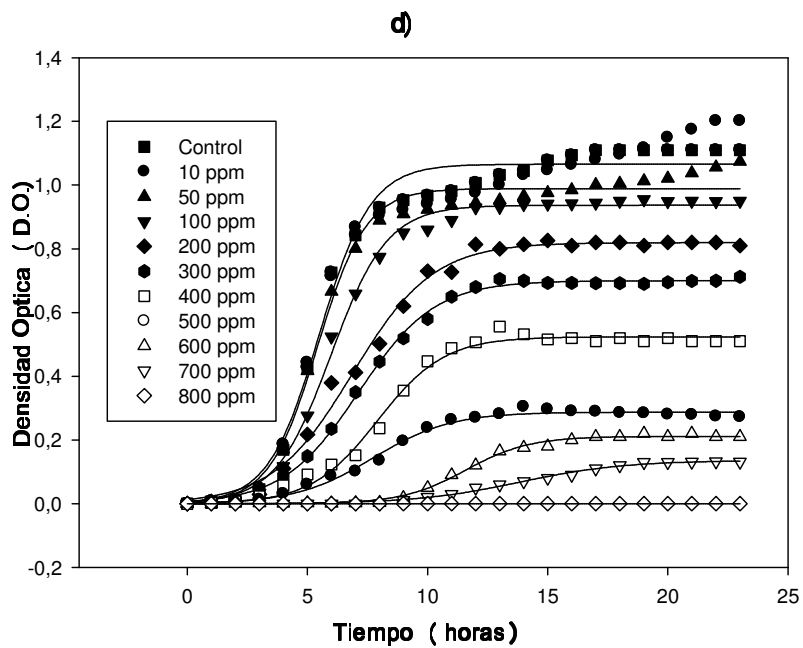


b)



c)





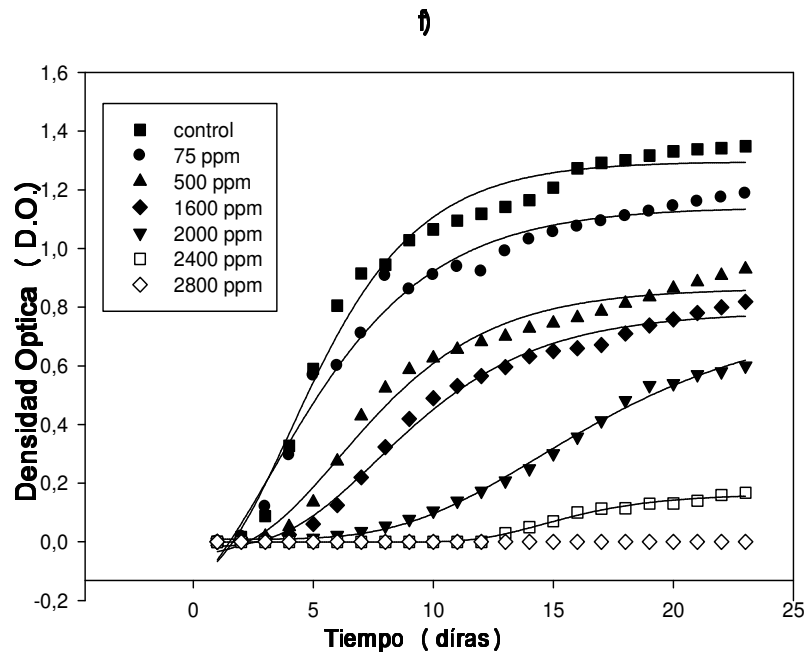


Figura 34. CPIs de *E. coli* O157:H7 en CTS a pH 7 y 6 con a) hojas de canela, b) clavo c) hojas de canelad) eugenol c) cinamaldehido y d) vainillina

Tabla 7. Tiempos de latencia y tiempo de generación (min) obtenidos para *L. monocytogenes* para determinadas CPIs

AEs	pH 7		pH6		CPIs (ppm)
	TL	TG	TL	TG	
AE h de canela	12,00±0,91	0,57±0,004	14,75±1,60	0,62±0,09	350
AE clavo	14,34±1,49	0,47±0,10	14,78±2,34	0,87±0,02	300
c. de canela	13,01±1,22	0,51±0,06	14,23±1,07	0,46±0,005	350
eugenol	14,00±1,06	0,69±0,10	13,00±1,45	0,81±0,09	500
cinamaldehido	15,10±0,09	0,56±0,10	15,58±1,59	0,77±0,07	300
vainillina	16,87±0,55	0,66±0,049	16,34±36,63	0,63±0,08	2000

Tabla 8. Tiempos de latencia y de generación (min) obtenidos para *E. coli* O157:H7 para determinadas CPIs.

AEs	pH 7		pH6		CPIs (ppm)
	TL	TG	TL	TG	
AEh. de canela	canela 12,80±	0,48±0,005	788,78±23,77	243,50±12,62	600
AE clavo	10,11±2,0	0,36±0,100	746,21±17,58	258,04±31,50	600
AEc. de canela	11,56±1,87	0,49±0,09	706,89±16,29	301,58±20,38	600
eugenol	10,24±1,29	1,10±0,98	759,54±34,85	227,79±13,07	600
cinamaldehido.	8,83±1,58	0,54±0,10	438,92±18,56	219,70±14,13	350
vainillina	15,91±0,53	0,65±0,04	2455,62±36,63	571,87±36,30	2000

3.1.4 Concentraciones Mínimas Bactericidas

El eugenol presentó una CMB de 1.000 ppm para *L. monocytogenes* y de 1.200 ppm para *E. coli* O157:H7. Las CMB halladas por otros autores para el eugenol se encuentran en un rango entre 810 ppm (Gill and Holley, 2004), 980 ppm para *L. monocytogenes* (Si y col., 2005) y alrededor de 2.000 ppm para *E. coli* O157:H7 (Oyedemi y col., 2008). Estos últimos lograron reducciones del orden de 8 ciclos logarítmicos en poblaciones de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 después de 20 horas de incubación con concentraciones x2 CMI de eugenol.

Aunque la actividad inhibitoria (CMI) del cinamaldehido fue similar a la del eugenol para ambos microorganismos, la actividad bactericida (CMB) fue mucho menor, encontrándose valores de CMBs para el cinamaldehído de 1.400 ppm para *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Efectos similares fueron encontrados por Gill y col., 2004, al estudiar la actividad bactericida del cinamaldehído frente a *L. monocytogenes*, y así concentraciones bactericidas de 1.600 ppm y 5.000 ppm de cinamaldehido lograron una disminución del ATP celular en *L. monocytogenes* y *E. coli* respectivamente.

Nostro y col. (2012) encontraron que concentraciones de cinamaldehído que son bacteriostáticas frente a *E. coli*, son bactericidas frente a *L. monocytogenes*. Viazis y col. (2010) encontraron que 5000 ppm de cinamaldehido lograron eliminar completamente células de *E. coli* sobre hojas de lechuga y de espinacas “baby”, en cambio una concentración de 10-000 ppm de cinamaldehido redujo sólo la población de *L.*

monocytogenes en 1 y 2.3 ciclos logarítmicos. Yossa y col. (2010) encontraron que 2 % de cinamaldehído era capaz de disminuir 5 ciclos logarítmicos de una población microbiana de *E. coli* O157:H7 en residuos orgánicos.

El AE de corteza de canela presentó una CMB de 1.000 ppm para *L. monocytogenes* y para *E. coli* O157:H7 una CMB de 1.200 ppm. Los valores de CMB encontrados en la literatura también fueron similares y oscilaron entre 1.000 ppm y 1.500 (Si y col. 2005; Ojagh y col., 2012).

Los valores de CMB de hojas de canela (1.000 ppm) obtenidos para *L. monocytogenes* en nuestro trabajo se encuentran también en el rango hallado por otros investigadores, 750 ppm (Smith y Palmer, 1998). Los valores de CMB encontrados en este trabajo para las hojas de canela frente a *E. coli* O157:H7 fueron de 1.200 ppm y los valores de CMB registrados en la literatura han sido un poco más elevados: 2.500 ppm (Shenjai y col., 2007).

Los valores de CMB del AE de clavo para *L. monocytogenes* fueron de 800 ppm y de 1.200 ppm para *E. coli* O157:H7. Los valores encontrados en la literatura para la CMB de este AE se encuentran entre 400 (Smith y Palmer, 1998), 700 ppm (Mahfuzul y col., 2008; Ayoola y col., 2008; Fu y col., 2007; Hernández–Ochoa y col., 2011) y 1.250 ppm (Fu y col., 2007). La CMB fué de 1.200 ppm. para *E. coli* O:157:H7 y los valores de CMB en la literatura se encuentran entre 2.500 y 5.000 ppm, (Si y col., 2005).

Para la vainillina, los valores de CMB fueron muy superiores a los de las CMI y estuvieron en el rango de 8.000 ppm para *L. monocytogenes* y de 6.000 ppm para *E. coli* O157:H7. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores, así Figerald y col., (2004) encontraron actividad bactericida de la vainillina, frente a *E. coli* O157:H7 y *Listeria innocua* entre 6.600 ppm y 9.240 ppm. La diferencia entre la CMI y la CMB puede ser atribuida a que la vainillina presenta una acción bacteriostática y no bactericida, en contraste a los antimicrobianos fenólicos más potentes como el eugenol carvacrol y timol que son bactericidas.

3.1.5 Discusión

La resistencia microbiana se relaciona con el valor de CMI (a mayor CMI mayor resistencia) y la sensibilidad microbiana con la CNI (mayor CNI menor sensibilidad) (Falcone, 2005; Guiller, 2007).

El grado de resistencia de *L. monocytogenes* a los antimicrobianos ensayados en este estudio presentó, de acuerdo a los valores de CMI, el siguiente orden: vainillina > eugenol > AE de hojas de canela > cinamaldehído > AE de clavo > AE de corteza de canela. Para *E. coli* O157:H7 fue el orden fue siguiente: vainillina > AE de hojas de canela > AE de clavo > eugenol > AE de corteza de canela > cinamaldehído.

El grado de sensibilidad microbiana frente a los antimicrobianos ensayados fue para *L. monocytogenes*: AE de corteza de canela > AE de clavo > cinamaldehído > eugenol < AE de hojas de canela > vainillina y para *E. coli* O157:H7: AE de corteza de canela > cinamaldehído > clavo > eugenol > AE de hojas de canela > vainillina.

La actividad bactericida (CMB) fue para *L. monocytogenes* en el siguiente orden: AE de clavo > AE de hojas de canela = eugenol > AE corteza de canela > cinamaldehído > vainillina. Para *E. coli* O 157:H7 el orden fue el siguiente: AE de clavo > AE de hojas de canela = eugenol > AE de corteza de canela > cinamaldehído > vainillina.

El compuesto puro que presentó mayor actividad inhibitoria fue el cinamaldehído. Los AEs que mostraron mayor actividad antimicrobiana y frente a los cuales los dos microorganismos diana mostraron mayor sensibilidad fueron el AE de corteza de canela y el el clavo. La vainillina fue el compuesto ensayado con menor actividad antimicrobiana frente a los dos microorganismos y el único antimicrobiano que presentó una menor actividad microbiana frente a *E. coli* O157:H7 que *L. monocytogenes*. El eugenol y el cinamaldehído presentaron una alta actividad inhibitoria frente a los dos microorganismos cuando se ensayaron de forma aislada, pero cuando se encuentran formando parte de los AEs de clavo y corteza de canela, su actividad se ve aparentemente influenciada por los componentes minoritarios presentes en el AE correspondiente. A este efecto se atribuye que los AEs de canela y clavo presentaran un actividad antimicrobiana diferente frente a los dos microorganismos diana, así por ejemplo a pesar de que el eugenol es el componente mayoritario de los AEs de clavo y hojas de canela, estos dos aceites presentan una actividad

mucho mayor que el componente puro, por lo que se infiere que el efecto de los componentes minoritarios es sinérgico para *L. monocytogenes* y mayor en el AE de clavo que en el AE de canela. Resultados similares se encontraron para el AE de corteza de canela, ya que este presentó mayor actividad que su componente mayoritario el cinamaldehído. Sin embargo para *E. coli* O157:H7 el efecto de los compuestos minoritarios fue opuesto, ya que las CMI's de los AEs fue mayor que para los compuestos puros- Numerosos estudios han demostrado que la interacción entre los componentes de los AEs es compleja e influye determinantemente en la actividad final de los AEs y aunque en algunos casos la actividad antimicrobiana final resultante está muy cercana a la actividad del componente principal, numerosos estudios han demostrado que un número elevado de compuestos exhiben propiedades antimicrobianas diferentes cuando se ensayan por separado (Bassolé, 2012). Específicamente hay estudios donde los monoterpenos fenólicos (timol, carvacrol) y los fenilpropanoides (eugenol) en combinación con otros componentes, en particular con otros fenoles, fenilpropanoides y monoterpenos incrementan su bioactividad en las mezclas. La actividad antimicrobiana de un AE depende principalmente de uno o dos de los principales constituyentes del AE. Sin embargo los últimos estudios indican que las interacciones entre los menores constituyentes de un AE son también muy importantes en la actividad antimicrobiana total. Estudios que registran mayor actividad de los aceites crudos comparados con las combinaciones de los principales componentes sugieren que los componentes minoritarios son críticos en la actividad de los AEs y pueden tener un efecto sinérgico (Marino y col., 2001; Delaquis y col., 2002; Burt, 2004; Koutsoudaki y col., 2005). Se han registrado numerosas combinaciones sinérgicas para los constituyentes o fracciones de los AEs cuando se ensayan en combinaciones binarias o terciarias (Delaquis y col., 2002; Pei y col., 2009; García-García y col., 2011; Nguéack y col., 2012). Ultee y col., 2002 y Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn (2010), observaron que el carvacrol y p-cymeno eran sinérgicos frente a *B. cereus*). p-cymeno produce disturbios en la membrana bacteriana y facilita la acción del carvacrol dentro de la membrana.

Los monoterpenos fenólicos y los fenilpropanoides por separado muestran una fuerte acción antibacteriana, por lo que la mayoría de los estudios se han enfocado en la interacción de los monoterpenos fenólicos (timol, carvacrol) y fenilpropanoides (eugenol, cinamaldehído) con otros grupos de componentes, particularmente con otros fenoles, fenilpropanoides y alcoholes monoterpenos, mientras que los monoterpenos y sesquiterpenos hidrocarbonados se han ensayado en menor extensión. Bassolé y col., (2012)

hacen una completa revisión de las diferentes combinaciones de aceites esenciales y sus componentes que se han ensayado hasta la fecha. La combinación de compuestos fenólicos con alcoholes monoterpenos produce efectos sinérgicos sobre muchos microorganismos, así como la mezcla de compuestos fenólicos (timol con carvacrol y ambos componentes con el eugenol). Mezclas de cinamaldehído con carvacrol o timol han resultado con efecto sinérgico y/aditivo frente a *E. coli* y *S. typhimurium*. Otros monoterpenos también han sido ensayados, particularmente el oxido 1,8-cineole que en combinación con hidrocarburos sesquiterpenos y monoterpenos se ha encontrado que tienen efectos aditivos y sinérgicos respectivamente. Otras combinaciones con efectos sinérgicos y aditivos incluyen alfa pineno con limoneno o linalool respectivamente.

De la misma forma, los componentes minoritarios causan también interacciones antagonísticas, así por ejemplo la actividad microbiana del carvacrol, principal componente del oregano, comparada con este AE se ha demostrado que es 1500 veces más efectiva (Rao y col., 2010). Sin embargo este tipo de interacción han sido menos estudiadas

Resultados similares se encontraron para los valores de CNI frente a los dos microorganismos, aunque no necesariamente los niveles más bajos de CMI correspondieron siempre a niveles más bajos de CNI. Un ejemplo se encuentra al comparar las CMI-CNI de el AE de hojas de canela y eugenol para *L. monocytogenes*, ya que a CMI más bajas no corresponden necesariamente CNI más bajas. Falcone y col. (2007) también encontraron efectos similares.

Los antimicrobianos con mayor actividad bactericida (CMB) frente a *L. monocytogenes* fueron el eugenol, los AEs de clavo y de hojas de canela, seguido por el AE de corteza de canela y el cinamaldehido y la vainillina. Los antimicrobianos con mayor actividad bactericida (CMB) frente a *E. coli* O 157:H7 fueron el eugenol y los AEs de clavo y hojas de canela, seguidos por el cinamaldehido y el AE de corteza de canela. La CMB de los compuestos puros, eugenol y cinamaldehido fue muy similar que a la de sus AES correspondientes: AE de clavo y hojas de canela por lo que se deduce que la principal actividad bactericida se debe principalmente a la de los componentes puros. Este efecto se presentó en los dos microorganismos ensayados.

La determinación de la CMI es un tema controvertido, pues los métodos tradicionales de análisis no permiten una medición cuantitativa, de hecho, el MIC es un rango de concentraciones que depende de la metodología a utilizar y en el caso específico de la técnica de dilución, de las series de dilución que se usen. En este estudio se determinaron las CMI y las CNI mediante el modelaje matemático utilizando la fracción del área bajo la curva. La ventaja del modelaje del área bajo la curva, es que se usan todos los datos y un índice de confianza se asocia con el valor de la CMI. Los métodos tradicionales se basan en la ausencia o no de crecimiento. En esencia, los únicos valores existentes son 1 para crecimiento, cero para no crecimiento, por lo que estos métodos tradicionales ignoran cualquier efecto de otras concentraciones Parcialmentees. Más aún, las técnicas actuales turbidométricas fallan en proveer datos cuantitativos precisos porque no usan todos los datos disponibles. Se demarca exactamente la diferencia entre crecimiento y no crecimiento y la concentración a la cual no hay crecimiento se denomina CMI, siendo descartadas las otras concentraciones. Mediante el área bajo la curva no solo se utilizan todos los datos sino que se obtiene un valor de la CMI mucho mas preciso, inclusive si ninguna de las concentraciones ensayadas conduce a una total inhibición del crecimiento. La confianza asociada a este valor es dependiente de todas las concentraciones ensayadas en oposición al método semicuantitativo, en el cual la posible CMI depende sólo del tamaño y del intervalo entre las concentraciones ensayadas.

El uso del modelaje matemático permite también un valor CNI o concentración por debajo de la cual se observa un crecimiento normal. El valor de CNI está relacionado con la sensibilidad bacteriana y el valor de CMI al de la resistencia. La posibilidad de inhibir completamente el crecimiento microbiano se relaciona con el uso del antimicrobiano como mínimo a niveles CMI. La diferencia entre la CMI y la CNI permite aclarar muchos conceptos del comportamiento microbiano en la presencia del antimicrobiano. Este concepto de CMI-CNI bajo el punto de vista práctico es de muchísima utilidad porque nos permite determinar las concentraciones subinhibitorias o CPIs que solas o en combinación con otros agentes antimicrobianos pueden inhibir el crecimiento microbiano totalmente o retrasarlo durante el periodo de vida útil al cual esté destinado el alimento. Así la diferencia entre CMI y la CNI puede ayudar a entender mejor el comportamiento de estos dos microorganismos en la presencia de los AEs ensayados y proporciona una serie de concentraciones Parcialmente inhibitorias (CPIs) que constituyen una herramienta importante para ser usada en la tecnología de combinación de obstáculos.

El concepto de MIC-NIC dentro de la tecnología de obstáculos, basada en la conservación de los alimentos mediante la combinación de varios obstáculos de menor intensidad, es muy importante pues permite el uso de concentraciones subinhibitorias que sumadas a otros factores de conservación pueden lograr el efecto deseado. Más aún las CNIs son fundamentales, ya que por ejemplo cuando las diferencias no son muy grandes entre la CMI y la CNI, un pequeño error en las concentraciones puede dirigir al lado equivocado del límite entre el área de crecimiento y no crecimiento. En este trabajo el rango entre las CMI y la CNI más pequeñas se encontraron para los compuestos eugenol, cinamaldehído y para el AE de corteza de canela, por lo que el número de CPI a elegir para obtener efecto antimicrobiano es más reducido y es necesario seleccionar con precisión estas concentraciones para lograr el efecto deseado.

En general las diferencias observadas entre los valores de CMI y CNI obtenidos en este trabajo y los encontrados por otros autores para los mismos compuestos antimicrobianos ensayados puede deberse a las diferencias en la composición y en las diferentes proporciones de compuestos minoritarios en los extracto analizados. Estas diferencias pueden ser debidas a la variedad de la planta, técnicas de cultivo, tiempo de cosecha, estadio del desarrollo y método de extracción, lo cual puede interferir con la presencia y/o ausencia de algunos compuestos químicos activos, así como puede interferir en la volatilización de estos compuestos (Probst y col., 2011).

Las diferentes técnicas usadas para determinar el valor de las CMI y CMB son factores que también influyen en la variabilidad de los resultados; la volatilidad y pobre solubilidad de la mayoría de los AEs es problemática, particularmente con métodos que descansan en la difusión o dilución de las sustancias en una solución. Así por ejemplo, cuando la metodología usada se basa en la técnica de difusión en disco o en agar, las concentraciones de antimicrobiano necesarias para inhibir a los microorganismos son también mayores (Burt, 2004).

La duración del tiempo del experimento para determinar la CMI es otro de los factores responsables de la variabilidad de los resultados. Se ha demostrado que la CMI aumenta con el tiempo de exposición al antimicrobiano. De esta forma, experimentos de corta duración podrían conducir a subestimar la CMI y por lo tanto a hacer peligrosas predicciones del

comportamiento de microorganismos patógenos en el alimento. Sin embargo la duración del tiempo del experimento no influye de manera determinante en el cálculo de las CNI porque la metodología del área bajo la curva esconde las pequeñas diferencias de las concentraciones subinhibitorias con relación al control (Lambert y Pearson, 2000; Gullier y col., 2007).

El género, la especie, la cepa microbiana y la concentración del inóculo también influyen en las diferencias obtenidas con resultados de CMI y CNI. Así por ejemplo, se han encontrado diferentes actividades antimicrobianas de un mismo aceite frente a diferentes cepas microbianas de una misma especie: Hefnaway y col. (1993) encontraron variaciones en la efectividad de distintos aceites frente a diferentes serotipos de *L. monocytogenes*, así especies como salvia, comino, ajo en polvo, pimentón, y pimienta mostraron actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* Scott A (serotipo 4b) y sólo la salvia mostró actividad frente a *L. monocytogenes*. Delakis y col. (2005) también encontraron diferentes CMIs frente a varias cepas de *L. monocytogenes*. Igualmente se han encontrado diferencias entre cepas de una misma especie, así por ejemplo Senhaji (2007) encontró diferentes CMI para el aceite de hojas de canela para distintas cepas de *E. coli* (625 ppm frente a *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25921, 1.250 ppm frente a *E. coli* ATCC25922 y 2500 ppm frente a *E. coli* ATCC11105. Diferencias en sensibilidad de la células diana han dado lugar también a resultados diferentes, atribuidas muchas veces al diferente estado fisiológico de los cultivos evaluados, así por ejemplo las células en estado estacionario son algo más resistentes. Es posible que el grado de estrés de las células por exposición de las mismas a condiciones desfavorables pueda cambiar la susceptibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos naturales evaluados. (Gill y col. 2002).

La diferente actividad que presenta un mismo aceite frente a diferentes bacterias se puede explicar en parte por la diferente morfología de las bacterias, que facilita o dificulta el mecanismo de acción de los AEs. En segundo lugar por la presencia de compuestos minoritarios y el diferente comportamiento sinérgico o antagónico frente a bacterias distintas. Aunque las posibles diferencias estructurales en la envoltura celular puede contribuir a la diferente resistencia o sensibilidad de las células bacterianas a los AEs, existen diferencias metabólicas que pueden ser importantes. Así por ejemplo entre las bacterias Gram + que suelen ser las más sensibles, se encuentran las bacterias ácido-lácticas como una de las más resistentes, y su habilidad para generar APT por fosforilación a nivel de sustrato puede ser una de las causas de esta resistencia. Diferencias en los niveles internos

de ATP en *L. monocytogenes* y *Lactobacillus plantarum* apoyan esta hipótesis (Gill y Holley, 2003). La capacidad para tratar con las condiciones de presión osmótica y responder más eficientemente al flujo de K^+ causado por los AEs puede ser otra de las causas (Holley y Patel, 2005). Otra posible causa de la resistencia frente a los fitoterapéuticos es la presencia de sitios multiresistentes que promuevan la síntesis y secreción de toxinas alifáticas (Probst y col, 2011).

Además de las diferencias morfológicas entre las bacterias, puede haber variaciones entre los componentes químicos de los AEs. Algunos AEs pueden penetrar fácilmente las bacterias y algunos fallan para interactuar con la pared celular, reduciendo su potencial antimicrobiano. Considerando la gran cantidad de diferentes grupos de compuestos químicos presentes en los AEs, lo más probable es que su actividad antibacteriana no se atribuya a un mecanismo específico de acción sino que haya diferentes sitios diana en la célula. Las localizaciones o mecanismos de acción de los AEs en la célula bacteriana se presentaron en la Figura 3. No todos estos mecanismos son sitios separados, algunos se afectan como consecuencia de otros sitios que son afectados (caso de las mezclas de antimicrobianos). Los AEs debido a su hidrofobicidad ejercen su acción primero por atravesar la pared celular y membrana citoplásmica, interrumpiendo la bicapa fosfolipídica de la membrana celular y de las mitocondrias, rompiendo estructuras y causando un incremento en la permeabilidad celular con la consecuente pérdida de componentes celulares (por ejemplo ribosa y N- glutamato). En las bacterias la permeabilización de la membrana está asociada con la pérdida de iones, la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y la disminución del ATP. Medidas del gradiente de pH en células creciendo exponencialmente revelan una clara disminución del potencial de membrana cuando se le añaden antimicrobianos. Aunque una cierta salida de material celular puede ser tolerada sin pérdida de viabilidad celular, la excesiva pérdida del contenido celular o la salida de moléculas críticas e iones conducen a la muerte celular, aunque hay algunas evidencias de que la muerte puede ocurrir antes de la lisis. La actividad antimicrobiana puede ser también debida a la inactivación de una serie de sistemas enzimáticos, incluyendo aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Así se ha demostrado que el nivel de ATP intracelular disminuye porque disminuye su síntesis o por que se activa su hidrólisis. Ciertos componentes de los AEs también parecen actuar sobre las proteínas de la célula que se encuentran embebidos en la membrana plasmática. Enzimas tales como la ATPasas están localizadas en la membrana citoplasmática bordeadas por moléculas lipídicas. Los AEs

podrían acumularse en la bicapa lipídica y distorsionar la interacción de los compuestos lípido-proteína o directamente interactuar con la parte hidrofóbica de la proteína. Por último pueden inactivar o destruir el material genético (Kim y col., 1995).

Los primeros estudios realizados para averiguar el mecanismo de acción de los aceites de canela y sus componentes fueron realizados por Wendakoon y Sakaguchi (1995), los cuales demostraron que estos aceites inhibían las decarboxilasas en *Enterobacter aerógenes*, mediante la unión con proteínas. Ousalah y col. (2006) estudiaron el mecanismo de acción del aceite de hojas de canela sobre *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* mediante medidas del pH extracelular y la concentración de ATP, salida de los constituyentes celulares y observaciones de micrografías electrónicas de ambos microorganismos en contacto con estos dos AEs. Concentraciones cercanas al MIC indujeron cambios en el pH intracelular y aumento del ATP extracelular. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que estos dos AEs tienen una acción inhibitoria sobre muchas enzimas, incluyendo la oxidasa mitocondrial del hígado, y las monooxigenasa microsomial B intestinal del hígado de rata. Usta y col. (2002) estudiaron la acción de los AEs de canela y el clavo sobre el potencial de membrana y la cadena respiratoria de aislados de mitocondrias de hígado de rata y encontraron que ambos estimulaban significativamente la ATPasa extracelular a niveles iguales o mayores que 0,3 mM, reducían el potencial de la membrana mitocondrial e inhibían la NADHoxidasa de la cadena respiratoria.

Oyedemi y col. (2008) demostraron que el eugenol ejercía su efecto sobre los lípidos de la membrana citoplasmática y mitocondrial de *L. monocytogenes* y Hemaiswarya y col. (2009) con células humanas demostraron que el eugenol provocaba daños en la membrana citoplasmática, siendo 1mM de concentración capaz de dañar casi el 50% de la población. Estos resultados son importantes dado el problema que se enfrenta actualmente con la resistencia a los antibióticos y el uso combinado de eugenol podría reducir el uso de estos para conseguir el mismo efecto.

La actividad antimicrobiana del cinamaldehído se atribuye fundamentalmente al grupo aldehído, aunque el enlace doble conjugado, y el grupo hidroxilo también son responsables. Chang y col. (2001) encontraron que el cinamaldehído demostró mayor actividad antimicrobiana frente a un extenso rango de bacterias que el ácido cinámico, el cinnamyl alcohol cinámico el acetato de cinnamyl. La presencia de los dobles enlaces en el grupo

aldehído son responsables de su gran actividad antimicrobiana, ya que estos grupos son muy reactivos y pueden formar puentes covalentes con el ADN y las proteínas interfiriendo con sus funciones normales. Se ha demostrado que el grupo hidroxilo reacciona con los sitios de enzimas activos a través de la formación de puentes de hidrógeno o actúa como un transportador a través de la membrana para cationes monovalentes (Fitzgerald y col., 2005).

De acuerdo a Gill y Holley (2006) los efectos en la generación de energía juegan claramente un papel mayoritario en la actividad bactericida del eugenol y del cinamaldehído. Los posibles mecanismos de inhibición son la disrupción de la generación de energía, mediante la inhibición de la sustracción o utilización de glucosa. En el caso del eugenol hay también efectos de permeabilización de membrana, que permiten la salida del ATP intracelular que en el caso del cinamaldehído no están tan claros pues aunque hay inhibición de la ATPasa citoplásmica y salida de pequeños iones no hay evidencia de la salida al exterior de ATP (Gill y Holley, 2006). Di Pasqua y col (2007) demostraron mediante cromatografía de gases y microscopía electrónica que el eugenol y el cinamaldehído se comportaban de diferente forma frente a células de *E. coli* O157:H7, así aunque todas las células presentaron un fuerte descenso en el perfil de ácidos grasos poliinsaturados, la mayoría de las células tratadas con cinamaldehído no presentaban daños estructurales en la membrana, y en cambio el eugenol sí producía deterioro en la pared celular y un alto grado de lisis celular, debido a la unión del grupo hidroxilo del eugenol con ciertas proteínas.

El modo de acción de la vainillina ha sido estudiado por Fitzgerald y col. (2005), siendo el grupo aldehído y el grupo lateral del anillo benzénico responsables de su actividad microbiana. Debido a su naturaleza hidrofóbica, los mecanismos antimicrobianos de la vainillina están principalmente basados exclusivamente en su habilidad para destruir la membrana citoplasmática de las células microbianas a través de la interacción con los lípidos y las proteínas o con ambas estructuras, con la subsecuente pérdida de gradiente iónico e inhibición de la actividad respiratoria. Esto fue demostrado por Fitzgerald y col. (2004) al encontrar que suspensiones de células bacterianas de *Listeria innocua* y de *E. coli* O157:H7 suplementadas con vainillina presentaban sólo una pequeña parte de la población teñida cuando se les incorporaba un marcador de ácidos nucleicos, lo que reflejaba que la mayor parte de la población presentaba la membrana citoplasmática intacta y que el daño

causado por la vainillina era menor. Este hecho da explicación al efecto bacteriostático de la vainillina.

Los análisis estadísticos no demostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las CMI a pH 7 y 6 para ninguno de los AEs estudiados durante el desarrollo de este trabajo. La influencia del pH tampoco se reflejó en los valores de la fase de latencia y del tiempo de generación de las CPI estudiadas (Tablas 6 y 7). Estudios anteriores han encontrado una influencia significativa del pH en la actividad antimicrobiana de algunos AEs, frente a determinados microorganismos. Angienda y Gill (2012) encontraron que la CMI del clavo frente a *E. coli* O157:H7 disminuía cuando el pH del medio de crecimiento descendía a 5, así como también encontraron fases de latencia y tiempos mayores de generación en las curvas de crecimiento obtenidas a concentraciones subinhibitorias. Mahfuzul y col. (2008) encontraron que el pH 5 aumentaba la actividad microbiana de los aceites de canela y clavo frente a *E. coli* O157: H7. Angioma y Gill (2012) también encontraron que una disminución del pH entre 7 y 5,5 aumentaba la efectividad del aceite de clavo y orégano frente a *E. coli* O157:H7 y *Bacillus cereus*. Gutierrez y col. (2008) demostraron que pH cercanos a 5 influían positivamente en la actividad antimicrobiana del orégano y el tomillo frente a *L. monocytogenes*, aumentando la fase lag y la velocidad de crecimiento, sin embargo estas diferencias no fueron observables a pH 6 y 7, sólo a pH 5.

Uno de los criterios más importantes en seleccionar buenos candidatos para sustituir a los antibióticos para el control de bacterias patógenas de humanos y animales es su habilidad para resistir el pH y por lo tanto puedan servir como alternativas naturales a los antibióticos para el control de bacterias patógenas. Si y col. (2005) estudiaron el efecto del pH sobre los AEs de clavo, canela, y sobre el eugenol con el objetivo de conocer si estos antimicrobianos son capaces de superar el pH ácido del estómago de los cerdos. Los estudios que realizaron demostraron que una preincubación en un ambiente ácido (pH 2) no afectaba significativamente el porcentaje de inhibición obtenido posteriormente en caldo CTS a pH 7. Mahaboob y col. (2005) demostraron que el eugenol y el cinamaldehído podrían ser excelentes antimicrobianos frente a *Helicobacter pylori*, ya que su efecto se incrementaba a pH 4 sobre pH 7. Santiesteban-Lopez y col. (2007) encontraron que los conservantes naturales como el thimol, carvacrol o eugenol incrementaban su actividad frente a variaciones de pH. Una de las explicaciones radica en que cuando el pH baja se incrementa la solubilidad y estabilidad de estos compuestos (Lopez-Malo y col., 1997; Juven y col., 2001) y de una forma similar a los ácidos orgánicos, tienden a exhibir mayor actividad a

valores de pH cercanos al pK, debido a un incremento en la proporción no disociada, la forma antimicrobiana más activa, ya que son más hidrofóbicos y así pueden unirse mejor a la parte hidrofóbica de las proteínas y disolverse mejor en la fase lipídica (Juven y col., 1994; Del Campo y col., 2000; Hsieh y col., 2001; Wen y col., 2003).

Delakis y col. (2005) no encontraron diferencias significativas entre las CMI_s de la vainillina pH 6 y 7 para varias cepas de *L. monocytogenes*, sin embargo estos mismos autores encontraron que la vainillina presenta mayor actividad a pH 7 que a pH 5, lo cual lo atribuyen a que la vainillina aunque es un aldehído, exhibe un comportamiento acido-base a 25 °C (pK=7,4) y a este pH la disociación del radical hidroxilo ionizable es mayor. Según Juven y col. (2001) los iones hidrógeno bajan el pH del medio y actúan sobre las membranas celulares de los microorganismos volviéndolas permeables, conduciendo a la ruptura del contenido celular y resultando en la muerte de los microorganismos. En general, cuando las condiciones se vuelven menos favorables y el microorganismo es más sensible (bajo pH y baja a_w), el microorganismo muestra mayor dificultad para vencer los cambios de pH. y la CMI disminuye (Santiesteban-Lopez y col., 2007).

3.1.6. Concentraciones Inhibitorias Fraccionadas. Construcción de isobologramas.

En las Figuras 35-46 se representan mediante isobologramas, las concentraciones ensayadas de las mezclas que fueron capaces de inhibir el crecimiento. En las tablas 8/20 se observan las CFI_s individuales, los CFI_s de las combinaciones y el índice CFI_i mezcla obtenido para las combinaciones de antimicrobianos evaluadas.

La interpretación del CFI_i como un valor numérico es arbitraria y los umbrales que se utilizan para considerar que una interacción es sinérgica, antagónica o aditiva han cambiado debido a la necesidad de establecer interacciones que sean clínicamente significativas. Las primeras interpretaciones se deben a Berenbaum (1989), el cual consideró que las interacciones sinérgicas presentaban valores C (FI_i<1, las aditivas CFI_i=1 y las antagónicas CFI_i>1 y han sido usadas en muchos artículos para describir las interacciones. Una aproximación más conservativa para describir las interacciones es recomendada por Odds (2003) y así se describen las interacciones como sinérgicas. Desafortunadamente el rango de no interacción es muy amplio y no permite interpretaciones aditivas. Este criterio

ha sido posteriormente modificado en numerosos trabajos publicados en revistas científicas reconocidas, incorporando un rango aditivo para mayor clarificación de los datos. Teniendo en cuenta estas consideraciones una reacción es sinérgica si el índice $CFI < 0,5$, aditiva si $CFI > 0,5-1$, no interactúa si $FIC > 1-4$ ($1 < CFI_i < 4$) y antagonica si $CFI_i > 4,0$ (Bell, 2005; Iten y col., 2009; De Oliveira y col., 2010).

En este estudio la combinación de la mezclas de eugenol y cinamaldehido para *L. monocytogenes* se consideró aditiva por su valor de $CFI = 0,75$ (Tabla 7) y la posición de su correspondiente isoblograma en el cuadrante B (Figura 35). Moleyar y Narasimham (1992) también encontraron un efecto aditivo en mezclas de eugenol y cinamaldehido para *L. monocytogenes*.

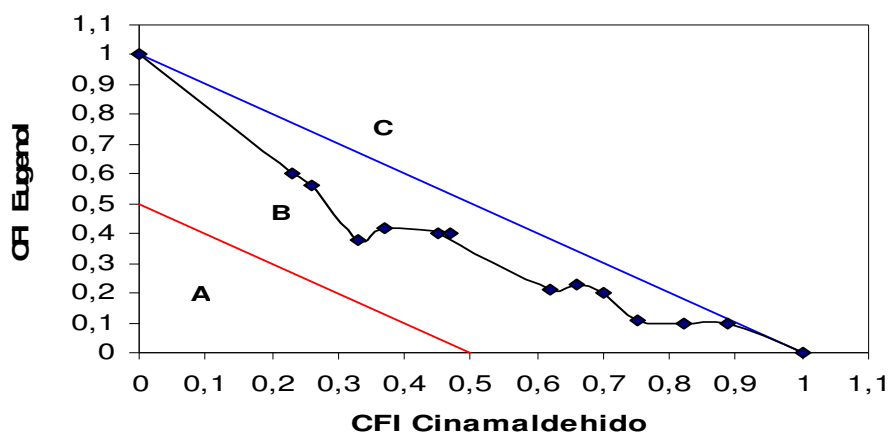


Figura 35. Isoblograma de las mezclas de eugenol y cinamaldehido frente a *L. monocytogenes* Scott A en CTS.

Tabla 9. Concentraciones de cinamaldehído (cin) y eugenol (eu) ensayadas en combinación frente a *L. monocytogenes* Scott A, CMI de los compuestos individuales, CFIs de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla.

[cin]	CFI _{cin}	[eu]	CFI _{eu}	CFI _i
473,70	1,00	0,00	0,00	1,00
421,06	0,89	37,90	0,09	0,98
388,43	0,82	40,00	0,10	0,92
355,27	0,75	44,00	0,11	0,86
331,59	0,70	80,00	0,20	0,90
312,64	0,66	92,00	0,23	0,89
293,69	0,62	84,00	0,21	0,83
213,16	0,45	160,00	0,40	0,85
222,64	0,47	160,00	0,40	0,87
175,27	0,37	168,00	0,42	0,79
156,32	0,33	152,00	0,38	0,71
123,16	0,26	224,00	0,56	0,82
108,95	0,23	240,00	0,60	0,83
0,00	0,00	400,00	1,00	1,00
CMI_{Cin}= 473,70		CMI_{Eu}= 555,56		CFI_i= 0,75

Los índices CFI_i medios de las mezclas de los AEs de hojas de canela y de clavo para *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 fueron de 0,87 y 0,91 respectivamente (Tablas 8 y 9) y sus isobogramas (Figuras 36 y 37) se posicionaron en el cuadrante B de la gráfica, por lo que el efecto de la mezcla se consideró aditivo al igual que las mezclas de eugenol y cinamaldehído. Este efecto aditivo de los AEs de hojas de canela y clavo puede explicarse porque la composición de ambos aceites es muy similar, con un elevado contenido en eugenol y bajo en cinamaldehído. El efecto antimicrobiano de la mezcla se debe en primer lugar a la combinación en de estos dos compuestos activos y en segundo lugar a la de los componentes minoritarios.

El mayor índice CFI_i de la mezcla de clavo y hojas de canela frente a *E. coli* O157:H7 podría explicarse por el hecho de que este microorganismo es menos resistente al eugenol

que *L. monocytogenes*. Fu y col. (2007) encontraron un efecto aditivo entre mezclas de clavo y romero frente a *E. coli*.

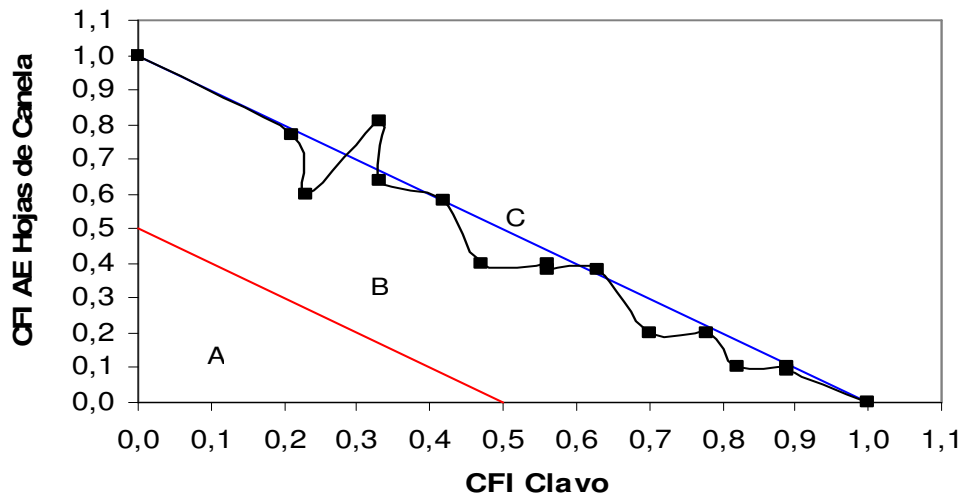


Figura 36. Isoblograma de CFIs de las mezclas de AEs de clavo y de hojas de canela frente a *L. monocytogenes*.

Tabla 10. Concentraciones de los AEs de clavo y de hojas de canela ensayados en combinación frente a *L. monocytogenes*, CMI de los compuestos individuales, CFIs de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla.

[clavo]	CFI _{cl}	[hojas de canela]	CFI _{hc}	CFI _i
404,95	0,89	36,00	0,09	0,98
404,95	0,89	40,00	0,10	0,99
373,10	0,82	40,00	0,10	0,92
354,90	0,78	80,00	0,20	0,98
318,50	0,70	80,00	0,20	0,90
286,65	0,63	152,00	0,38	1,01
254,80	0,56	152,00	0,38	0,94
254,80	0,56	160,00	0,40	0,96
213,85	0,47	160,00	0,40	0,87
191,10	0,42	232,00	0,58	1,00
150,15	0,33	256,00	0,64	0,97
150,15	0,33	324,00	0,81	1,14
104,65	0,23	240,00	0,60	0,83
95,55	0,21	308,00	0,77	0,94
0,00	0,00	400,00	1	0,99
CMI _{cl} = 455,00		CMI _{hc} =500,00		CFI _i =0,85

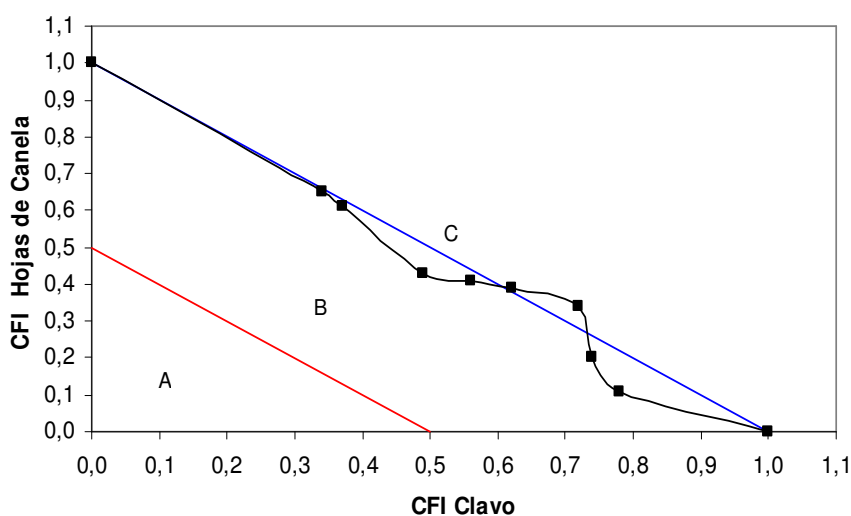


Figura 37 Isoblograma de las mezclas de AEs de clavo y de hojas de canela frente a *E. coli* O157:H7.

Tabla 11. Concentraciones de AEs de clavo y de hojas de canela ensayados en combinación frente a *E. coli* O157:H7, CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla

[clavo]	CFI _{cl}	[hojas de canela]	CFI _{hc}	CFI _i
0,00	0,00	889,00	1,00	0,98
86,02	0,11	693,42	0,78	0,99
156,40	0,22	657,86	0,74	0,92
265,88	0,34	640,08	0,72	0,98
304,98	0,39	551,18	0,62	0,90
320,62	0,40	497,84	0,56	1,01
336,26	0,43	435,61	0,49	0,94
477,02	0,61	328,93	0,37	0,96
508,30	0,65	302,26	0,34	0,87
782,00	1,00	0,00	0,00	1,00
CMI_{cl}= 782,00		CMI_{hc}=889,00		CFI_i=0,88

Las mezclas de los AEs de corteza de canela con clavo y corteza de canela con hojas de canela presentaron para *L. monocytogenes* (0,66 y 0,70) (Tabla 12) menor CFI que la que presentaron las mezclas de las hojas de canela y clavo, con una concavidad de su isoblograma mayor (Figuras 38 y 39). Sin embargo para *E. coli* O157:H7 el CFI_{medio} =1,11 y la posición del isoblograma correspondiente en el cuadrante C calificaron a esta combinación como indiferente (Figura 40, Tabla 13). De estos resultados se puede inferir que los componentes minoritarios presentes en el aceite de corteza se comportan de manera diferente frente a los dos microorganismos estudiados, sinérgica frente a *L. monocytogenes* y antagónica frente a *E. coli* O157:H7. Esta misma conclusión se obtuvo cuando se evaluó la actividad antimicrobiana del AE de corteza de canela individualmente frente a estos dos microorganismos, obteniéndose una CMI mayor para *E. coli* que para *L. monocytogenes*. Resultados similares fueron encontrados por Lu y col. (2011) con mezclas de canela y clavo, las cuales presentaron un efecto aditivo para bacterias Gram + como *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* y un efecto indiferente frente a bacterias Gram – como *E. coli* y *S. typhimurium*. Matan y col., 2006 probaron la actividad inhibitoria de mezclas de AEs de canela y clavo

frente a cuatro especies de hongos, cuatro especies de levaduras y dos especies de bacterias en alimentos de humedad intermedia y se expusieron a los volátiles de estos aceites bajo una atmósfera modificada de bajo O₂ y alto CO₂. Combinaciones de estos AEs fueron muy eficaces para lograr la inhibición de estos microorganismos.

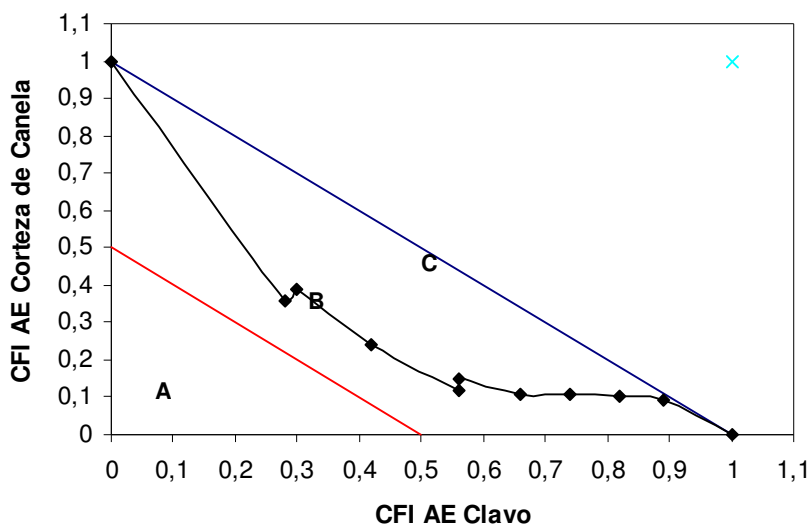


Figura. 38. Isoblograma de las mezclas de AEs de clavo y de corteza de canela frente a *L. monocytogenes*

Tabla 12. Concentraciones de los AEs de clavo y corteza de canela ensayados en combinación frente a *L. monocytogenes* Scott A, CMI_i de los compuestos individuales, CFI_i de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla

[clavo]	CFI _{cl}	[corteza de canela]	CFI _{cc}	CFI _i
455,00	1,00	0,00	0,00	1
404,95	0,89	37,53	0,09	0,98
373,1	0,82	41,70	0,11	0,92
336,7	0,74	45,87	0,11	0,85
300,3	0,66	45,87	0,11	0,77
254,8	0,56	62,55	0,15	0,71
254,8	0,56	50,04	0,12	0,68
191,1	0,42	100,08	0,24	0,66
136,5	0,3	162,63	0,39	0,69
127,4	0,28	150,12	0,36	0,64
0,00	0,00	417,00	1,00	1
CMI _{cl} = 455,00		CMI _{cc} = 417,00		CFI _i = 0,66

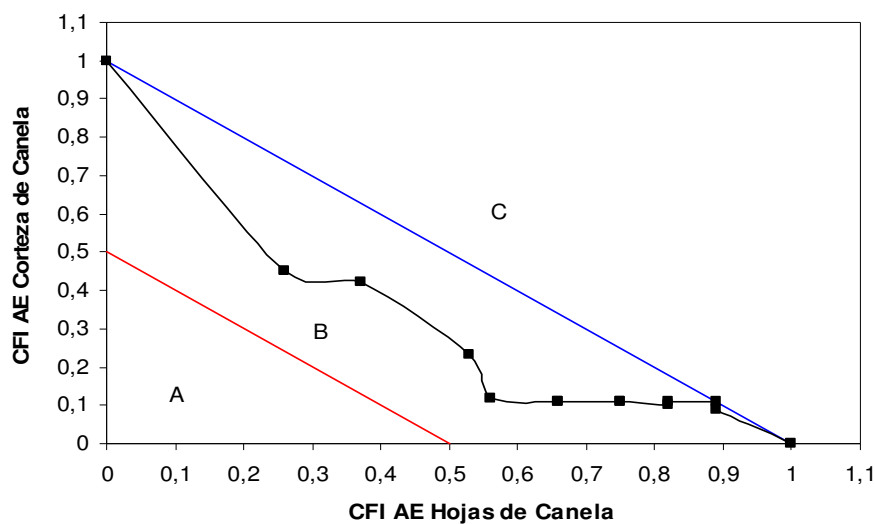


Figura 39. Isoblograma de las mezclas de AEs de corteza de canela y hojas de canela frente a *L. monocytogenes* Scott A.

Tabla 12. Concentraciones de los AEs de hojas de canela y corteza de canela usados en combinación frente a *L. monocytogenes* Scott A, CMI de los compuestos individuales, CFI de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla

[hojas de canela]	CFI _{hc}	[corteza de canela]	CFI _{cc}	CFI _i
512,00	1,00	0,00	0,00	1,00
455,68	0,89	37,53	0,09	0,98
455,68	0,89	45,87	0,11	1,00
419,84	0,82	45,87	0,11	0,93
419,84	0,82	41,70	0,10	0,92
384,00	0,75	45,87	0,11	0,86
384,00	0,75	45,87	0,11	0,86
337,92	0,66	45,87	0,11	0,77
337,92	0,66	45,87	0,11	0,77
286,72	0,56	50,04	0,12	0,68
271,36	0,53	95,91	0,23	0,76
189,44	0,37	175,14	0,42	0,79
133,12	0,26	187,65	0,45	0,71
0	0,00	417,00	1,00	1,00
CMI_{hc} = 512,00		CMI_{cc} = 417,00		CFI_i = 0,70

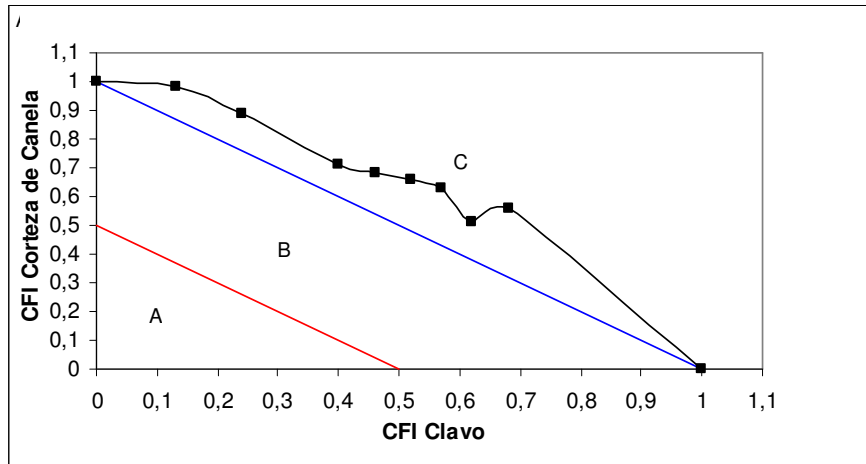


Figura 40. Isoblograma de CFIs de las mezclas de los AEs de clavo y corteza de canela frente a *E. coli* O157:H7.

Tabla 13. Concentraciones de AEs de clavo y corteza de canela usados en combinación frente a *E. coli* O157:H7, CMIs de los compuestos individuales, CFIs de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla

[clavo]	CFI _{cl}	[corteza de canela]	CFI _{cc}	CFI _i
778,00	1,00	0,00	0,00	1,00
529,04	0,68	403,20	0,56	1,24
482,36	0,62	367,20	0,51	1,13
443,46	0,57	453,60	0,63	1,20
404,56	0,52	475,20	0,66	1,18
357,88	0,46	489,60	0,68	1,14
311,20	0,40	511,20	0,71	1,11
186,72	0,24	640,80	0,89	1,13
101,14	0,13	705,60	0,98	1,11
0,00	0,00	720,00	1,00	1,00
CMI _{hc} = 778,00		CMI _{cc} = 720,00		CFI _i = 1,11

Las combinaciones de vainillina con AEs de hojas de canela, corteza de canela y clavo presentaron valores de CFI para *L. monocytogenes* de respectivamente 0,87, 0,52 y 0,53, que califican a esta combinación de aditiva pero muy cerca de la sinergia (Figuras 41, 42, 43). Las combinaciones para *E. coli O157:H7* fueron todas sinérgicas con valores de CFI_i entre 0,42 y 0,45 (Figuras 44, 45,46). Estos resultados obtenidos en las combinaciones se corresponden con los resultados obtenidos en los ensayos de la CMI individuales, ya que *E. coli O157:H7* fue también algo más sensible a la vainillina que *L. monocytogenes*

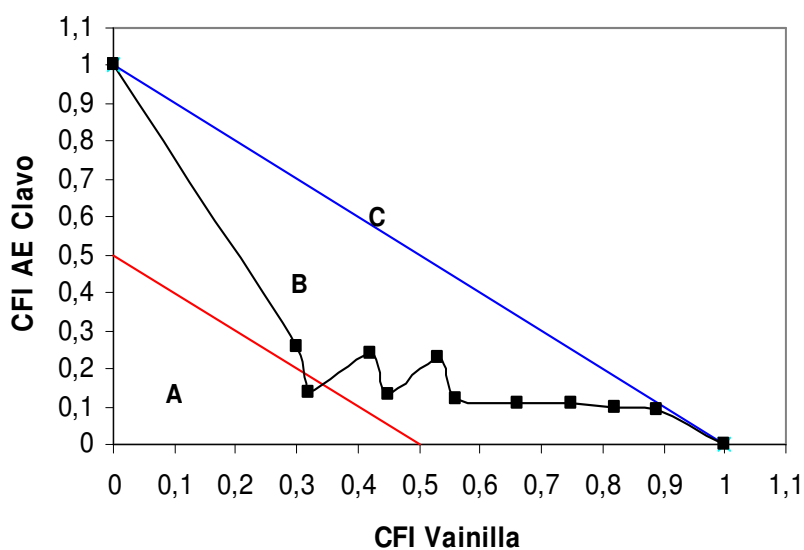


Figura 41. Isoblograma de CFI de las mezclas de AE de clavo y de vainillina frente a *L. monocytogenes* Scott A

Tabla 14. Concentraciones del AE de clavo y de vainillina ensayadas en combinación frente a *L. monocytogenes* Scott A, CMI_v de los compuestos individuales, CFI_v de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla

[vainillina]	CFI _v	[clavo]	CFI _{cl}	CFI _i
3032,00	1,00	0,00	0,00	1,00
2698,48	0,89	40,95	0,09	0,98
2486,24	0,82	45,50	0,10	0,92
2274,00	0,75	50,05	0,11	0,86
2001,12	0,66	50,05	0,11	0,77
1697,92	0,56	54,60	0,12	0,68
1606,96	0,53	104,65	0,23	0,76
1364,40	0,45	59,15	0,13	0,58
1273,44	0,42	109,20	0,24	0,66
970,24	0,32	63,70	0,14	0,46
909,60	0,30	118,30	0,26	0,56
0,00	0,00	455,00	1,00	1,00
CMI _v = 3.032,00		CMI _{cl} = 455,00		CFI _i = 0,53

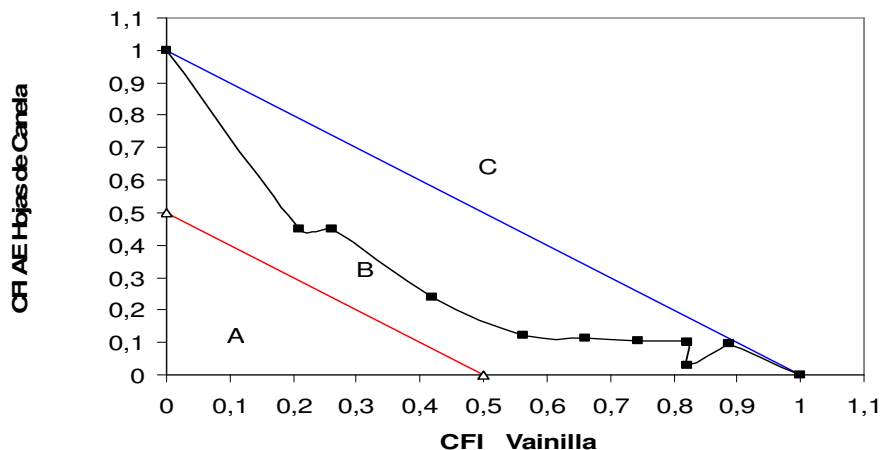


Figura 42. Isoblograma de CIFs de las mezclas de AE de hojas de canela y de vainillina frente a *L. monocytogenes* Scott A

Tabla 15. Concentraciones de los AEs de hojas de canela y de vainillina usados en combinación frente a *L. monocytogenes*,

[vainillina]	CFI _v	[hojas de canela]	CFI _{hc}	CFI _i
3.032,00	1,00	0,00	0,0	1,00
404,95	0,89	45,00	0,09	0,98
373,10	0,82	15,00	0,03	0,85
373,10	0,82	50,00	0,10	0,92
341,25	0,75	55,00	0,11	0,86
300,30	0,66	55,00	0,11	0,77
254,80	0,56	60,00	0,12	0,68
191,10	0,42	120,00	0,24	0,66
118,30	0,26	225,00	0,45	0,71
95,55	0,21	225,00	0,45	0,66
0,00	0,00	500,00	1,00	1,00
CMI_v= 3.032,00		CMI_{hc}= 500,00		CFI_i= 0,67

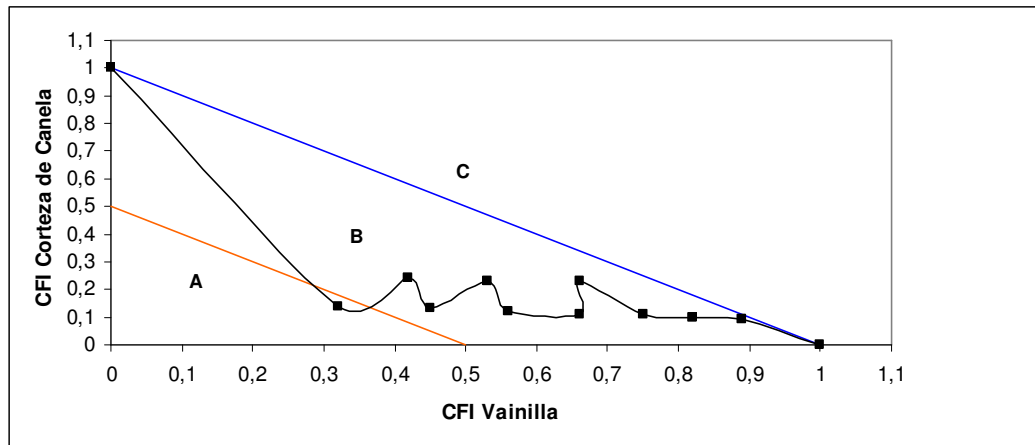


Figura 43. Isoblograma de las mezclas del AE de corteza de canela y vainillina frente a *L. monocytogenes*

Tabla 16. Concentraciones de AEs de hojas de canela y de vainillina usados en combinación frente a *L. monocytogenes*, CMI de los compuestos individuales, CFIs de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla

[vainillina]	CFI _v	[corteza de canela]	CFI _{cc}	CFI _i
3032,00	1,00	0,00	0,00	1,00
2698,48	0,89	37,44	0,09	0,98
2486,24	0,82	41,60	0,10	0,92
2274,00	0,75	45,76	0,11	0,86
2001,12	0,66	95,68	0,23	0,89
1697,92	0,56	45,76	0,11	0,67
1606,96	0,53	49,92	0,12	0,65
1364,40	0,45	95,68	0,23	0,68
1273,44	0,42	54,08	0,13	0,55
970,24	0,32	99,84	0,24	0,56
909,60	0,30	58,24	0,14	0,44
0,00	0,00	416,00	1,00	1,00
CMI_v= 3.032,00		CMI_{cc}= 416,00		CFI_i= 0,51

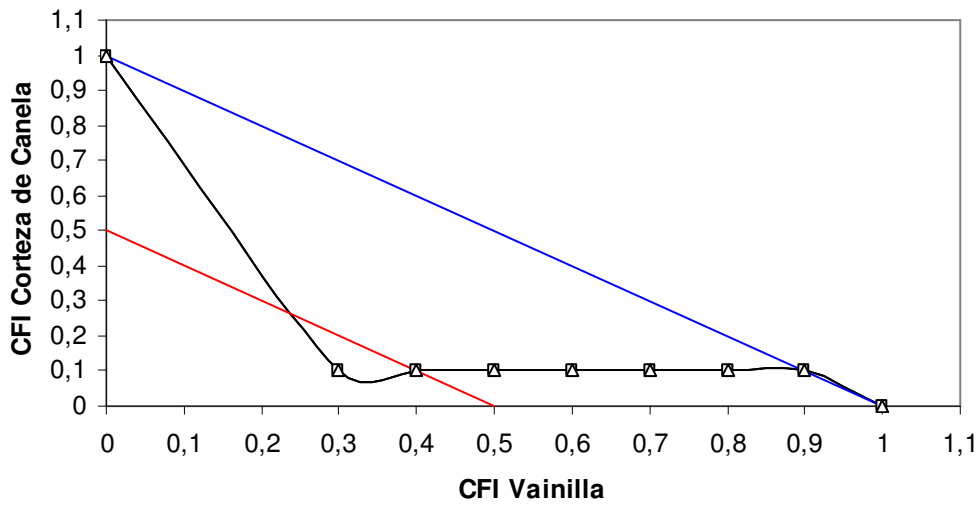


Figura.44. Isoblograma de CIFs de las mezclas de AEs de hojas de canela y de vainillina frente a *E. coli* O157:H7

Tabla 17. Concentraciones del AE de hojas de canela y de vainillina ensayadas en combinación frente a *E. coli* O157:H7, CMI de los compuestos individuales, CIFs de las combinaciones e índice CIF_i de la mezcla

[vainillina]	CIF_v	[corteza de canela]	CIF_{cc}	CIF_i
2843,00	1,00	0,00	0,00	1,00
2530,27	0,89	86,02	0,11	1,00
2331,26	0,82	86,02	0,11	0,93
1904,81	0,67	86,02	0,11	0,78
1592,08	0,56	86,02	0,11	0,67
1194,06	0,42	109,48	0,14	0,56
796,04	0,28	93,84	0,12	0,40
0,00	0,00	782,00	1,00	0,56
$CMI_v = 2843,00$		$CMI_{cc} = 782,00$		$CIF_i = 0,48$

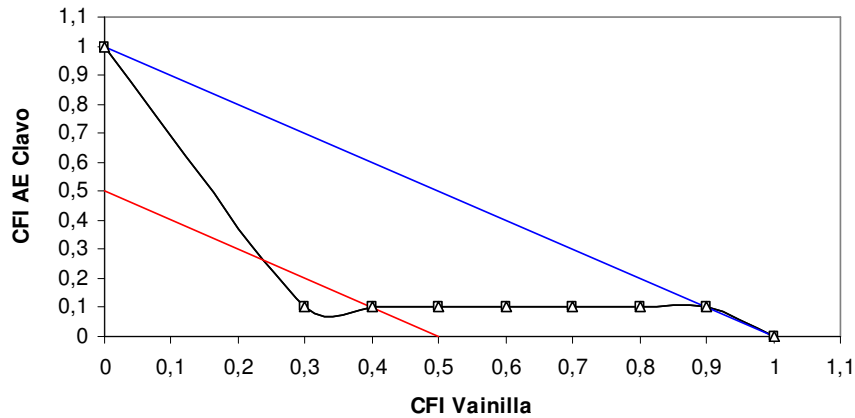


Figura 45. Isoblograma de CIFs de las mezclas del AE de clavo y de vainillina frente a *E. coli* O157:H7.

Tabla 18. Concentraciones de AE de clavo y de vainillina ensayados en combinación frente a *E. coli* O157:H7, CMI_v de los compuestos individuales, CFI_{cl} de las combinaciones e índice CFI_i de la mezcla.

[vainillina]	CFI _v	[clavo]	CFI _{cl}	CFI _i
2843,00	1,00	0,00	0,00	1
2530,27	0,89	80,01	0,09	0,98
2331,26	0,82	88,90	0,10	0,92
2132,25	0,75	97,79	0,11	0,86
1762,66	0,62	97,79	0,11	0,73
1592,08	0,56	106,68	0,12	0,68
1279,35	0,45	115,57	0,13	0,58
796,04	0,28	106,68	0,12	0,40
0,00	0,00	889,00	1,00	1
CMI_v = 2843,00		CMI_{cl} = 889,00		CFI_i = 0,49

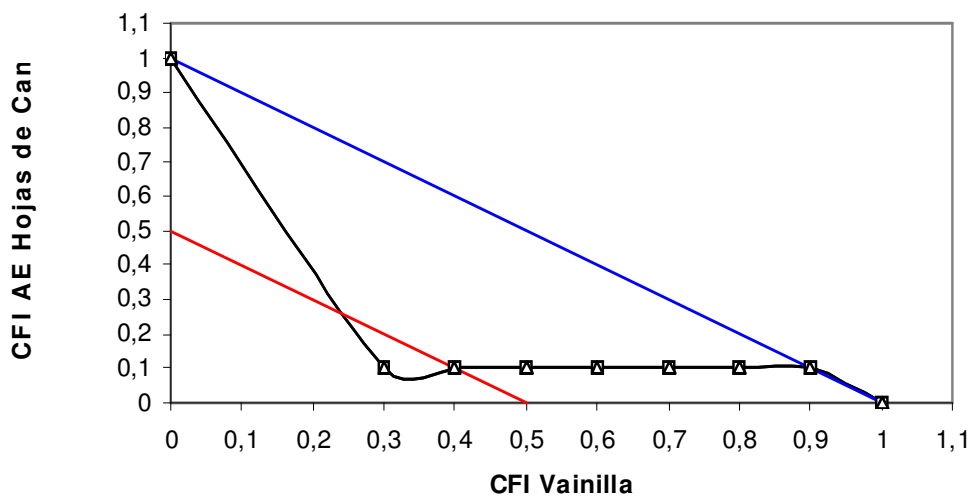


Figura 46. Isoblograma de las mezclas del AE de corteza de canela y de vainillina frente a *E. coli* O157:H7.

Tabla 19. Concentraciones de vainillina y de AE de corteza de canela ensayadas en combinación frente a *E. coli* O157:H7, CMI de los compuestos individuales, CFIs de las combinaciones e índice CIF_1 de la mezcla.

[vainillina]	CFI_v	[hojas de canela]	CFI_{hc}	CFI_i
2843,00	1,00	0,00	0,00	1,00
2530,27	0,89	80,01	0,09	0,98
2331,26	0,82	88,90	0,10	0,92
2132,25	0,67	97,79	0,11	0,86
1762,66	0,56	97,79	0,11	0,73
1592,08	0,42	106,68	0,12	0,68
1279,35	0,28	115,57	0,13	0,58
796,04	0,00	106,68	0,12	0,40
0,00	0,00	889,00	1,00	1,00
$CMI_v=2843,00$		$CMI_{hc}=889,00$		$CFI_i=0,49$

3.1.6 Discusión

Los mecanismos de la interacción que producen sinergismo incluyen inhibición secuencial de un camino bioquímico común, inhibición de distintas enzimas protectoras, combinación con agentes activos en la pared celular que permiten la entrada de otros antimicrobianos (Santesteban-Lopez y col., 2007). Los mecanismos que producen antagonismo son menos conocidos aunque incluyen combinaciones de agentes bacteriostáticos y bactericidas, uso de compuestos que actúan sobre el mismo sitio diana de los microorganismos e interacciones químicas entre compuestos. También es preciso considerar la variabilidad de las posibles interacciones que pueden ocurrir dentro de todo el conjunto de compuestos activos presentes no solamente dentro de un AE sino en varias combinaciones. Aún más, los principales mecanismos de acción pueden ser potenciados por otros menos efectivos y viceversa.

Aunque todos estos mecanismos han sido propuestos, estudios que lo confirmen estos mecanismos son escasos. En general el modo de acción es raramente demostrado, y generalmente queda como recomendación para estudios posteriores, por lo que es importante que se siga investigando en esta área, siempre considerando que es muy compleja.

Una de las principales causas por la que las combinaciones entre dos compuestos potencian su actividad antimicrobiana en las mezclas se debe a que presentan sitios de acción diferentes en la célula microbiana. Así por ejemplo el efecto antimicrobiano del eugenol y cinamaldehído se potencia en las mezclas porque el eugenol actúa principalmente a nivel de membrana y el cinamaldehído inhibe los enzimas relacionados con la obtención de energía. Por este mismo motivo las mezclas de AEs de clavo y hojas de canela con el AE de corteza de canela resultan más efectivas que las mezclas de AE de clavo y AE de hojas de canela. Se ha señalado también como una causa de este efecto sinérgico que los dos antimicrobianos interaccionan con distintas enzimas o proteínas (Pei y col., 2009). El mayor efecto antimicrobiano de las mezclas en relación a los compuestos individuales se explica también por la presencia de compuestos antimicrobianos minoritarios, que juntos pueden potenciar o complementar su efecto. En general, cuando las plantas poseen una composición similar, su combinación presenta efecto aditivo, más que sinérgico, porque

presentan sitios similares de acción (Gill y col., 2002; Mourey y Canillac, 2002). De igual forma la combinación de compuestos aromáticos que contienen diferentes estructuras químicas puede mejorar su efecto antimicrobiano, al atacar al mismo tiempo diferentes sitios diana en la célula bacteriana.

La combinación exitosa entre la vainillina y los AEs de clavo y canela también representa un ejemplo de que las combinaciones de diferentes especies de plantas potencian su actividad. Desde la antigüedad se han utilizado combinaciones de plantas para tratar las enfermedades. En el mercado existen actualmente disponibles fitomedicinas que se venden como combinaciones, por ejemplo *Gingko biloba* con Equinacea. Se cree que las interacciones sinérgicas son responsables de su eficacia terapéutica. Un estudio hecho en Cuba sobre 170 combinaciones de plantas que se usan para uso medicinal encontró que 60 presentaron efecto sinérgico (Cano y col., 2004). En la bibliografía se describen combinaciones aditivas de *Thymus vulgaris* con *Pimpinella anisum*, plantas típicas en la medicina iraquí, combinaciones sinérgicas del árbol del te, (*Melaleuca alternifolia*) y Lavanda (*Lavandula angustifolia*) (Casella y col., 2002). Al-Bayati (2008) encontró que la combinación de tomillo (*Thymus vulgaris*) y anís (*Pimpinella anisum*) mostraron una actividad inhibitoria frente a bacterias patogénicas y que esta asociación potenciaba el efecto individual de cada planta. Este sinergismo se puso especialmente de manifiesto frente a *Pseudomonas aureginosa*, un patógeno especialmente resistente a muchos AEs, extractos metabólicos y a ciertas drogas antimicrobianas

Varios estudios han demostrado también que las mismas combinaciones pueden producir resultados diferentes para diferentes microorganismos, así por ejemplo Schektz y col. (2006) demostraron que β -pineno con 1,8-cineol presentaban una reacción sinérgica (Σ CFI=0,4) frente a *Candida Albicans* pero antagónica (CFI=9,8) frente a *Staphylococcus aureus*. Lopez y col. (2005) demostraron que las combinaciones de canela y clavo en fase de vapor resultaban tener un efecto sinérgico para *L. monocytogenes* y aditivo para *E. coli*. Estudios realizados por Yen y Chang. (2008) sobre combinaciones entre cinamaldehído con catequinas o con eugenol ensayados frente a diferentes hongos destructivos de la madera presentaron efecto, sinérgico o antagónico dependiendo de la especie de hongo. Probst. y col. (2011) encontraron que combinaciones de canela y clavo presentaron efecto antagónico frente a *S. aureus*, pero sinérgico frente a *E. coli* O157:H7. Delakis y col. (2001), también encontraron efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos al combinar fracciones individuales

de eucalipto, cilantro y coriandro frente a distintos microorganismos. Mezclas de aceites esenciales de artemisa y salvia se han evaluado *in vitro* y se les ha encontrado un efecto sinérgico para las bacterias Gram + y aditivo o antagónico para algunas bacterias Gram – Vuuren (2007).

Los artículos científicos que documentan como ocurre la interacción de los compuestos a nivel molecular, enfocan predominantemente los resultados sobre los constituyentes de los AEs y muy pocos se enfocan sobre la estructura de las combinaciones que contribuyen al efecto antimicrobiano de los AEs. En general para cualquier tipo de extracto vegetal o AE de una determinada especie el número de componentes puede variar entre 25 y 173 compuestos, por lo que no es sorprendente que estos compuestos puedan interactuar para favorecer o reducir los efectos farmacológicos. Inclusive hay estudios que cuestionan que la actividad antimicrobiana se debe principalmente a uno o varios compuestos mayoritarios y que en realidad pueda deberse a la acción sinérgica entre las moléculas de una misma planta (Bakkali y col., 2008). Al examinar la composición de un AE es muy difícil por su complejidad predecir cual será su efectividad, no sólo porque se deben considerar los componentes mayoritarios y minoritarios, sino porque se necesita también conocer la estereoquímica de los compuestos. Mientras que se sabe que la actividad biológica está influenciada por la configuración enantiométrica, la actividad total de diferentes enantiómeros puede ser afectada adicionalmente por la interacción con otros compuestos. La importancia de la estereoquímica de los compuestos ha sido demostrada en varios estudios (Viljoen y col., 2006; Hemaiswarya y col., 2009).

Las interacciones aditivas que se encontraron en este trabajo entre el AE de hojas de canela y el AE de corteza de canela representan un ejemplo de que las interacciones pueden también ocurrir entre grupos de moléculas de distintas fracciones de la planta. Para muchas especies hay una fuerte distinción en la composición química entre los órganos superiores e inferiores de una planta. Si por ejemplo las raíces y las hojas se combinan, entonces el número de compuestos activos puede incrementarse y posiblemente haya mayor oportunidad para las interacciones sinérgicas. Otros estudios han demostrado que los distintos compuestos fenólicos encontrados en una misma planta cuando se combinan presentan actividades antimicrobianas mucho más altas. Hay numerosos informes de combinaciones de diferentes partes de las plantas tales como hojas y raíces que se usan en terapias medicinales. Van Vuuren y Viljoen. (2011) encontraron que la combinación de raíces y

hojas de *Croton gratissimus* presentaba un efecto sinérgico con un $CFI_i = 0,4$, lo cual valida el uso tradicional de estas combinaciones de diferentes partes de la planta como medicina alternativa. Chung y col. (2007) encontraron que el AE de ajo y el alcohol allílico, ambos derivados de *Allium sativum*, cuando se combinaban y se ensayaron versus *Candida utilis* obtenían CFI_i entre 0,40-0,42.

Por último es necesario apuntar que las plantas aromáticas poseen componentes químicos volátiles, los cuales tienen mayor actividad que los componentes no volátiles cuando se estudian por separado. Sin embargo la interacción de ambos componentes favorece la actividad antimicrobiana. Es decir, la coexistencia de constituyentes volátiles y no volátiles favorece la eficacia antimicrobiana y posiblemente las interacciones sinérgicas pueden ser un resultado de la mejorada solubilidad y bioactividad de los principios activos menos volátiles favorecidos por la presencia de los volátiles.

3.2 Actividad de los antimicrobianos en leche pasteurizada.

3.2.1 Efecto de la temperatura de almacenamiento

3.2.1.1 Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Parcialmente Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida y Concentración Parcialmente Bactericida en leche almacenada a 35 °C

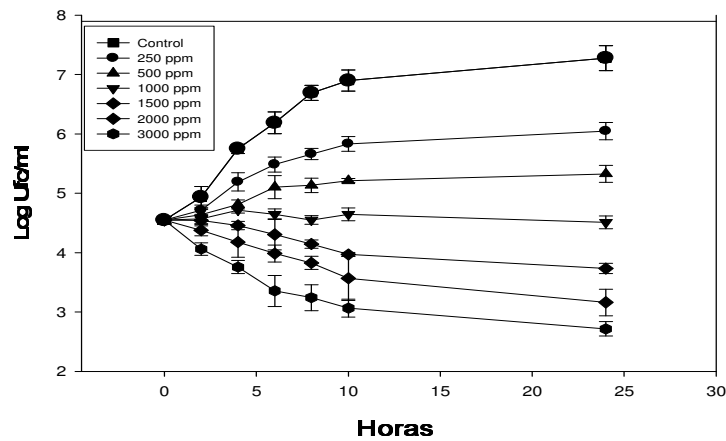
3.2.1.1.1 *Listeria monocytogenes*

Las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A después de 24 h de incubación a 35 °C en leche semidescremada suplementada con diferentes concentraciones de AEs se muestran en la Figura 47. Las CPIs, CMI y CPBs obtenidas se muestran en la Tabla 20. El aceite de corteza de canela exhibió la actividad antimicrobiana más alta, así 1.000 ppm (CMI) fueron suficientes para inhibir el crecimiento microbiano. Concentraciones de 250 y 500 ppm de AE de corteza se consideraron CPBs, permitiendo sólo un incremento de la población final de *L.monocytogenes* de aproximadamente sólo 1 y 2 ciclos logarítmicos ($p < 0,05$). Concentraciones de 2.000 ppm fueron Parcialmente bactericidas (CPB) reduciendo la población microbiana inicial en dos ciclos logarítmicos y 3.000 ppm tuvieron un efecto bactericida (CMB) (Figura 47a).

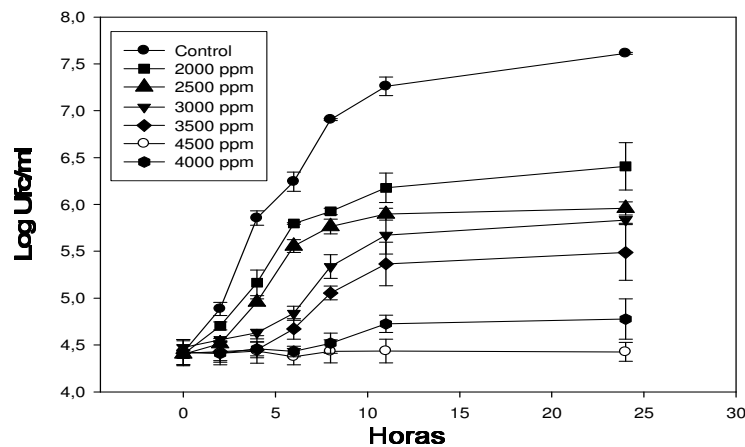
Los AEs de hojas de canela y clavo presentaron una CMI de 4.500 ppm y 4.000 ppm respectivamente. Concentraciones de 2.000, 2.500, 3.000 y 4.000 ppm fueron CPIs para el AE de hojas de canela (Figura 47 b) y concentraciones de 1.500, 2.000, 2.500, 3.000 y 3.500 ppm fueron CPIs para AE de clavo (Figura 47c).

Concentraciones de 4000 ppm de vainillina fueron inhibitorias (CMI) y concentraciones de 1.500, 2.500, 3.000, 3.500 y 4.000 ppm fueron CPIs (Figura 47 d). Todas las concentraciones ensayadas presentaron una población final significativamente diferente de la población final del control positivo sin antimicrobiano ($p < 0,05$).

a)



b)



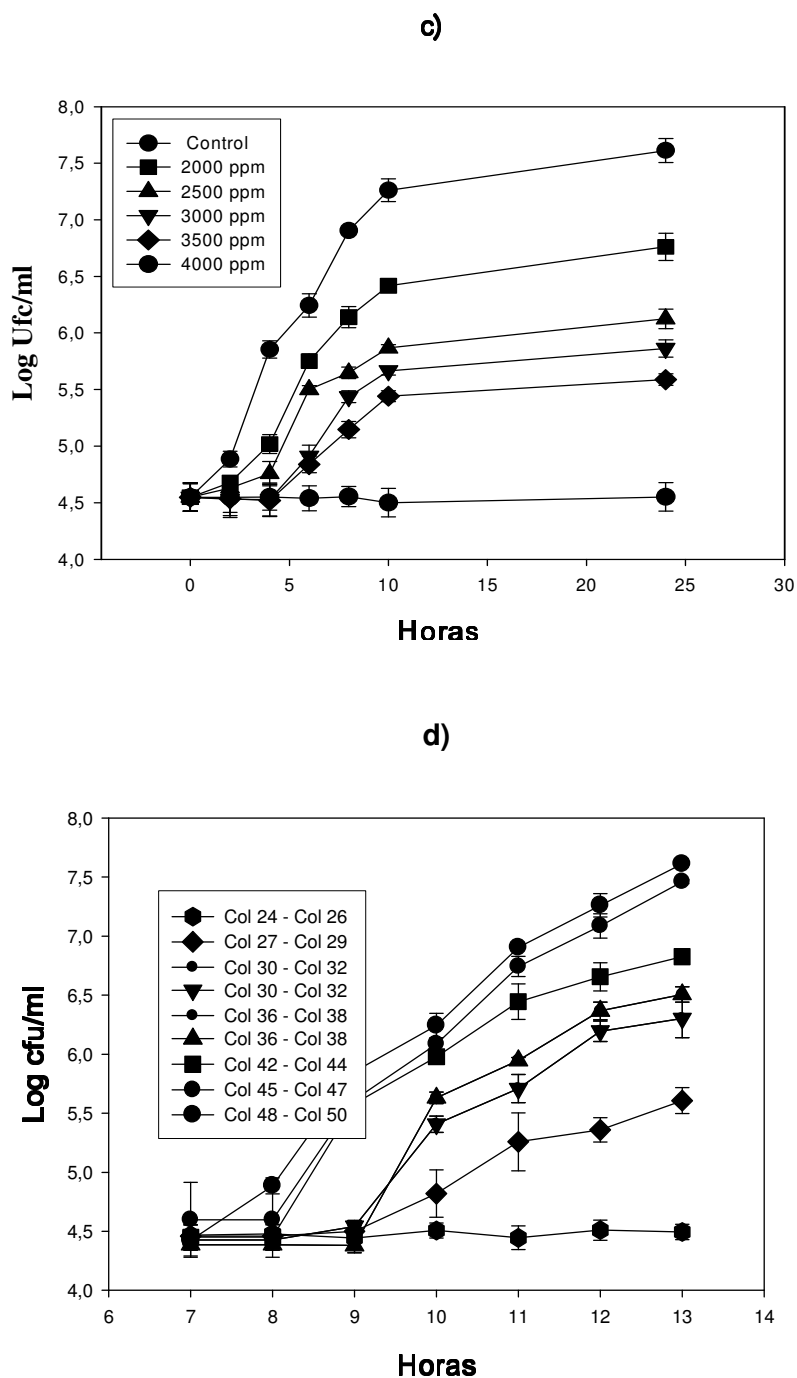
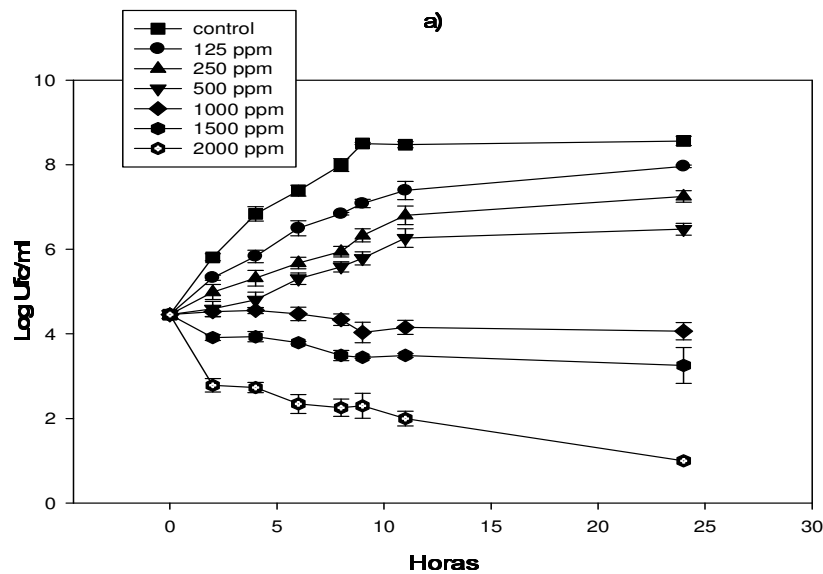


Figura 47. Comportamiento de *L. monocytogenes* en leche semidescremada almacenada a 35 °C suplementada con los antimicrobianos: a) AE de corteza de canela, b) AE de hojas de canela, c) AE de clavo y d) vainillina

3.2.1.1.2 *Echerichia coli* O167:H7

Las curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 después de 24 h de incubación a 35 °C en leche semidescremada suplementada con diferentes concentraciones de AE de corteza de

canela y vainillina se muestran en la Figura 48. Las CPIs, CMI y CPBs obtenidas se muestran en la Tabla 21. Concentraciones de 1.000 ppm de AE de corteza de canela (CMI) inhibieron el crecimiento microbiano, 500 ppm fueron Parcialmente inhibitorias (CPI) y 1.500 y 2.000 ppm fueron Parcialmente bactericidas (CPB) reduciendo la población bacteriana inicial en dos y tres ciclos logarítmicos respectivamente ($p < 0,05$). Concentraciones de 125, 250 ppm y 500 ppm de AE de corteza de canela se consideraron CPIs, comparados con el control positivo sin antimicrobiano ($p > 0,05$) (Figura 48a). Cuando la leche se incubó a 35 °C durante 24 horas con vainilla, 3.000 ppm de vainillina fueron inhibitorias para *E. coli* O157:H7 y 2.500 ppm, 2.000 ppm y 1.500 ppm fueron CPIs, permitiendo un incremento de la población microbiana inicial solamente 1/2, 1 y 2 ciclos logarítmicos (Figura 48b).



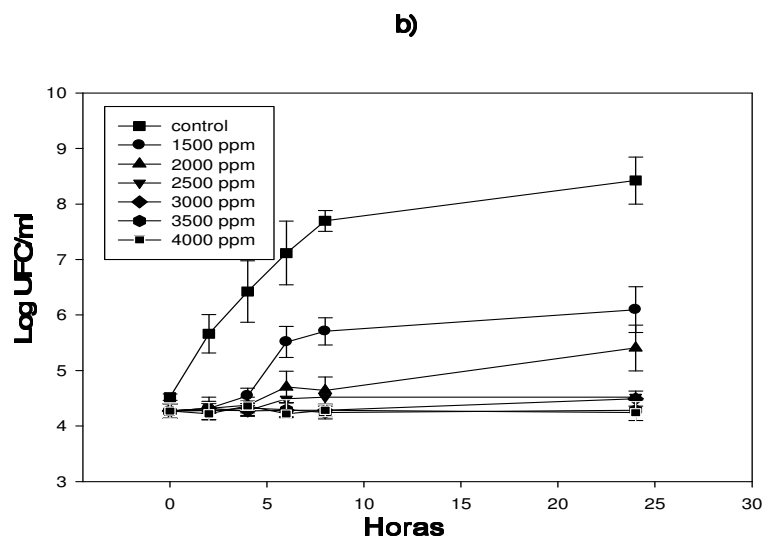


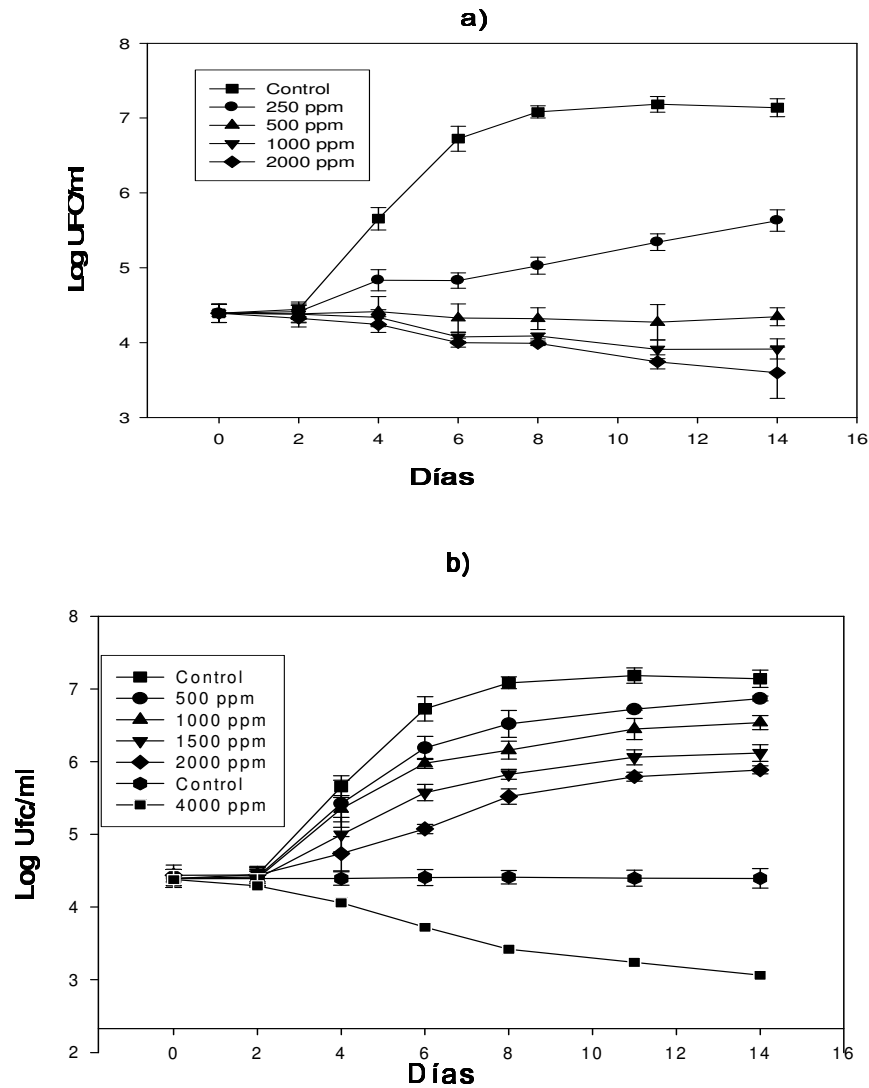
Figura 48. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 en leche semidescremada almacenada a 35 °C suplementada con los antimicrobianos: a) AE corteza de canela, b) vainillina

3.2.1.2 Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Parcialmente Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida y Concentración Parcialmente Bactericida en leche almacenada a 7 °C

3.2.1.2.1 *Listeria monocytogenes*

Las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* obtenidas en leche semidescremada con los AEs de corteza de canela, hojas de canela, clavo y vainillina después de 14 días de incubación a 7 °C se observan en la Figura 49. Los CPIs, CMIs, CPBs y CMB obtenidas para los mismos antimicrobianos se muestran en la Tabla 20. La actividad antilisterial más alta fue exhibida por el AE de corteza de canela y así 500 ppm fueron suficientes para inhibir el crecimiento microbiano comparados con los 3.000 ppm necesarios de hojas de canela o de clavo para conseguir el mismo efecto. Concentraciones de 1.000 y 2.000 ppm de AE de corteza de canela tuvieron un efecto Parcialmente bactericida (CPB), reduciendo la población bacteriana inicial a los 14 días de 0,5 a 1 ciclo logaritmo respectivamente (Figura 50 a). Una concentración de 250 ppm de AE de corteza de canela se consideró un CPI, reduciendo la población final de *L. monocytogenes* 1 ciclo logarítmico comparado con el control positivo sin AE ($p < 0,05$) (Figura 49a). Los AEs de hojas de canela y clavo a 4.000 ppm exhibieron un efecto Parcialmente bactericida (CPB), disminuyendo la población inoculada 1 ciclo logarítmico después de 14 días de incubación ($p < 0,05$). Concentraciones de 500, 1.000, 1.500 y 2.000 ppm para ambos aceites tuvieron un efecto Parcialmente

inhibitorio sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* comparados con el control positivo ($p < 0,05$) y estas concentraciones se consideraron CPIs (Figuras 49b y 49c). Concentraciones de 2.500 ppm de vainillina fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* mientras que concentraciones de 2.000 ppm y 1.500 ppm serían consideradas CPIs. Concentraciones de 3.000, 3.500 y 4.000 ppm fueron consideradas inhibitorias pero no mostraron ningún efecto bacteriostático (Figura 49 d).



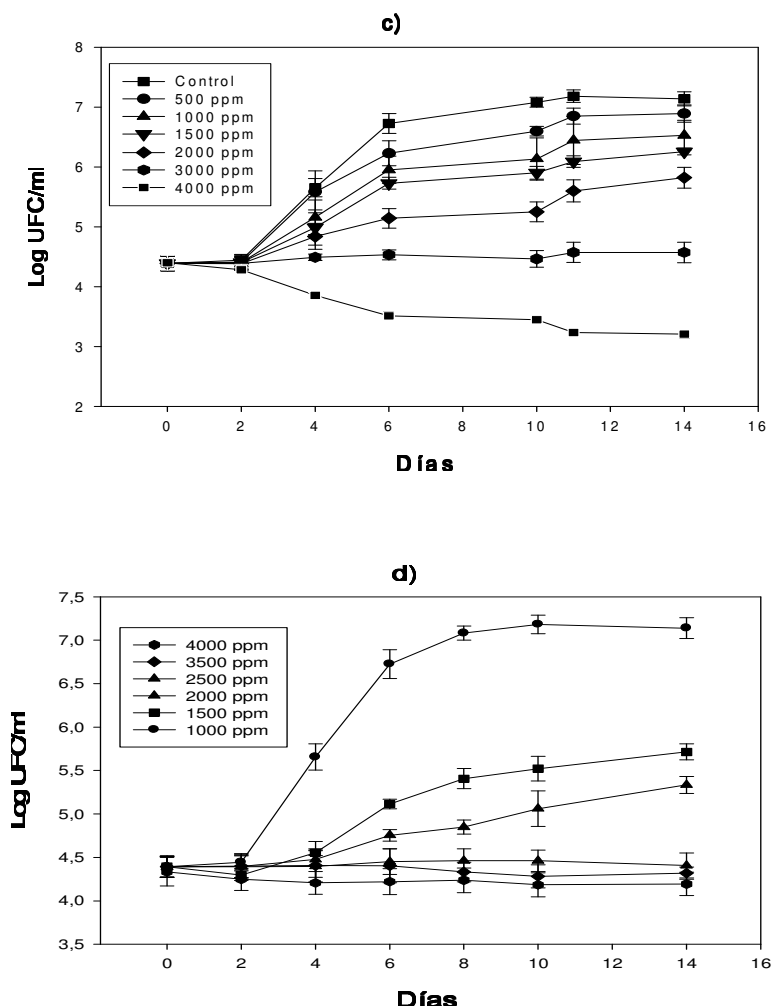
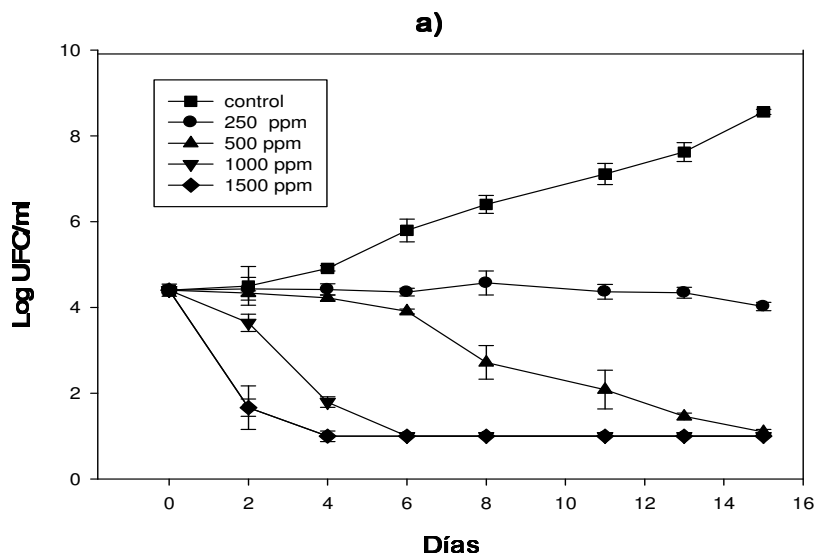


Figura 49. Comportamiento de *L. monocytogenes* en leche semidescremada almacenada a 7 °C suplementada con los antimicrobianos: a) AE de corteza de canela, b) AE de hojas de canela, c) AE de clavo y d) AE de vainillina

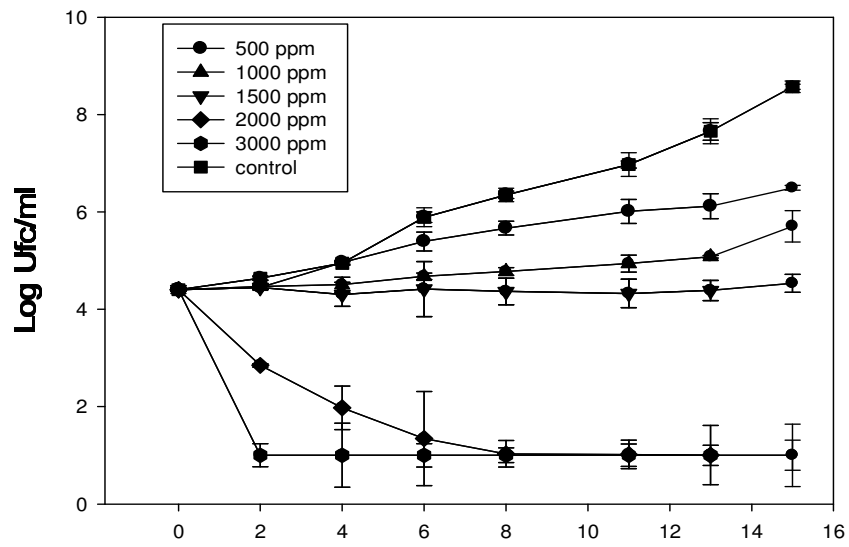
3.2.1.2.2 *Echerichia coli* O157:H7

Las curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 obtenidas en leche semidescremada adicionada con los AEs de corteza de canela, hojas de canela, clavo y vainillina después de 14 días de incubación a 7 °C se observan en la Figura 50. Los CPIs, CMIs, CPBs y CMBs obtenidas para los mismos antimicrobianos se muestran en la tablas 20. La actividad antimicrobiana más alta fue exhibida por el AE de corteza de canela y así 250 ppm fueron suficientes para inhibir el crecimiento microbiano comparados con los 1500 ppm necesarios de hojas de canela o de clavo para conseguir el mismo efecto. Concentraciones de 500, 1000 y 1500 ppm de aceite de corteza de canela tuvieron un efecto Parcialmente bactericida (CPB), reduciendo la población bacteriana inicial 3 ciclos logarítmicos a los 4, 6 y 14 días

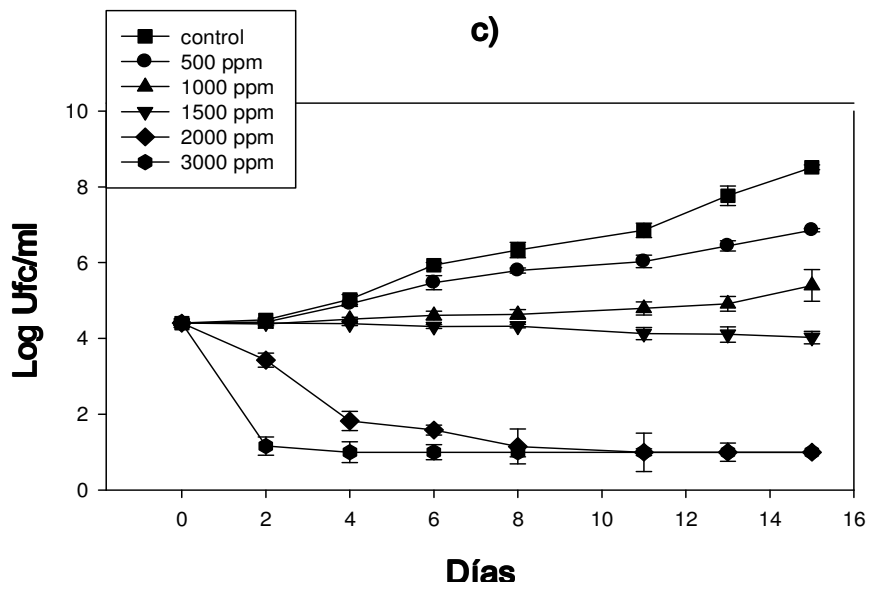
respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 50a). Concentraciones de 1500 ppm de aceites de clavo y de hojas de canela fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Concentraciones de 3000 y 2000 ppm de aceites esenciales de hojas de canela y clavo exhibieron un efecto Parcialmente bactericida (CPB), disminuyendo la población inoculada 3 ciclos logarítmicos después de 2 y 8 días de incubación (Figura 50 b y c). Concentraciones de 500 y 1.000 ppm para ambos aceites tuvieron un efecto Parcialmente inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 comparados con el control positivo ($p < 0,05$), y estas concentraciones se consideraron CPIs.. Para la vainillina concentraciones de 1.000 ppm fueron inhibitorias, 500 ppm fueron Parcialmente inhibitorias (CPI), mientras que 1.500 ppm, 2.000 ppm y 3.000 ppm sería considerada CPBs, logrando disminuciones en la población inoculada inicialmente en 1, 1 ½ y 2 ciclos respectivamente.



b)



c)



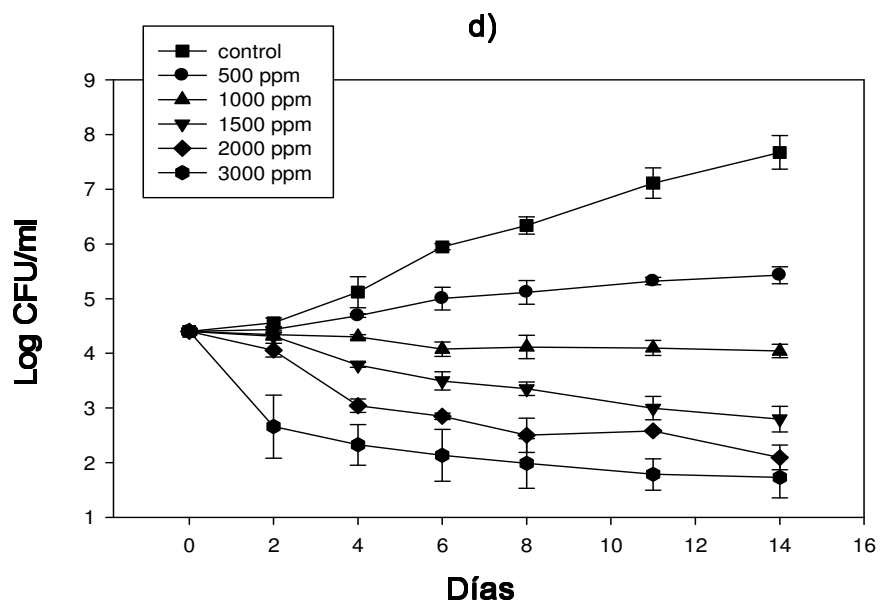


Figura 50. Comportamiento de *E. coli* O157:H7 en leche semidescremada almacenada a 7 °C suplementada con los antimicrobianos: a) AE de corteza de canela, b) AE de hojas de canela, c) AE de clavo y d) vainillina.

Tabla 20. Concentraciones Parcialmentees Inhibitorias (CPIs), Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Concentraciones Parcialmentees Bactericidas (CPBs) y Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMB) de vainillina y de los AEs de corteza de canela, hojas de canela y clavo frente a *L. monocytogenes* en leche semidescremada incubada a 7 °C y 35 °C

Antimicrobiano	7 °C/14 days				35 °C/24 h			
	CPI (ppm)	CMI (ppm)	CPB (ppm)	CMB (ppm)	CPI (ppm)	CI (ppm)	CB (ppm)	CMB (ppm)
AE de hojas de canela	2000	3000	4000	10500	3500	4000	ND -	10.500
	1500				3000			
	1000				2500			
	500				2000			
AE de clavo	2000	3000	4000	11000	4000	4500	ND-	10.000
	1500				3500			
	1000				3000			
	500				2500			
AE de corteza de canela	250	500	1000	3000	500	100	10	300
			2000		250		200	
vainillina	1500	2500	-	20000	150	400	ND-	200
	2000				200			
	3000				250			
					300			
				350				

ND: no detectado

Tabla 21. Concentraciones Parcialmentees inhibitorias (CPIs), Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Concentraciones Parcialmentees Bactericidas (CPBs) y Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMB) de hojas de canela, corteza de canela, clavo y vainillina frente a *E. coli* O157:H7 en leche semidescremada incubada a 7 °C y 35 °C.

Antimicrobiano	7 °C/ 14 días				35 °C/ 24 h			
	CPI (ppm)	CMI (ppm)	CPB (ppm)	CMB (ppm)	CPI (ppm)	CMI (ppm)	CPB (ppm)	CMB (ppm)
AE de clavo	500 1.000	1.500	2.000 3.000	6.000	NR	NR	NR	6.000
AE de hojas de canela	500 1.000	1.500	2.000 3.000	6.000	NR	NR	NR	6.000
AE de corteza de canela	ND	250	500 1.000 1500	3.000	1.500 2.000	1.000	2.000	3.000
vainillina	500 1.000 1.500	1.000	1.500 2.000 3.000	11.000	3.500 2.500 2.000 1.500	4.000	ND	11.000

NR.No realizado

ND.No detectado

Las CMB de la vainillin y de los AES corteza de canela, hojas de canela, clavo y vainillina frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O 157:H7 en leche almacenada a 7 y 35 °C se muestran en las tablas 19 y 20 respectivamente.

Concentraciones de 3.000 ppm de corteza de canela, 10.500 ppm de hojas de canela y 11.000 ppm de aceite de clavo fueron suficientes para matar el 99,9 % de la población inoculada de *L. monocytogenes* a 35 °C después de 24 horas y a 7 °C después de 14 días. Los mismos resultados se consiguieron para *E. coli* O157:H7 con concentraciones de 6000 ppm de AE de hojas de canela, 6000 ppm de AEde clavo y con 3000 ppm de AE de corteza de canela. La. La CMB de la vainilla fue de 11.000 ppm para *E. coli* O157:H7 y de 20.000 ppm para *L. monocytogenes* Scott A.

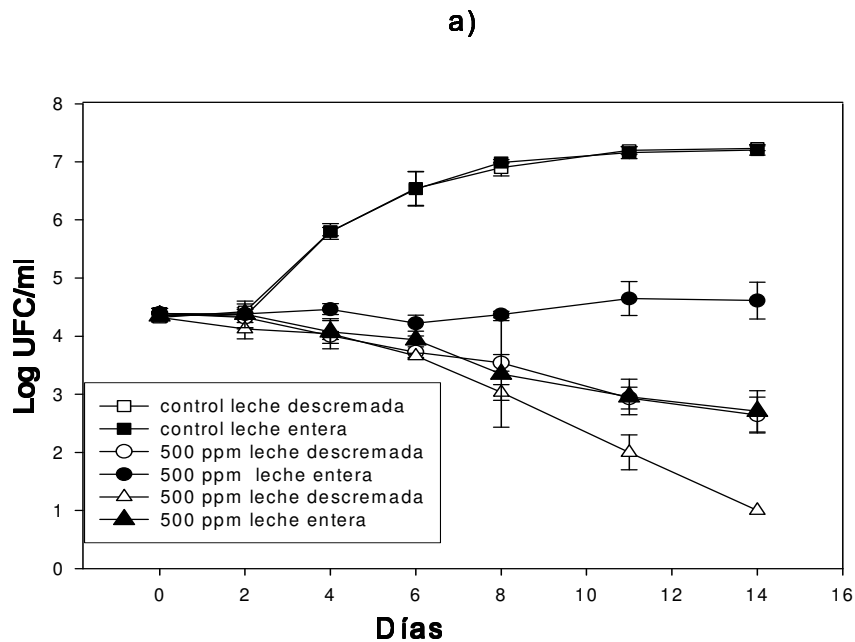
3.2.2 Efecto de la concentración de grasa de la leche.

El efecto de la grasa de la leche sobre la actividad de los antimicrobianos se evaluó graficando las curvas de crecimiento obtenidas en leche descremada y leche entera versus las concentraciones inhibitorias de los AEs ensayadas para *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 (Figuras 51-54). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la leche entera y la leche descremada para todos los antimicrobianos evaluados y para ambos microorganismos. En la Figura 51a se observa que en leche entera concentraciones de 500 ppm de aceite de corteza de canela inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 14 días comparada con la población inicial y sin embargo tuvo un leve efecto bactericida en leche semidescremada, produciendo una disminución de aproximadamente un ciclo logarítmico ($p < 0,05$). Concentraciones de 1.000 ppm fueron Parcialmente bactericidas (CPB) en ambos tipos de leche y produjeron una reducción de la población de 1 ciclo logarítmico en leche entera y tres ciclos logarítmicos en leche descremada. Para *E. coli* O157:H7 (Figura 51b) 500 ppm redujeron la población inicial en tres ciclos logarítmicos a los 7 días de almacenamiento en leche descremada y el mismo efecto se produjo en leche entera a los 2 días. Sin embargo, 250 ppm fueron inhibitorios en leche entera y Parcialmente bactericidas en leche semidescremada, con una reducción de aproximadamente 1 ciclo logarítmico a los 14 días de almacenamiento.

En la Figura 52a se puede observar que concentraciones de 2000 ppm de AE de hojas de canela disminuyeron la población bacteriana de *L. monocytogenes* en un ciclo logarítmico con respecto al control positivo en la leche entera (CPI) y sin embargo tuvieron un efecto Parcialmente bactericida en la leche semidescremada, reduciendo la población inicial en dos ciclos logarítmicos ($p < 0,05$). Concentraciones de 3000 ppm del mismo AE disminuyeron el crecimiento bacteriano en 1,5 ciclos logarítmicos con respecto al control positivo en leche entera (CPI) pero tuvieron un efecto Parcialmente bactericida en leche descremada (CPB), reduciendo la población inicial en 3 ciclos logarítmicos ($p < 0,05$). Para *E. coli* O 157:H7 (Figura 52b) concentraciones de 2.000, 1.500 y 1.000 ppm fueron CPB y redujeron la población bacteriana en 3 y 2 ciclos logarítmicos respectivamente. Sin embargo en leche entera concentraciones de 2000 ppm fueron inhibitorias (CMI) y 1500 y 1000 ppm fueron Parcialmente inhibitorias (CPI).

Resultados similares se obtuvieron para el AE de clavo frente a ambos microorganismos (Figura 53 a y b).

La Figura 54 muestra las curvas de crecimiento para *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 obtenidas en la leche descremada y leche entera con diferentes concentraciones de vainillina. Para *L. monocytogenes* (Figura 54a), una concentración de 2.000 ppm fue inhibitoria en leche descremada (CMI) y Parcialmente Inhibitoria (CPI) en leche entera. Concentraciones de 1.250 ppm fueron Parcialmente inhibitorias para ambos tipos de leche, aunque la inhibición fue significativamente mayor en leche semidescremada que en leche entera ($p < 0,05$). Para *E. coli* O157:H7 (Figura 55b), una concentración de 500 ppm fue inhibitoria en leche descremada y Parcialmente Inhibitoria (CPI) en leche entera ($p < 0,05$). La concentración de 1.000 ppm fue inhibitoria en leche descremada y entera. Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre leche entera y descremada se encontraron también para ambas cepas microbianas usando las mismas concentraciones de vainillina. Para *E. coli* O157:H7, una concentración de 500 ppm fue inhibitoria en leche descremada (CMI) y Parcialmente inhibitoria en leche entera. La concentración de 1.000 ppm fue inhibitoria en leche entera y descremada ($p < 0,05$).



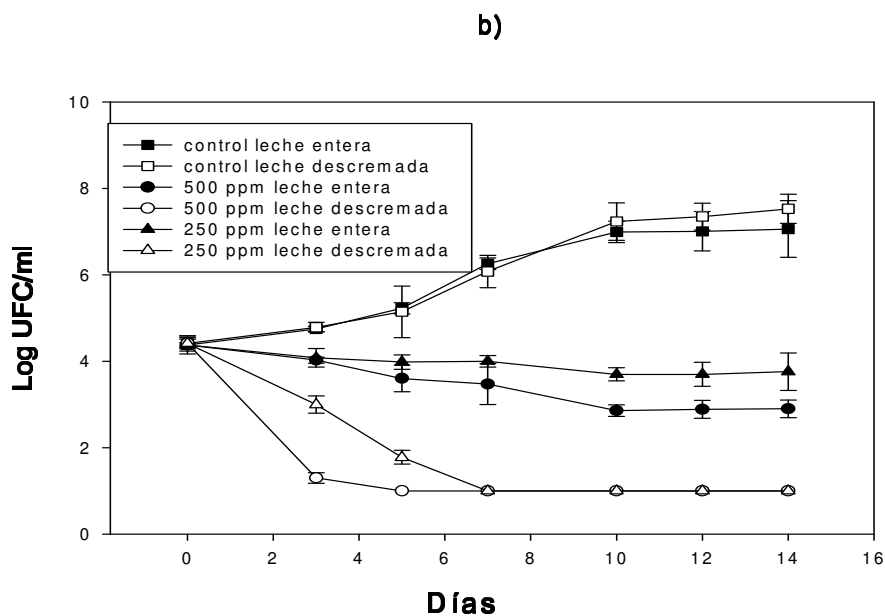
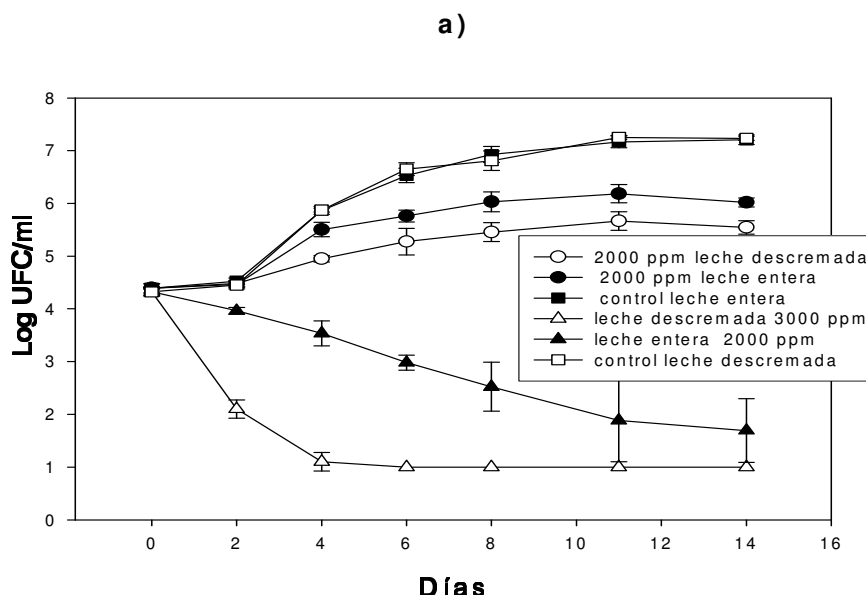


Figura. 51. Comportamiento en leche entera y descremada suplementada con AE de corteza de canela almacenada a 7 °C de a) *L. monocytogenes* Scott A y b) *E. coli* O157:H7



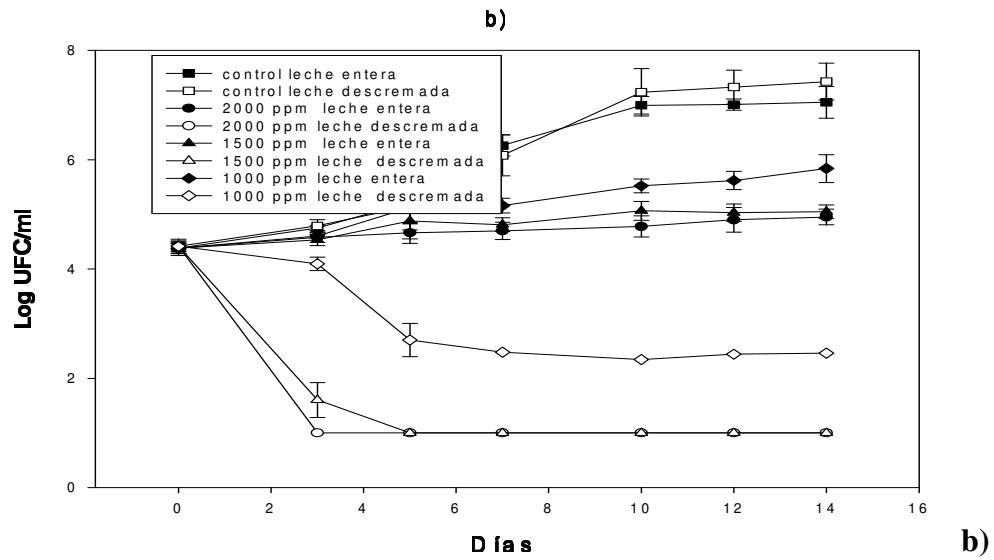


Figura 52. Comportamiento en leche entera y semidescremada suplementada con AE de hojas de canela almacenada a 7 °C a) *L. monocytogenes* Scott A y b) *E. coli* O157:H7

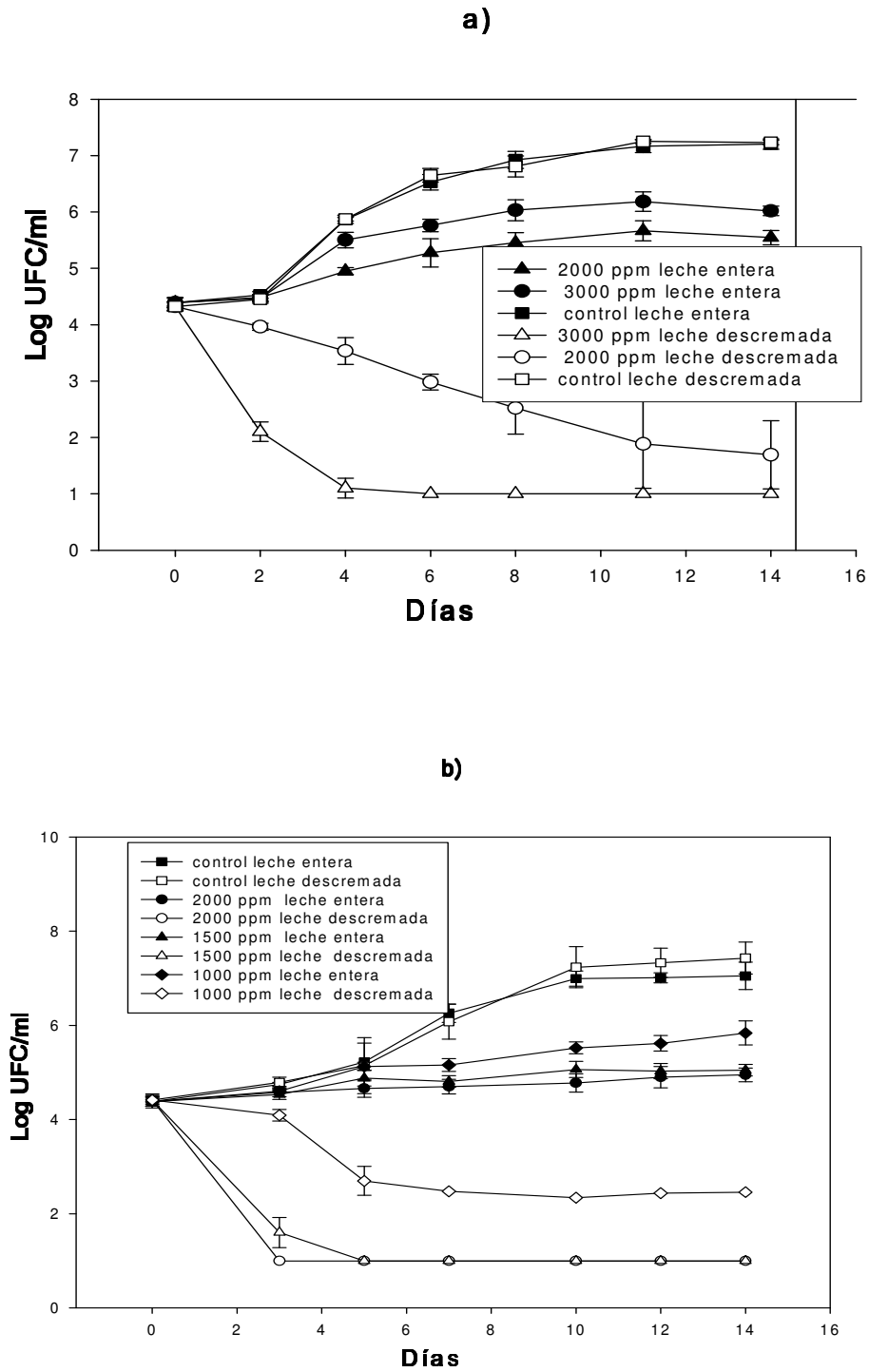


Figura. 53. Comportamiento en leche entera y semidescremada suplementada con AE de clavo almacenada a 7 °C a) *L. monocytogenes* Scott A y b) *E. coli* O157:H7

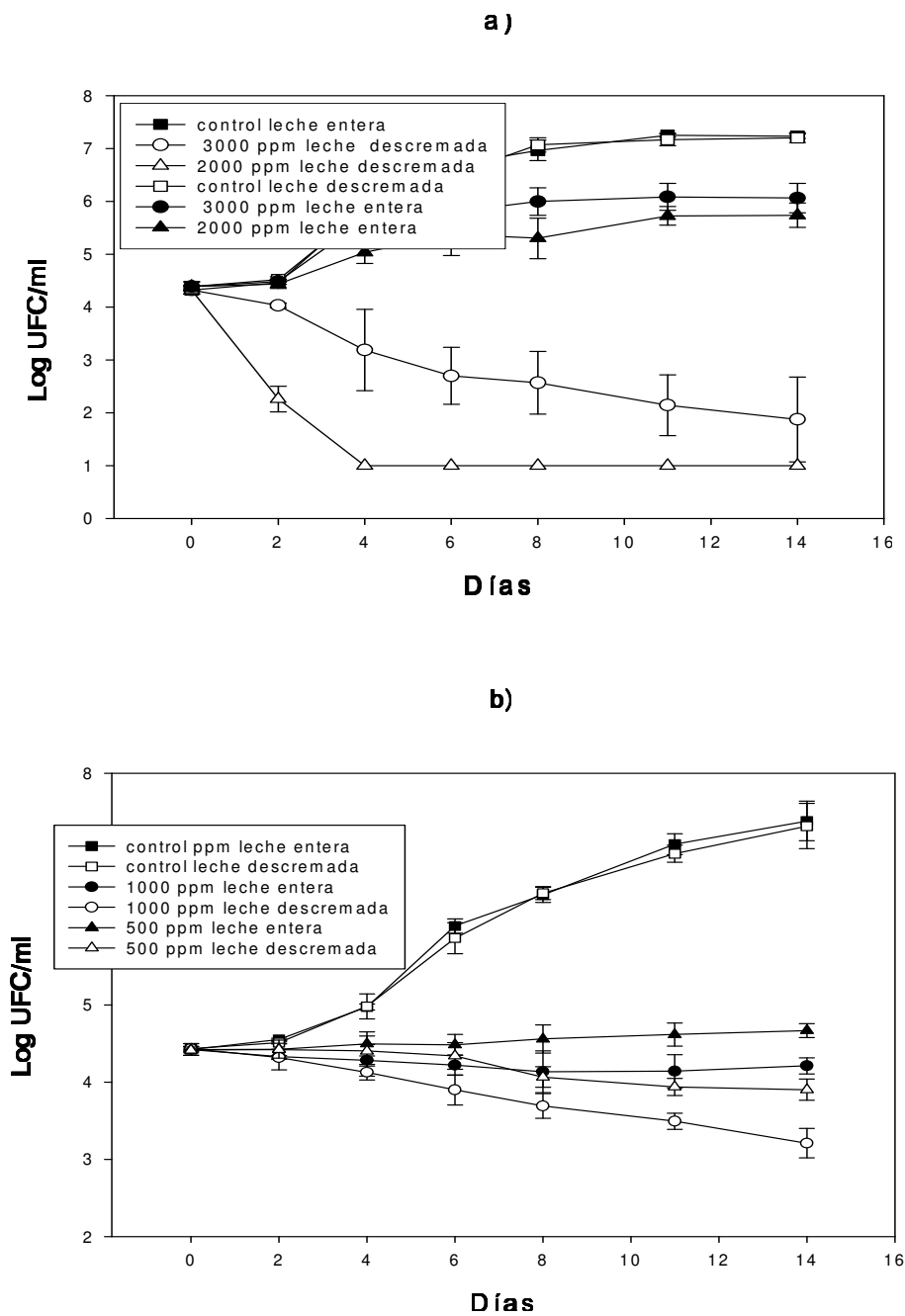
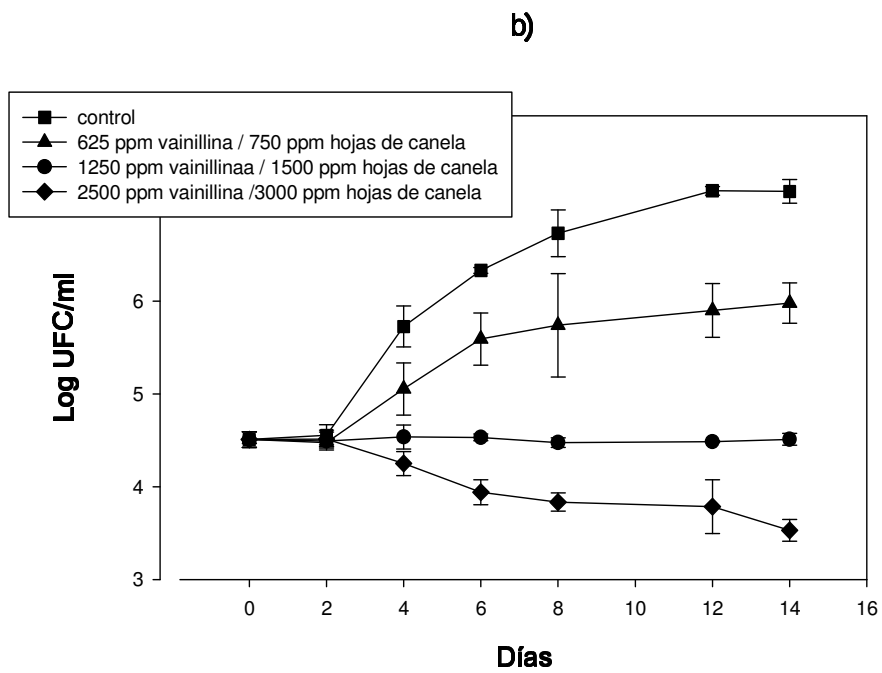
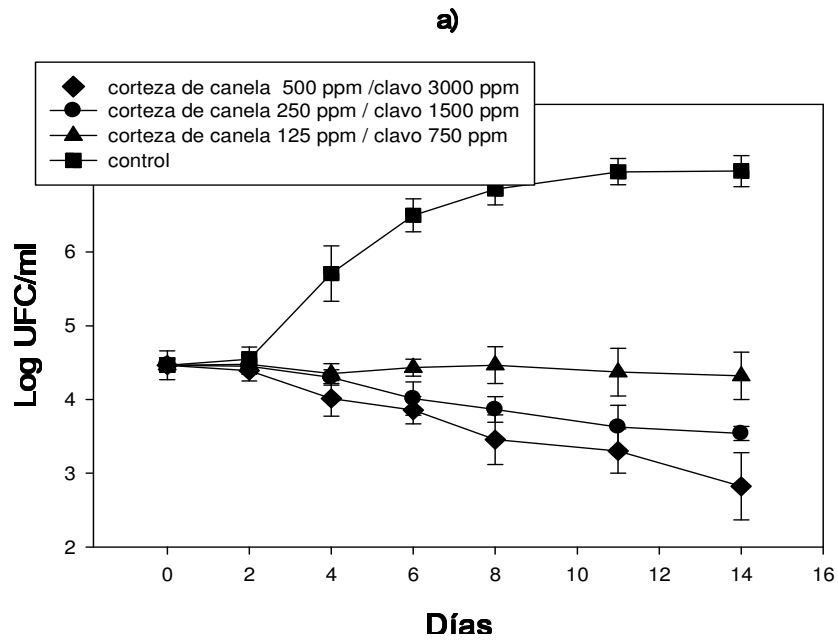


Figura 54. Comportamiento en leche entera y semidescremada suplementada con vainillina almacenada a 7 °C a) *L. monocytogenes* Scott A y b) *E. coli* O157:H7.

3.2.3 Efecto de las combinaciones de antimicrobianos en leche semidescremada a 7 °C.

La Figura 55 presenta las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* obtenidas en leche semidescremada suplementada con mezclas de AEs de corteza de canela, clavo y vainillina almacenada a 7 °C. Combinaciones de [1/4 CMI de corteza de canela con 1/4 de clavo] lograron inhibir el crecimiento microbiano y combinaciones de 1 y 1/2 CMI de AE corteza de canela con 1 y 1/2 CMI de AE de clavo] fueron CPB originando disminuciones en la población bacteriana de 1 y dos ciclos logarítmicos respectivamente (Figura 55a). Combinaciones de [1/2 CMI de AE clavo con 1/2 de vainillina] y [1/2 CMI de AE de hojas de canela con 1/2 de vainillina] inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 14 días de incubación, combinaciones de [1/4 CMI de AE clavo con 1/4 de vainillina] y [1/4 CMI de AE de hojas de canela con 1/4 de vainillina] fueron CPI con aumentos de la población bacteriana de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos con respecto a la población inicial y combinaciones de [1CMI de AE de clavo con 1CMI de vainillina] y [1 CMI de AE de hojas de canela con 1 CMI de vainillina] fueron CPB con disminuciones de la población de aproximadamente 1 ciclo logarítmico (Figura 55 b y c). Combinaciones de [1/4 de AE de hojas de canela con 1/4 de vainillina] inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 7 días de almacenamiento pero no durante 14 días. Combinaciones de [1/2 CMI de AE de hojas de canela y 1/2 de vainillina] y [1CMI de AE de hojas de canela y 1CMI de vainillina] consiguieron un efecto Parcialmente bactericida, reduciendo la población bacteriana 1 ciclo logarítmico y 2 ciclos logarítmicos (Figura 55 d).



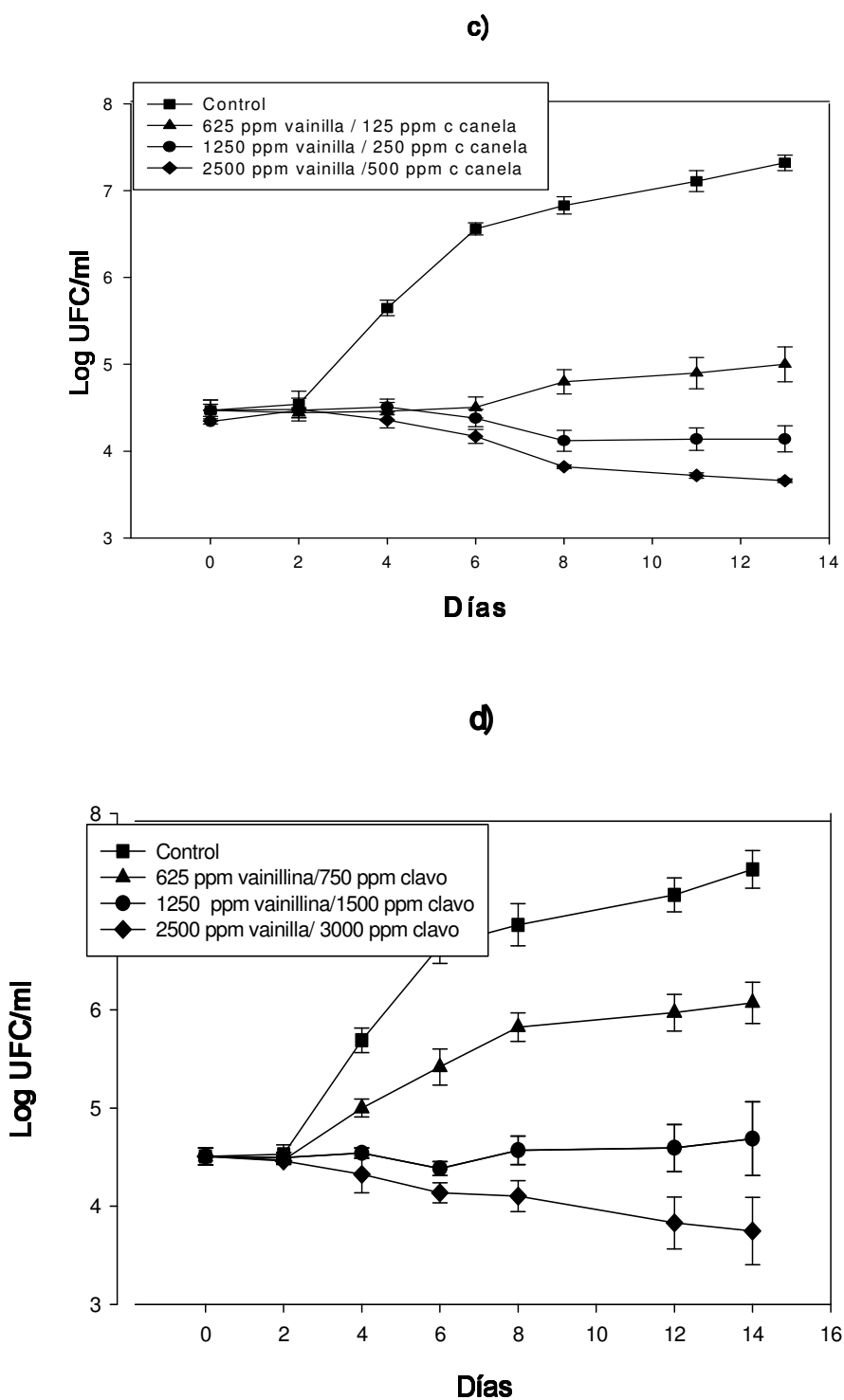
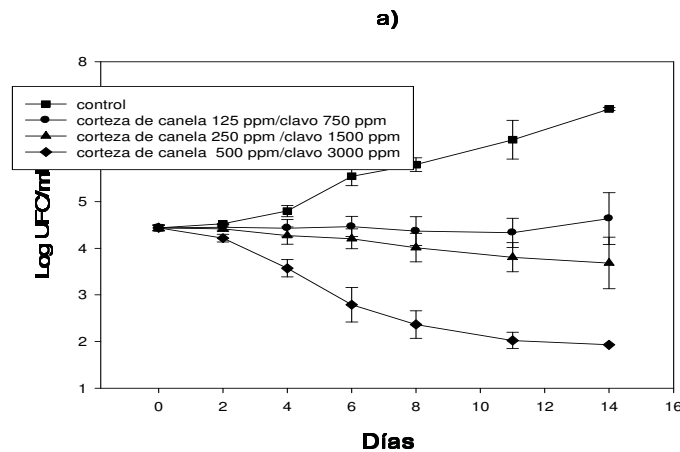


Figura 55. Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en leche semidescremada almacenada a 7 °C con las combinaciones de a)AE de corteza de canela y de clavo, b) AE de hojas de canela y vainillina, c) AE de corteza de canela y vainillina y d)AE de clavo y vainillina

La Figura 56 presenta las curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 obtenidas en leche semidescremada suplementada con mezclas de AEs de corteza de canela, hojas de canela, clavo y vainillina almacenada a 7 °C. El crecimiento de *E. coli* O157:H7 fue inhibido durante 14 días de almacenamiento con combinaciones de [1/2 CMI de AE de corteza de canela y 1/2CMI de AE de clavo] y mezclas de [1 CMI de AE de corteza de canela y 1 CMI de AE de clavo] resultaron Parcialmente bactericidas, disminuyendo la población inicial en 2 ciclos logarítmicos respectivamente (Figura 56 a).

Combinaciones de [1/4 CMI de AE de clavo y 1/4 de la CMI de vainillina] y combinaciones de [1/4 de AE de hojas de canela con 1/4 de vainillina] fueron CPI y disminuyeron la población final de *E. coli* O157:H7 un ciclo logarítmico en relación al control. Combinaciones de [1CMI de hojas de canela o 1CMI de clavo con 1CMI de vainillina] tuvieron un efecto bactericida sobre *E. coli* O157:H7, reduciendo la población aproximadamente 1 ciclo logarítmico (Figura 57 b y c). Todas las combinaciones ensayadas de AEs de corteza de canela con vainillina tuvieron efecto bactericida reduciendo la población de *E. coli* O157:H7 entre 0,5 y 1 ciclo logarítmico (Figura 57d).



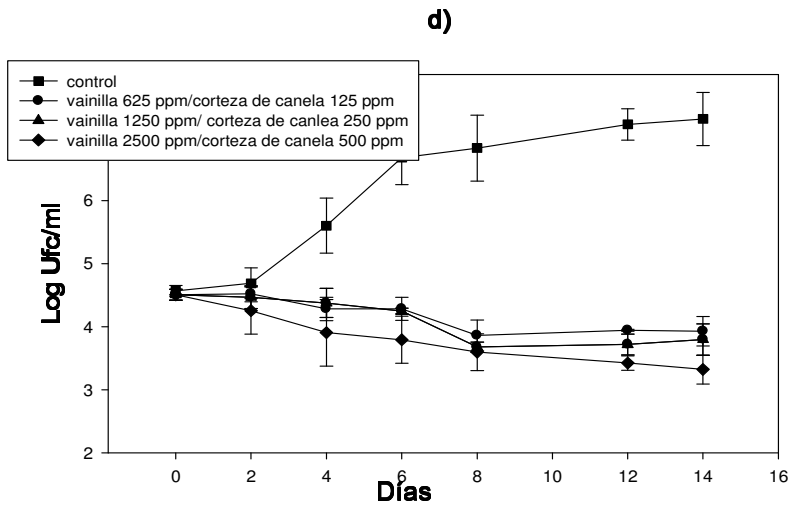
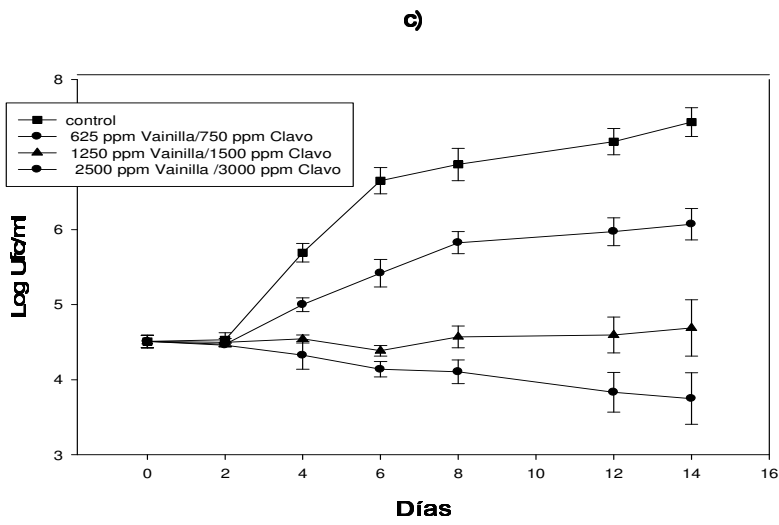
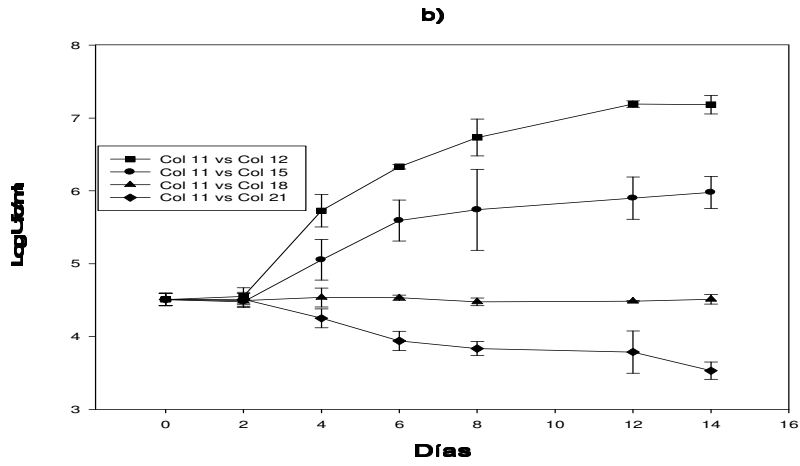


Figura. 56. Curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en leche semidescremada a 7 °C con las combinaciones de a) corteza de canela y de clavo, b) de canela y vainillina, c) clavo y vainillina hojas d) hojas de canela y vainillina.

3.2.4 Discusión

La vainillina y los aceites esenciales de corteza de canela, clavo y hojas de canela mostraron acción antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en leche pasteurizada almacenada a 7 y 35 °C. Esta acción antimicrobiana fue dependiente de la composición y concentración de los antimicrobianos, la cantidad de grasa de la leche, del tiempo y temperatura de exposición y del microorganismo diana.

Las CMI de los compuestos antimicrobianos ensayados fueron para *L. monocytogenes* y para *E. coli*, entre 2,5 y 4 veces mayores en leche que en CTS para el AE de corteza de canela, 1,4 y 1,3 mayores para la vainillina y 9 y 10 veces para los AEs de canela y clavo. Otros autores han encontrado resultados similares, así por ejemplo Karatzas y col., 2001 (citado por Burt 2004) encontraron que la proporción entre la actividad de los aceites *in vitro* y en leche descremada es aproximadamente el doble en leche que en CTS, Gutierrez y col., 2009, encontraron que la actividad del orégano y del tomillo era aproximadamente 5 y 15 veces mayor en leche que en caldos similares al TSB. Sin embargo la actividad antimicrobiana también se ha demostrado que puede disminuir en algunos alimentos, así Gutierrez y col., 2009 encontraron que la actividad antimicrobiana del orégano y el tomillo disminuía en sistemas modelo de hojas de lechuga y extracto de carne. Stecchini y col., 1993 y Van y col., 1998 (citados por Burt, 2004) también encontraron que *Aeromonas Hydrofila* presentaba una resistencia similar a los Eos *in vitro* que en carne de cerdo o lechuga.

En general se requiere una mayor concentración de aceite esencial en alimentos para conseguir el mismo efecto antimicrobiano que en caldo de cultivo. Son varios factores que determinan la proporción, entre ellos el contenido de nutrientes de los alimentos que permita a los microorganismos reparar el daño más rápidamente que en caldo (Gill y col., 2002). La matriz y los componentes de los alimentos constituyen otra de las causas a las que se le

atribuye la menor efectividad de los AEs en los alimentos, ya que estos pueden representar un obstáculo para que el microorganismo se ponga en contacto con el antimicrobiano.

El AE de corteza de canela mostró la mayor actividad antimicrobiana, mientras que concentraciones más altas de AE de clavo y hojas de canela fueron necesarias para inhibir completamente el crecimiento de ambos microorganismos en leche pasteurizada semidescremada. Esta elevada actividad antimicrobiana también ha sido corroborada por otros autores, que inclusive han demostrado su efectividad en películas comestibles de quitosa o en envases activos (Becerril y col., 2007; Raybaudi-Massilia y col., 2008; Ojagh y col., 2012). Resultados similares se encontraron cuando se ensayaron los compuestos antimicrobianos en caldo CTS.

Las CMIs encontradas en este estudio para todos los aceites de canela y clavo frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 fueron similares a las registradas por Shah y col., (2012) y Shah y col. (2013) al ensayar eugenol o timol (4.500 ppm) encapsulado en leche semidescremada con un 2% de grasa. Estos resultados son comprensibles debido a que el eugenol es el principal componente de los AEs de canela y clavo y el timol es un compuesto fenólico de estructura similar. Gutierrez y col., (2009) estudiaron el efecto antimicrobiano del orégano y el tomillo en un sistema alimentario simulando leche y encontraron que los CMIs de estos AEs fueron aproximadamente de 1.000 ppm y .000 ppm, resultados también muy similares a los encontrados en este trabajo. Según estos autores, la composición similar en compuestos fenólicos de estos aceites esenciales es responsable de la similar actividad.

Cuando se ensayaron temperaturas de almacenamiento de 7 °C, *E. coli* O157:H7 fue más sensible a todos los antimicrobianos que *L. monocytogenes*, lo cual se atribuye a que la temperatura de 7 °C se encuentra en el límite de crecimiento de este microorganismo. Cuando se ensayaron temperaturas de 35 °C, *E. coli* mostró menor resistencia que *L. monocytogenes* a la vainillina y una resistencia similar frente a la del AE corteza de canela. Moon y col. (2006), en estudios realizados con vainillina y zumo de manzana también encontraron una resistencia menor de *E. coli* O 157:H7 frente a *L. monocytogenes*.

Las propiedades intrínsecas del alimento (grasa /proteínas/a_w/antioxidante/ conservantes / pH / sal) afectan las propiedades antimicrobianas de los AEs, pero también las propiedades extrínsecas (temperatura, envasado al vacío/ gas/ composición de la

atmósfera/características del microorganismo) afectan la resistencia bacteriana. Los principales factores que afectan la actividad antimicrobiana de los AEs en la leche semidescremada son el pH, la aw (actividad de agua,) y el contenido de grasa y proteínas. Los carbohidratos en los alimentos no parecen tener ninguna influencia en proteger a las bacterias (Burt, 2004; Gutierrez y col., 2009).

La actividad antimicrobiana de los AEs es generalmente más baja en alimentos con un pH neutro, como la leche, que en alimentos ácidos. Las CMI's encontradas en este estudio para todos los AEs de canela y clavo frente a *L. monocytogenes* fueron más bajas (3000 ppm-500 ppm) que las CMI's encontradas por otros autores en quesos, salchichas o pollo, las cuales estuvieron en el rango de 5.000 a 2.0000 ppm (Holley y Patel, 2005; Menon y Garg, 2003; Mytle y col., 2001; Smith-Palmer y col., 2001; Singh y col., 2003). Asimismo las CMI y las CMB del AE de clavo para *L. monocytogenes* en leche semidescremada obtenidas en este estudio fueron más altas (10.500 a 11.000 ppm) que las encontradas para este mismo microorganismo en productos ácidos como purés y bebidas de frutas. Liang y col. (2003) encontraron que 2000 ppm de polvo de clavo redujeron una población inoculada de *L. monocytogenes* en 5,8 ciclos logarítmicos en sidra de manzana y Raybaudi-Massilia y col. (2008) encontraron que 2.000 y 8.000 ppm de AE de clavo eran bactericidas frente a *Listeria innocua* en zumo de pera y de melón, respectivamente. Yuste y Fung (2002) encontraron que 1000 ppm de AE de hojas de canela en zumo de manzana pasteurizado reducían una población de *L. monocytogenes* de 10^4 UFC/ml a niveles indetectables en una hora de almacenamiento a 5 ó 20°C. Ceylan y col. (2004) también encontraron que concentraciones de 1.000 ppm, aceite de hojas de canela eran bactericidas frente a *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana. Muthuswamy y col. (2008) encontraron que 2000 ppm de hojas de canela inhibían el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en rodajas de manzanas cortadas.

Moon y col. (2006) encontraron que concentraciones de 40 mmol de vainillina ejercieron un efecto letal sobre poblaciones de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 de 10^5 UFC/ml en zumo de manzana a temperaturas de 4°C y 15°C. Corte y col. (2004) y Char y col. (2010) encontraron que concentraciones de vainillina de 3.000 ppm disminuían los recuentos de *L. innocua* entre 4 y 5 ciclos logarítmicos después de 4-8 horas de incubación a 30°C en zumo de manzana. La vainillina ha sido usada como antimicrobiano en películas, con concentraciones inhibitorias de 2.500 ppm para *E. coli* (Rakchoy y col., 2009). Tipparaju y col. (2004) encontraron que la presencia de vainillina en yogurt redujo una

población de 10^7 UFC/ml de *L. monocytogenes* en 5 ciclos logarítmicos durante 31 días a 8°C, mientras que en una bebida de soja de pH neutro, la vainillina no fue capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Penney y col. (2004) encontraron que la presencia de 2.000 ppm de vainillina resultaba en la eliminación de la carga inicial microbiana (levaduras y células bacterianas) en yogures de frutas durante un periodo de almacenamiento de 3 semanas a 4°C. Fitzgerald y col. (2004a) y Moon y col. (2006) encontraron también que la vainillina es más antimicrobiana en zumo de manzana con bajo pH. Lopez-Malo y col. (1998) encontraron un efecto sinérgico entre la vainillina y el pH sobre el crecimiento de mohos. Matamoros-Leon y col. (1999) encontraron que con una ligera reducción en el pH aumentaba el poder antimicrobiano de una mezcla de vainillina y sorbato de potasio y se podía inhibir el crecimiento de *Penicillium digitatum*, *Penicillium glabrum* y *Penicillium italicum* durante un mes. En los productos lácteos se ha encontrado que la vainillina puede oxidarse a di-vainillina en presencia de la peroxidasa por eso es importante determinar la actividad de la vainillina que permanece cuando se añade a la leche antes del tratamiento térmico y la relación vainillina/ácido vainillinico en el producto final (Anklan y col., 1997).

La explicación de la alta actividad antibacteriana en la leche está basada en la alta hidrofobicidad que presentan los AEs a bajo pH y que les permite disolverse fácilmente entre los lípidos de la membrana de la bacteria diana (Mejlholm y Daalgard, 2002, citado por Burt, 2004.). De acuerdo a la teoría de los obstáculos de Leistner (Leistner, 2000) la mayor energía que las bacterias gastan en mantener su mecanismo homeostático en condiciones ácidas también influye en su menor resistencia a los agentes antimicrobianos. Sin embargo un alto valor de a_w aumentaría la actividad antimicrobiana de los AEs debido a que un alto nivel de agua disponible facilitarían el movimiento de los agentes antibacterianos al sitio diana en la célula bacteriana. Por último las proteínas y la grasa presentes en los alimentos se unen a los compuestos activos de los antimicrobianos, modificando su capacidad bactericida. Pol y col. (2001) encontraron que las proteínas de la leche son factores limitantes en el crecimiento de los microorganismos. El contenido en proteína disminuyó también la acción antibacteriana del AE de clavo sobre *Salmonella enteritidis* en queso bajo en grasa (Smith-Palmer y col., 2001). Algunos estudios realizados con vainillina han demostrado que las proteínas interaccionan con los grupos activos de las moléculas de vainillina y reducen su actividad (Li y col., 2000; Chobpattana y col., 2002). Sin embargo otras investigaciones han demostrado que las proteínas tienen alta capacidad para unirse a

los AEs por sus áreas hidrofóbicas y esta propiedad les facilitaría su disolución en el medio (Gutierrez y col., 2009; Baranauskien y col., 2006).

El contenido graso de los alimentos también afecta la actividad antimicrobiana, Canillac y Mourrey (2004) encontraron que el añadir la grasa a la leche reducía la actividad antilisterial de *Listeria monocytogenes*. Smith y Palmer (2001) observaron que los AEs de clavo y canela eran menos efectivos en quesos con alto contenido en grasa que en quesos con menor contenido graso frente a *L. monocytogenes*. Otros autores también han encontrado que la grasa impide la actividad antimicrobiana (Sigh y col., 2003; Gutierrez y col., 2008; Bhavini y col., 2013), confirmando los resultados obtenidos en este trabajo donde se observa que la actividad antimicrobiana de los compuestos naturales ensayados (AEs de clavo, hojas de canela, hojas de canela y vainillina) disminuye con el incremento de grasa de la leche. Se ha sugerido que la grasa en los alimentos forma una película protectora alrededor de las células bacteriana, protegiéndolas de los compuestos antimicrobianos y que los componentes en los AEs podrían migrar a la fase grasa del alimento, dejando la fase acuosa y permitiendo a las bacterias desarrollarse libremente sin antimicrobiano (Mejlholm y Daalgaard, 2002). Se ha demostrado que células de *E. coli* O157:H7 creciendo en presencia de concentraciones subletales de compuestos fenólicos incrementan el nivel de saturación de los lípidos de la membrana y la suplementación en el medio de crecimiento con ácidos grasos saturados o lecitina (la cual contiene ácidos grasos libres) reducen el efecto inhibitorio de los fenoles, porque se incorporan a la membrana de célula microbiana y le ofrecen algún grado de protección (Burt y Reinders, 2003). Investigaciones sobre las características de crecimiento de *L. monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* en emulsiones aceite en agua han demostrado que dependiendo del tamaño de la emulsión, las bacterias pueden crecer en forma de colonias formando biofilms y si las gotas de la emulsión son del apropiado tamaño es posible que las bacterias creciendo dentro de la colonia estén protegidas de la acción del antimicrobiano (Burt, 2004).

La actividad antimicrobiana de los tres AEs ensayados y de la vainillina estuvo también influenciada por la temperatura de incubación, siendo las temperaturas más bajas las más efectivas en potenciar dicha actividad. Smith y Palmer (1998) encontraron un efecto similar de las temperaturas de incubación sobre la actividad antimicrobiana de los AEs de canela y clavo sobre *L. monocytogenes* en CTS. Gutierrez y col. (2009), también encontraron que las bajas temperaturas favorecían la actividad inhibitoria de los AEs de

orégano y tomillo sobre *L. monocytogenes*. Fitzgerald y col. (2004) encontraron que las concentraciones de vainillina entre 10-20 mM, que inhibían el crecimiento de *Candida parapsilosis* y *Sacharomyces cerevisiae* en dos diferentes tipos de bebidas, se reducían a 1 y 5 mM cuando la temperatura de incubación se reducía a 8°C (Fitzgerald y col., 2004b). Los mecanismos de acción de los AEs de canela y clavo y de la vainillina se basan principalmente en el daño que causan a la membrana celular. El incremento de la actividad antimicrobiana de los AEs a bajas temperaturas podría explicarse debido a que la composición en fosfolípidos de la membrana citoplasmática de las células creciendo a 7 °C tienen un mayor grado de insaturación que las células creciendo a 35 °C para mantener la fluidez y función a bajas temperaturas y esto permitiría a los AEs disolverse más fácilmente dentro de la bicapa lipídica.

Este efecto de las bajas temperaturas fue más evidente en *E. coli* O157:H7, así por ejemplo el AE de corteza de canela en leche almacenada a 35 °C presentó la misma CMI para *L. monocytogenes* que para *E. coli* O157:H7. Sin embargo, a 7 °C la CMI necesaria para inhibir el crecimiento de *E. coli* fue mucho menor que la necesaria para inhibir a *L. monocytogenes*. Resultados similares se obtuvieron para la vainillina en leche semidescremada, ya que este compuesto fue bacteriostático en vez de bactericida para ambos microorganismos cuando la temperatura de almacenamiento fue de 35 °C, y ninguna de las curvas presentó CPB. Sin embargo a temperaturas de 7 °C, se encontraron CPBs, con reducciones de la población de 1, 1/2 y 2 ciclos logarítmicos en la población de *E. coli* O157:H7. Este mayor efecto antimicrobiano obtenido frente a *E. coli* O157:H7 a 7 °C se atribuye a que las bajas temperaturas son un factor más limitante para el crecimiento de *E. coli* O157:H7 que para *L. monocytogenes*, ya que la mínima temperatura de crecimiento para este microorganismo es de 7 °C (Park y col., 2009).

Los resultados de las combinaciones de los antimicrobianos en leche fueron muy similares a los obtenidos en caldo CTS. Para *L. monocytogenes* las combinaciones de corteza de canela y clavo fueron las más efectivas y presentaron un claro efecto sinérgico puesto que las combinaciones que lograron la inhibición fueron ¼ CMI corteza de canela y ¼ CMI de AE de clavo., logrando reducciones de más de 1log cuando se ensayaron 1//2 CMI AE de corteza de canela y ½ CMI de AE de clavo. Las combinaciones de vainillina con AE de corteza de canela también presentaron un efecto sinérgico pero solamente durante los primeros días de incubación. Las combinaciones de vainillina con hojas de

canela y con clavo, presentaron un efecto aditivo, ya que la inhibición de *L. monocytogenes* se obtuvo con concentraciones $\frac{1}{2}$ CMI de ambos. Para *E. coli* O 157:H7, las combinaciones de vainillina con AEs de hojas de canela y clavo también resultaron aditivas y las combinaciones más efectivas fueron las de vainillina con corteza de canela con disminuciones en la población bacteriana inicial de $\frac{1}{2}$ ciclo logarítmico con concentraciones $\frac{1}{4}$ de sus CMI respectivas. Estos resultados se correlacionan muy bien con los resultados encontrados en los ensayos de combinaciones realizados in vitro y se corresponden con la idea de que las combinaciones de diferentes AEs, pertenecientes a especies diferentes, o de la misma especie con estructuras distintas como son la canela y la vainilla tienden a mostrar efecto sinérgico, mientras que AEs con composición y estructura similar como las hojas de canela y el clavo presentan efecto sinérgico. Existen pocos estudios realizados sobre el efecto de las combinaciones de AEs en los alimentos y se recomienda ampliamente seguir investigando en esta área, donde se presentan grandes oportunidades para el uso de los AEs como conservantes naturales en los alimentos. Ceylan y col. (2004) encontraron que para *E. coli* O157:H7 las combinaciones 3.000 ppm de canela con 0.1 de benzoato de sodio en zumo de manzana presentaban un efecto sinérgico y eran capaces de disminuir una población de 5 ciclos logarítmicos en 11 días de almacenamiento a 8°C.

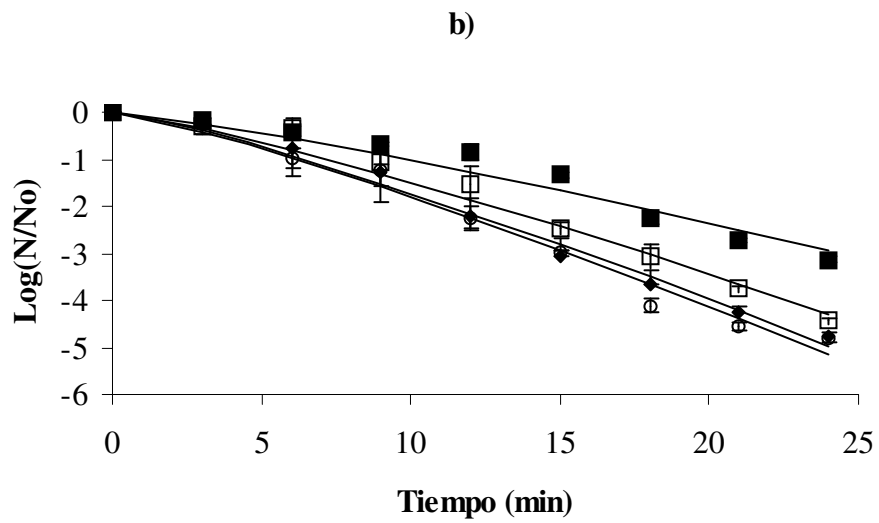
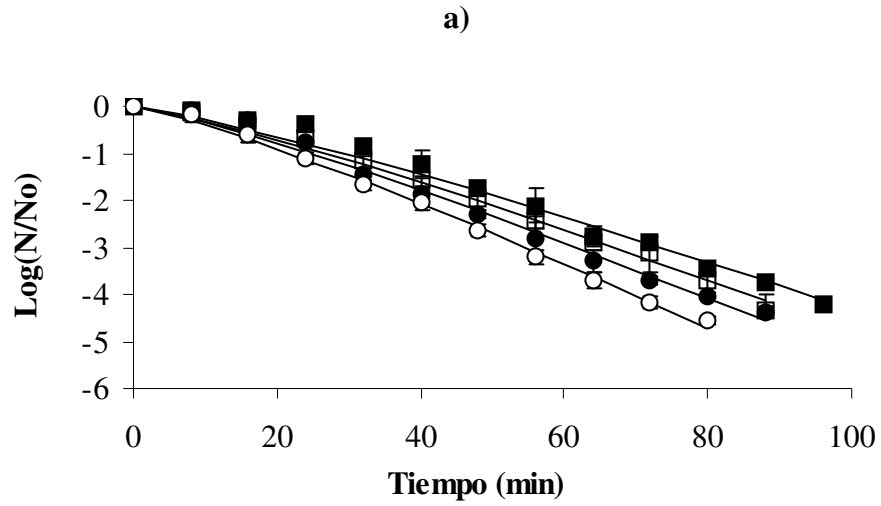
El impacto sensorial de estos aceites esenciales en la leche podría ser una impedimento para su empleo en este tipo de bebidas, sin embargo las concentraciones que resultaron inhibitorias en este trabajo se encuentran dentro del rango habitualmente empleado en la industria alimentaria, 1.000 ppm para la canela (Badei y col., 2002) o los 150 ppm-4.000 ppm para la vainillina (Hocking, 1997). Teniendo en cuenta el efecto positivo de las bajas temperaturas y de la disminución del contenido graso en la leche para reducir las concentraciones efectivas de los antimicrobianos así como que todas las combinaciones presentaron un efecto sinérgico y aditivo, el impacto sensorial podría disminuirse muy por debajo de las CMI respectivas. También es interesante considerar que el periodo de vida útil de la leche pasteurizada es aproximadamente de 7-10 días, por lo que algunas CPIs serían efectivas en controlar la población de *L. monocytogenes* y *E. coli* O 157:H7 durante este tiempo.

3.3 Efecto del tratamiento térmico sobre *L. monocytogenes* en leche semidescremada suplementada con vainillina.

3.3.1 Modelización de curvas de supervivencia.

La Figura 57 muestra las curvas de destrucción térmica de *L. monocytogenes* en leche tratada térmicamente (55-62°C) sin ningún aditivo (control) y con 900, 1.400 y 1.00 ppm de vainillina. Casi todas las curvas de supervivencia exhibieron una curva convexa, con un hombro precediendo una tasa de muerte acelerada sin efecto cola, a todas las temperaturas ensayadas y a cualquier concentración de vainillina. Los dos modelos (Weibull y “the shoulder+log-linear”) ajustaron correctamente las curvas y mostraron coeficientes de correlación (R^2) en el rango de 0,86-0,99. Los parámetros obtenidos al ajustar las curvas por el modelo “the shoulder+log-linear” demuestran que la presencia de vainillina incrementa la tasa de mortalidad (k_{max}) y reduce el periodo de latencia (SI) en el proceso de inactivación térmica de *L. monocytogenes* a cualquier temperatura ensayada (Tabla 22). Este efecto depende de la cantidad de vainillina presente en el medio de calentamiento. Los valores de k_{max} fueron más bajos en la leche sola que en las suplementadas con vainillina a cualquier temperatura ensayada, pero el efecto fue más pronunciado a las temperaturas más bajas (55 °C-58 °C). A las temperaturas más altas (60-62 °C) sólo se encontraron diferencias significativas entre las k_{max} cuando se ensayaron las concentraciones de vainillina más altas, probablemente porque el tratamiento por calor por si mismo ya es letal. La vainillina también redujo la longitud del hombro de *L. monocytogenes* en la leche, pero este efecto fue más variable. Char y col. (2009) observaron que la vainillina aceleraba la cinética de inactivación de *L. monocytogenes* en el zumo de naranja, disminuyendo el tiempo de procesamiento requerido para alcanzar la inactivación a la temperatura de calentamiento. Char y col. (2010) obtuvieron similares resultados sobre *L. innocua* usando citral o citral más vainillina en combinación con el tratamiento térmico en zumo de naranja. La termorresistencia de la cepa fue más alta que la obtenida por Farber (1998), pero similar a la obtenida por Szlachta y col. (2010) para la misma cepa en leche en polvo reconstituida con un porcentaje de sólidos de 27 %. Estos autores atribuyen el incremento en la termoresistencia al alto contenido de sales del producto y no a la cantidad de caseinato, grasa o lactosa. Por otro lado la diversidad en la resistencia térmica entre cepas de *L. monocytogenes* es habitual (Edelson-Mammel y col., 2005) y así se han descrito subpoblaciones termorresistentes en cultivos de *L. monocytogenes*. Karatzas y Bennik

(2002) y Karatzas y col. (2003) mostraron que una subpoblación de cepas de *L. monocytogenes* Scott A, con una mutación en la *ctsR* (class III heat-shock regulator), era mas termorresistente que la cepa salvaje.



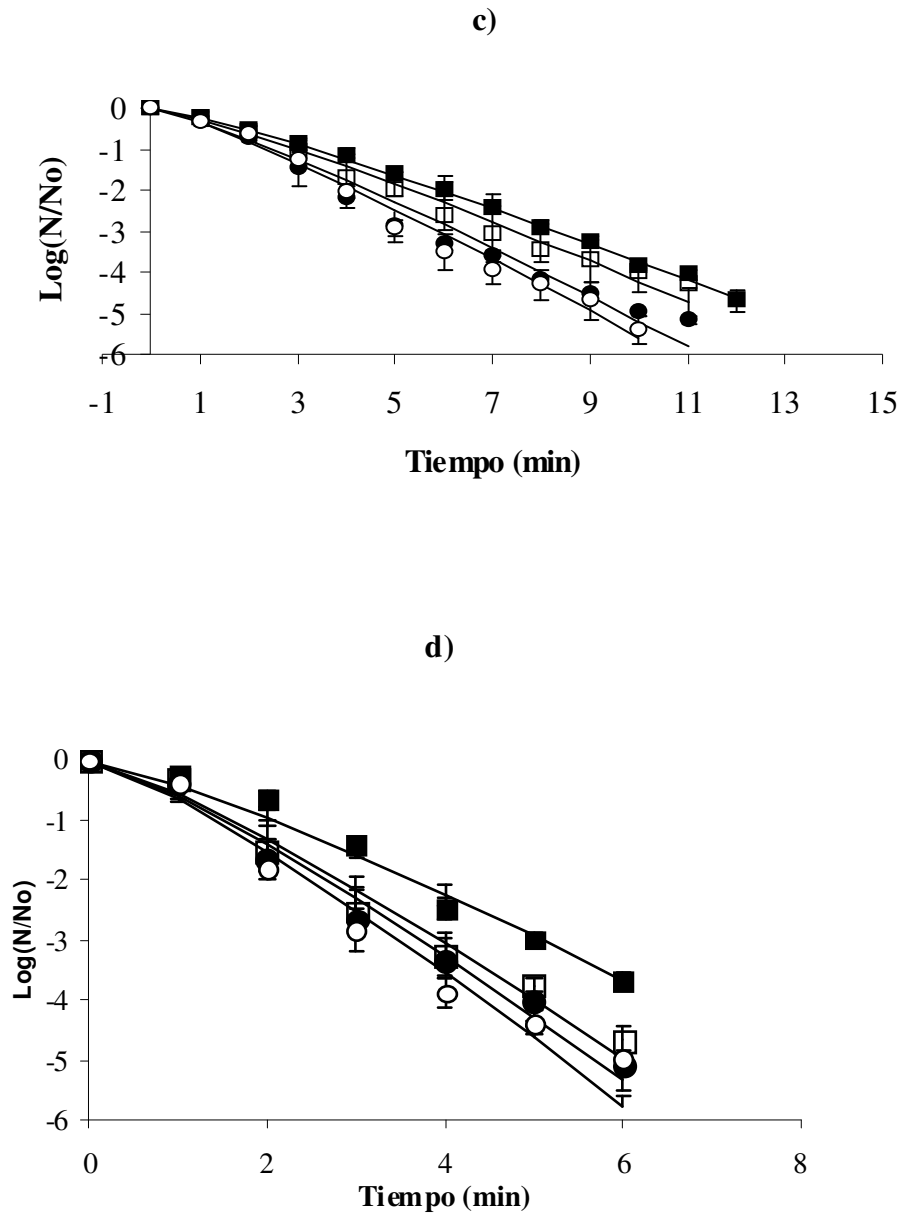


Figura 57. Ajuste del modelo Weibull a los datos de destrucción térmica de *L. monocytogenes* en leche semidescremada suplementada con vainillina. Los valores experimentales corresponden a los puntos y los ajustados a las líneas. a) 55 °C, b) 58 °C, c) 60 °C y d) 62 °C vainillina: ■ 0 ppm, □ 900 ppm, ● 1.400 ppm, ○ 1.800 ppm.

Tabla 22. “Parámetros del modelo “Shoulder_log-linear” y del modelo Weibull para las curvas de destrucción térmica de *L. monocytogenes* en leche semidescremada suplementada con vainillina y sometida a diferentes temperaturas de calentamiento-

T (°C)	[Van.] (ppm)	kmax	SI	R ²	δ	p	R ²
55	0	0.118 ^a ± 0.001	14.609 ^a ± 2.882	0.984+0.002	29.89 ^a ±4.161	1.26 ^a ± 0.137	0.984± 0.005
	900	0.137 ^b ± 0.006	13.068 ^a ± 0.908	0.988+0.002	28.08 ^a ±1.202	1.32 ^a ± 0.031	0.990± 0.001
	1400	0.136 ^b ± 0.002	8.434 ^b ± 2.000	0.983+0.008	21.52 ^b ±2.506	1.11 ^b ± 0.074	0.987± 0.019
	1800	0.146 ^c ± 0.004	6.978 ^b ± 0.002	0.994 0.150	19.37 ^b ±0.850	1.10 ^b ± 0.068	0.992± 0.001
58	0	0.395 ^a ± 0.032	5.536 ^a + 20.001	0.987+0.280	10.43 ^a ±0.856	1.39 ^a ± 0.113	0.988±0.004
	900	0.517 ^{b,c} ± 0.038	4.433 ^a + 0.006	0.988+1.561	7.45 ^a ±0.589	1.29 ^a ± 0.056	0.980±0.009
	1400	0.570 ^c ± 0.018	2.703 ^{a,b} + 0.686	0.973+0.015	5.58 ^{b,c} ±0.590	1.15 ^{a,b} ±0.073	0.971±0.019
	1800	0.562 ^c ± 0.004	3.416 ^b + 0.166	0.976+0.002	6.05 ^c ±0.192	1.22 ^b ± 0.043	0.971±0.004
60	0	0.987 ^a + 0.061	0.842 ^a + 0.550	0.991+0.001	3.89 ^a ±0.589	1.32 ^a ±0.172	0.967±0.004
	900	0.992 ^a + 0.051	0.264 ^b + 0.458	0.972+0.003	2.53 ^a ±1.332	1.06 ^a ±0.458	0.967±0.004
	1400	1.186 ^b + 0.064	0.233 ^b + 0,061	0.976+0.015	1.79 ^{a,b} ±0.358	1.01 ^a ±0.103	0.976±0.015
	1800	1.341 ^b + 0.116	0.441 ^b + 0,193	0.976+0.015	1.81 ^b ±0.215	1.02 ^a ±0.051	0.974±0.015
62	0	1.551 ^a + 0.025	0.654 ^a +0.3851	0.867+0.207	1.87 ^a ±0.171	1.10 ^a ±0.089	0.971±0.207
	900	1.593 ^a + 0.090	0.381 ^a +0.2879	0.974+0.011	1.63 ^{a,b} ±0.097	1.05 ^{a,b} ±0.287	0.989±0.010
	1400	1.677 ^a + 0.058	0.509 ^a + 0.3178	0.975+0.011	1.44 ^b ±0.310	1.01 ^{a,b} ±0.010	0.914±0.010
	1800	1.955 ^b + 0.007	0.113 ^a + 0.0827	0.978+0.004	1.21 ^b ±0.007	0.97 ^b ±0.082	0.959±0.011

Los valores para las diferentes constantes fueron calculadas automáticamente por GInaFIT (Geeraerd y col., 2000). Los datos se expresan como media ±SD.

Diferentes letras en la misma fila denotan diferencias significativas entre los datos

Los valores z observados fueron 6,13, 6,48, 6,30 y 6,12°C, cuyos valores R^2 fueron 0,992, 0,984, 0,965 y 0,973 para la leche sola y leche con 900 ppm, 1.400 ppm y 1.800 ppm de vainillina respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores z de las células tratadas térmicamente a las concentraciones de vainillina investigadas. Los valores z reflejan la sensibilidad de un organismo a los cambios de temperatura, así en el rango de temperaturas ensayado, el efecto de la vainillina en la leche sobre la reducción de la termoresistencia de *L. monocytogenes* Scott A fue constante y no se vió afectada por la concentración de vainillina. Knight y Mac (2007) obtuvieron efectos similares sobre los valores D y z de *E. coli* O157:H7 en sidra de manzana suplementada con AEs de canela y clavo.

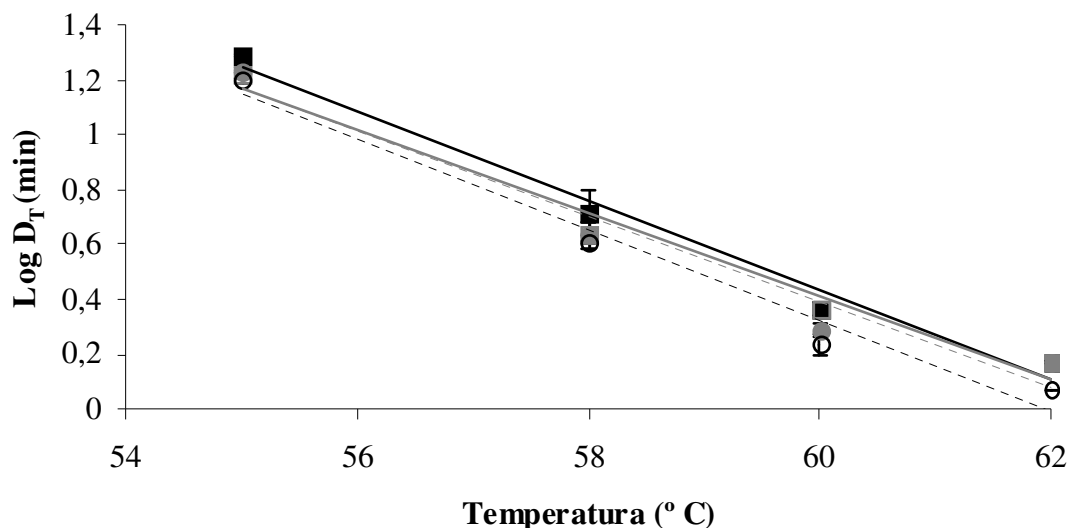


Figura 58. Sensibilidad de *L. monocytogenes* a los cambios de temperatura en leche semidescremada con vainillina. Cada punto representa la media de tres réplicas \pm desviación estándar.

Los criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* en leche en la Unión Europea exigen ausencia del patógeno en 25g. Tomando en consideración que los recuentos más altos que se pueden esperar en una leche contaminada son 10^2 ufc/ml (Waak y col., 2002), una reducción de 4 ciclos logarítmicos es suficiente para garantizar destrucción total del patógeno. El tiempo requerido para obtener una reducción de 4 ciclos logarítmicos para cada una de las condiciones ensayadas en este estudio se obtuvo directamente al ajustar el modelo “the shoulder+log-linear”). De acuerdo a estos datos una pasteurización hipotética de 62,8°C por 30 minutos para los productos sería suficiente para eliminar los microorganismos con un amplio margen de seguridad y una pasteurización HTST (72,7 °C por 15 segundos) conseguiría una reducción mucho mayor. El incremento de la temperatura de calentamiento en sistemas con vainillina redujo el tiempo para alcanzar una reducción de 4 ciclos logarítmicos en la población de 93 minutos a 55°C a 4,8 min a 62°C. La adicción de vainillina a la leche tratada térmicamente entre 55 y 62°C redujo la resistencia de *L. monocytogenes*, así el tiempo necesario para conseguir la reducción de 4 ciclos logarítmicos se redujo significativamente en la mayoría de los tratamientos ($p < 0,05$). Este efecto dependió considerablemente de la cantidad de vainillina añadida, pero fue aproximadamente similar a todas las temperaturas ensayadas. Una reducción media del 25% en el tiempo necesario para lograr una reducción de cuatro ciclos logarítmicos se obtuvo cuando 1400

ppm de vainillina se añadieron a la leche. Char y col. (2009) observaron que las concentraciones de vainillina producían una disminución en el tiempo requerido para alcanzar reducciones de 5 ciclos logarítmicos a 57 °C en las poblaciones de *L. innocua* inoculadas en zumo de naranja. Estos autores encontraron que 500 ppm de vainillina reducían este tiempo de 6,2 min (zumo de naranja sin vainillina) a 4 min, mientras que la adicción de 1.100 ppm de vainillina incrementaba la disminución de la población, requiriéndose solamente 2 minutos para conseguir los mismos niveles de reducción a las mismas temperaturas de calentamiento.

Char y col. (2010) también encontraron que la combinación de citral o citral más vainillina con suave tratamiento térmico producía el mismo efecto. El fuerte impacto de las combinaciones de vainillina con las temperaturas de calentamiento sobre la termorresistencia de *Listeria* spp. encontrada por estos investigadores puede atribuirse a numerosos factores, entre ellos, el efecto protector que la grasa y la proteína de la leche puede tener sobre las células y que disminuye el efecto antimicrobiano de la vainillina (Burt, 2004). El pH ácido del zumo de naranja en contraste con el pH neutro de la leche puede también afectar la termorresistencia de las células bacterianas. Los valores de pH de la leche medidos con y sin vainillina añadida antes y después de cada tratamiento térmico oscilaron entre 6.9 ± 0.04 y 6.6 ± 0.03 . Buchanan y col. (1993) demostraron que a pHs menores o iguales a 5,5, la tasa de inactivación de *L. monocytogenes* fue linealmente dependiente del pH. Hassani y col. (2005) encontraron que los tiempos para reducir cinco ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* eran mayores en medios con pH 7,4 y 5,5 que en medios con pH 4. Aunque la vainillina es un aldehído, exhibe un comportamiento ácido-base con un pK de 7,4 a 25°C y su actividad antilisterial tiende a exhibir mayores actividades a pH cerca del pK, debido a un incremento en la proporción de la parte no disociada (Delakis y col., 2005). La termorresistencia podría también verse afectada por las diferentes cepas, por la edad del cultivo y por las condiciones de crecimiento.

3.3.1.1 Distribución de frecuencias.

En este trabajo el efecto de los tratamientos combinados fue también analizado bajo otro modelo diferente: distribución de resistencias de Weibull. Este modelo considera que la población microbiana no es igualmente resistente al tratamiento propuesto y cada célula no es destruida al mismo tiempo durante el procesamiento. Como resultado la curva de

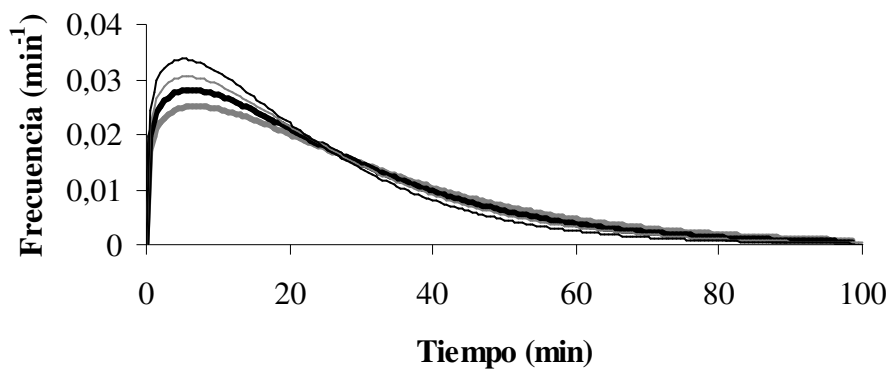
supervivencia es un resultado acumulativo de una distribución temporal de suceso letal donde cada organismo individual se activa a un tiempo específico, generando un espectro de resistencias al calor. La tabla 22 representa los parámetros δ y p obtenidos de ajustar la distribución Weibull a las curvas de supervivencia y el correspondiente ajuste de correlación. Los parámetros Weibull δ y p variaron de acuerdo a la severidad de las condiciones de estrés y los valores obtenidos de R^2 fueron altos (entre 0,914% y 0,992%). Las curvas de supervivencia correspondientes a una combinación de temperatura moderada de calentamiento (55-58°C) y vainillina presentaron valores $p > 1$, siendo el grado de concavidad de la curva de supervivencia en general más bajo con concentraciones más altas de vainillina. Este hecho podría indicar que la sensibilidad de los supervivientes podría incrementarse como un resultado de la acumulación de daño (Peleg y Pechina, 2000).

La destrucción térmica de *L. monocytogenes* en la leche tratada térmicamente con vainillina a temperaturas de entre 60-62°C generó curvas casi lineales con valores p valores ~ 1 . Char y col. (2009) y Maisnier-Patin y col. (1995) observaron que cuando la temperatura de calentamiento incrementaba de 50 a 60°C, la muerte de la célula microbiana se aceleraba generando curvas de supervivencia sin o con una muy escasa cola u hombro. Char y col. (2010) también encontraron que la adición de 900 ppm de vainillina y 25 ppm de citral en el zumo de naranja calentado a 52°C producía curvas de supervivencia con $p > 1$, sin embargo, concentraciones de 1100 ppm a 59°C producían curvas de supervivencia con $p < 1$, con una forma de la curva de supervivencia con concavidad hacia abajo. El parámetro p , o parámetro de escala, en general disminuye cuando el nivel de vainillina y/o la temperatura de calentamiento incrementan. Los parámetros δ y p se usaron para representar la distribución de frecuencias de las resistencias o sensibilidades de la población microbiana.

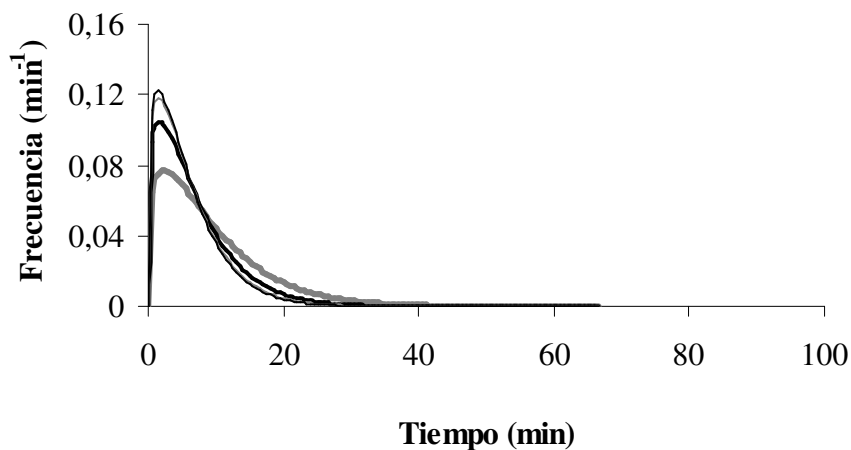
La distribución de frecuencias se presenta en la Figura 60 y muestra claramente la reducción en la extensión y el incremento en el valor de la frecuencia cuando la concentración de la vainillina y la temperatura de calentamiento incrementan, indicando que la mayor parte de la población tiene la misma resistencia a un tiempo específico bajo condiciones más severas. La distribución de las resistencias a temperaturas entre 55-58°C presentó una distribución de los datos más extensa, lo que indicaría que los miembros de la población se inactivarían a diferentes tiempos, dejando una mayor proporción de microorganismos resistentes, lo cual se confirmó por una distribución con una ancha cola. Incrementos en las temperaturas de calentamiento de 60 hasta 62°C produjeron una

disminución en la extensión de la distribución de la frecuencia con picos más altos, indicando que la mayor parte de la población se destruía en un tiempo muy corto, mientras que una proporción menor con resistencia más alta permanencia viable. La distribución fue más sesgada hacia la derecha. La adición de vainillina a cualquier temperatura produjo distribuciones más estrechas, efecto que fue más evidente a temperaturas más bajas y mayor cuando la concentración de la vainillina incrementó. Este efecto indica que la mayoría de la población se destruyó en tiempos más cortos, dejando detrás una fracción de sobrevivientes más alta. El efecto de las diferentes temperaturas de calentamiento a las concentraciones seleccionadas de vainillina se pueden observar en la Figura 59. El calentamiento de la leche con 1.800 ppm de vainillina a temperaturas más bajas (57 -59°C) afectó las células mas sensibles pero dejó una larga cola de resistentes. El incremento de temperatura de 60 a 61°C redujo el tiempo de exposición necesario para inactivar *L. monocytogenes* y solamente 5 minutos fueron suficientes para su inactivación.

a)



b)



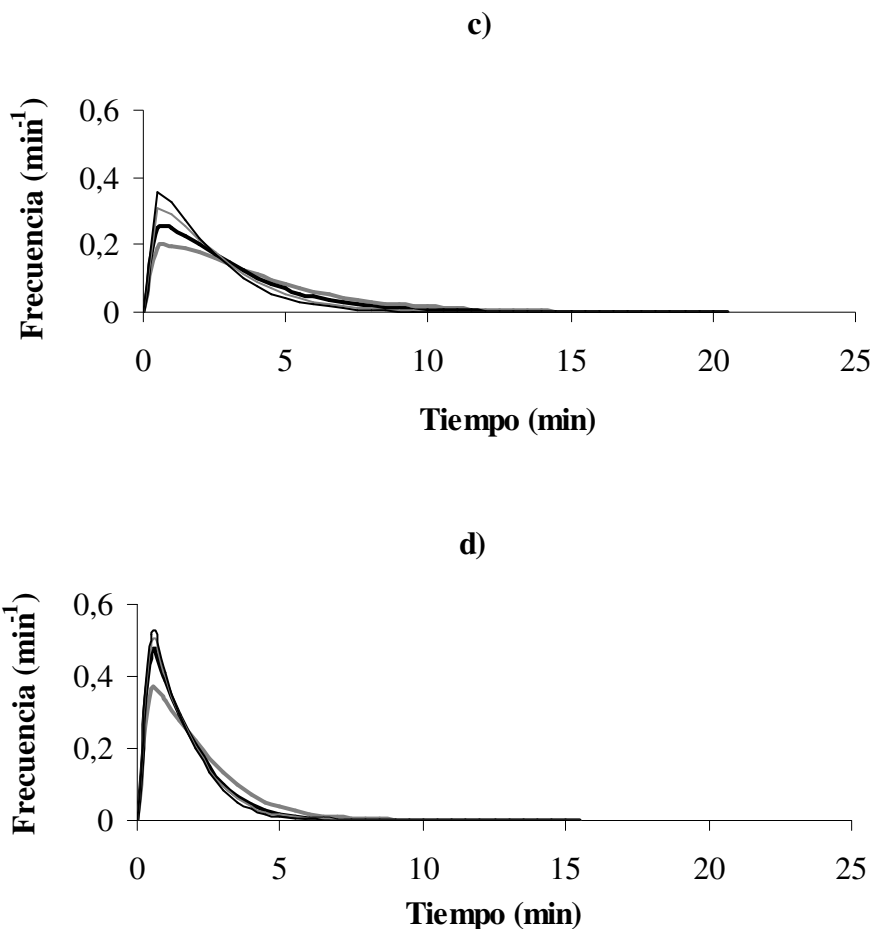


Figura 59. Distribución de resistencias correspondientes a las curvas de destrucción de *L. monocytogenes* en leche suplementada con diferentes concentraciones de vainillina y térmicamente tratadas, ajustadas con la función de la distribución acumulativa de Weibull. a): 55°C, b) 58°C, c) 60°C y d) 62°C.

El mecanismo antimicrobiano de la vainillina se basa en su habilidad para destruir la membrana plasmática de las células microbianas a través de una interacción con los lípidos y proteínas o con ambas estructuras, con la subsecuente pérdida de gradiente iónico e inhibición de la actividad respiratoria (Fitzgerald y col., 2004). El tratamiento térmico produce en las células bacterianas daño en las membranas celulares, ribosomas, ácidos nucleicos y proteínas. Así, el tratamiento térmico aumentaría el daño producido incrementaría la efectividad de la vainillina.

En general, el uso de vainillina en combinación con un ligero tratamiento térmico favorece claramente los beneficios del uso de un solo factor. Por otro lado, la vainillina no solo disminuye la severidad del tratamiento requerido para un procesamiento térmico sino

que también produce un efecto a largo plazo previniendo el crecimiento microbiano de cualquier célula que haber sobrevivido al tratamiento térmico y crecer durante el almacenamiento en refrigeración

4 CONCLUSIONES

- La modelización del área fraccionada bajo la curva basada en los datos de absorbancia obtenidos permitió exitosamente establecer los perfiles inhibitorios de los siguientes antimicrobianos vegetales: eugenol, cinamaldehído, vainillina, AE de corteza de canela, AE de clavo y AE de hojas de canela.
- El antimicrobiano con mayor actividad inhibitoria (CMI) antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* Scott A fue AE de corteza de canela seguido por AE de clavo, elcinamaldehído, AE de hojas de canela, eugenol y vainillina.
- El antimicrobiano con mayor actividad inhibitoria (CMI) frente a *E. coli* O 157:H7 fue cinamaldehído, seguido por AE de corteza de canela, eugenol, AE de clavo, AE de hojas de canela y vainillina.
- Los AEs de hojas de canela y clavo presentaron una actividad antimicrobiana similar, atribuible a su parecido contenido en eugenol. La diferente actividad antimicrobiana del AE de corteza de canela se atribuye a su alto porcentaje de cinamaldehído.
- Resultados similares a la CMI se encontraron para los valores de CNI frente a los dos microorganismos, aunque no necesariamente los niveles más bajos de CMI correspondieron siempre a niveles más bajos de CNI-
- El antimicrobiano con mayor actividad bactericida (CMB) frente a *L. monocytogenes* Scott A fue el AE de clavo, seguido por el AE de canela y el eugenol, el AE de corteza de canela, el cinamaldehído y la vainillina.
- El antimicrobiano con mayor actividad bactericida (CMB) frente a *E. coli* O 157:H7 fue el eugenol, seguido por el AE de clavo, el AE de hojas de canela, el cinamaldehído y el AE de corteza de canela.

- Los valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), CNI (Concentración No Inhibitoria) se usaron para estimar el grado de resistencia y sensibilidad de *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* O157:H7 a los antimicrobianos ensayados. Ambos microorganismos mostraron una resistencia y sensibilidad similar para el cinamaldehído y la vainillina. Para ambos antimicrobianos la actividad antimicrobiana fue más inhibitoria que bactericida. Sin embargo para los AEs de corteza de canela, clavo y hojas de canela *E. coli* O157:H7 fue más resistente y menos sensible que *L. monocytogenes* Scott A. Este comportamiento puede atribuirse a que los componentes minoritarios de dichos aceites se comportan de modo diferente frente a ambos microorganismos.
- Los valores CNI obtenidos para cada antimicrobiano permitieron determinar las concentraciones ligeramente mayores o CPIs que pueden retrasar el crecimiento microbiano y reducir la máxima densidad de población al nivel deseado o conveniente en el alimento. Este efecto es muy destacable para reducir el impacto sensorial de los AES en alimentos, alargar su vida útil, y mejorar su inocuidad.
- Los antimicrobianos con mayor actividad bactericida (CMB) frente a *L. monocytogenes* fueron el eugenol, los AEs de clavo y de hojas de canela, seguidos por el AE de corteza de canela y el cinamaldehído y la vainillina.
- Los antimicrobianos con mayor actividad bactericida (CMB) frente a *E. coli* O157:H7 fueron en orden decreciente el eugenol y el AE de clavo, AE de hojas de canela, cinamaldehído, AE de corteza de canela y vainillina.
- Los componentes minoritarios presentes en los AES de corteza de canela, hojas de canela y clavo desempeñan una actividad antimicrobiana importante e influyen en la actividad final del AE. Los resultados sugieren que el efecto fue sinérgico frente a *L. monocytogenes* al potenciar la actividad del eugenol, componente mayoritario del AE de hojas de canela y clavo, y del cinamaldehído, componente mayoritario del AE de corteza de canela. Al contrario, los componentes minoritarios de los AEs de canela y clavo y de corteza de canela parecen ejercer un efecto antagónico frente a *E. coli* O157:H7 y disminuyen la actividad antimicrobiana del eugenol,

componente mayoritario del AE de hojas de canela y clavo y del cinamaldehído, componente mayoritario del AE de corteza de canela.

- Las variaciones de pH entre 6 y 7 no ejercieron influencia en la CMI de *E. coli* O157:H7 ni de *L. monocytogenes*. Los tiempos de latencia y la tampoco se vieron afectados.
- Las mezclas de eugenol y cinamaldehido en CTS presentaron un efecto aditivo para *L. monocytogenes* Scottt A.
- Las mezclas de AEs de clavo y de hojas de canela en CTS presentaron un efecto aditivo frente a *L. monocytogenes* Scottt A. y *E. coli* O157:H7.
- Las mezclas de AEs de corteza de canela/ AE de clavo y AE de corteza de canela/AE de hojas de canela presentaron efecto aditivo frente a *L. monocytogenes* Scottt A e indiferente para *E. coli* O157:H7.
- Las mezclas de vainillina / AEs de clavo, hojas de canela y corteza de canela en CTS presentaron un efecto aditivo frente a *L. monocytogenes* y sinérgico para *E. coli* O157:H7.
- Los componentes minoritarios ejercen un papel importante en el efecto sinérgico, antagónico o aditivo de las combinaciones de antimicrobianos, y este fue diferente para cada microorganismo : sinérgico para *L. monocytogenes* y antagónico para *E. coli* O157:H7
- La vainillina y los AEs de canela y clavo presentaron actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* O 157:H7 en leche pasteurizada de vaca. Esta acción antimicrobiana fue dependiente de la composición y concentración de los antimicrobianos, la cantidad de grasa de la leche, del tiempo y temperatura de almacenamiento y del microorganismo diana.

- El antimicrobiano con mayor actividad en la leche de vaca fue el AE de corteza de canela, seguidos del AE de clavo y del AE de hojas de canela y la vainillina.
- Para cada antimicrobiano se encontraron varias CPIs. Estas representan un gran potencial para ser usadas de forma aislada y en combinación en la leche, sobre todo considerando el periodo de vida útil de la leche.
- Las combinaciones de los aceites de canela, clavo y vainillina potenciaron su efecto antimicrobiano en las mezclas, especialmente aquellas de AEs de corteza de canela/AE de clavo y las de vainillina /AE de corteza de canela y vainillina/ AE de clavo. Las combinaciones más efectivas para *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 fueron las de AE de corteza de canela/vainilla y las del AE de corteza de canela / clavo. El efecto antimicrobiano encontrado en las mezclas podría minimizar las concentraciones a aplicar de los AEs y consecuentemente reducir su impacto sensorial.
- Los aceites de corteza de canela, clavo y la vainillina tuvieron mayor actividad antimicrobiana en leche descremada que en leche entera. El contenido de grasa es un factor limitante para la actividad antimicrobiana en la leche.
- Las bajas temperaturas de almacenamiento aumentaron la actividad antimicrobiana de los aceites de canela y clavo así como de la vainillina en la leche y constituyen un obstáculo adicional que limita el crecimiento de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Este efecto fue mayor en este último microorganismo ya que es más sensible a las bajas temperaturas que *L. monocytogenes*
- El uso de la vainillina, AEs de canela y clavo pueden considerarse una herramienta para incrementar la seguridad de la leche pasteurizada. El efecto combinado de la vainillina en concentraciones subletales con bajas temperaturas de almacenamiento podría ser un método de conservación muy útil para la leche pasteurizada, debido especialmente a que las temperaturas de refrigeración no aseguran totalmente el control de microorganismos tales como *L. monocytogenes* o *E. coli* O157:H7

- La vainillina demostró mayor actividad antimicrobiana en leche frente a *E. coli* O 157:H7 que frente a *L. monocytogenes*. El uso de este antimicrobiano combinado con AE de corteza de canela o clavo junto con bajas temperaturas de almacenamiento en leche pasteurizada con bajo contenido de grasa puede aumentar significativamente los niveles de seguridad de la leche pasteurizada sin afectar negativamente sus propiedades organolépticas, sobre todo teniendo en cuenta que las condiciones de refrigeración no garantizan por sí solas la inocuidad de la leche pasteurizada
- El uso de vainillina a concentraciones sub-inhedorias fue efectiva en favorecer el efecto térmico letal sobre *L. monocytogenes* en leche pasteurizada
- El modelo “shoulder + log linear” y el modelo Weibull de distribución de frecuencias ajustaron adecuadamente las curvas de inactivación térmica. La adición de vainilla a la leche disminuyó la fase lag y aumentó la tasa de muerte de *L. monocytogenes* especialmente en los tratamientos térmicos realizados a baja temperatura.
- El efecto de la vainilla en la leche sobre la reducción de termorresistencia de *L. monocytogenes* Scott A fue constante en el rango de temperaturas estudiadas, y no cambió la sensibilidad de este microorganismo a dichas temperaturas
- La disminución de la resistencia térmica de *L. monocytogenes* al añadir vainillina a la leche se observó mejor en los tratamientos efectuados a temperaturas más bajas.
- La distribución de frecuencias fue una herramienta útil permitió seleccionar las combinaciones de temperatura y concentraciones de vainillina más adecuadas para garantizar exitosamente la inactivación de la mayor población de *L. monocytogenes*
- Las combinaciones de las temperaturas y concentraciones de vainilla más altas permitieron la inactivación de la población de *L. monocytogenes* en menos tiempo.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Ahravi, S.S., Ergüven, S., Günalp, A. 1998. Detection of *Listeria* in raw milk and pasteurized milk. *Center of European Journal Public Health* 6: 254-255.
2. Ai-Turki, A.I., Ei-Ziney, M.G., Abdel-Salam, A.M. 2008. Chemical and anti-bacterial characterization of aqueous extracts of oregano, marjoram, sage and licorice and their application in milk and labneh. *Journal of Food Agriculture and Environment* 1: 39-44.
3. Alavi, S.H., Puri, V.M., Knabel, S.J., Mohtar, R.H., Whiting, R.C., 1999. Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *Journal of Food Protection* 62: 170-176.
4. Ali, H.S., Kamal, M. and Mohamed, S.B. 2009. In vitro clove oil activity against periodontopathic bacteria. *Journal of Science and Technology* 10: 1-7.
5. Al-Bayati, F.A. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 116:403-6.
6. Allerberger, F., Wagner M., Schweiger P., Rammer, H.P., Resch A., Dierich M.P., Friedrich A.W., Karch H. 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. *Eurosurveillance* 6 147-151.
7. Amalaradiou, M.A., Venkitanarayanan, K. 2011. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *Journal of Food Protection* 74: 200-208.
8. Amalaradjou, M.A.R., Hoagland T.A., Venkitanarayanan, K. 2009. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde. *International Journal of Food Microbiology* 129: 146-149.
9. Amini, A., Dugas, R., Pichot, A.L., Bompeix, 2008. In vitro and in vivo activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (1-2): 13-19.
10. Angelidis, A.S., Smith, G.M., 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Applied of Environmental Microbiology* 69: 7492-7498.
11. Angienda, P.O., Hill, D.J. 2012. The effect of sodium chloride and pH on the antimicrobial effectiveness of essential oils against pathogenic and food spoilage

- bacteria: implications in food safety. *International Journal of Biological and Life Sciences* 8: 222-227.
12. Anklam, E., Gaglione, S., Muller, A. 1997. Oxidation behavior of vanillin in dairy products. *Food Chemistry* 60: 43-51.
 13. Ann, A.C., Deepika, H., Pradeep, S.N. 2012. Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *Journal of Essential Oils Research* 24: 481-486.
 14. Anonymous. 1998. Cases of *Escherichia coli* O157 infection associated with unpasteurized cream. *CDR Weekly* 8: 389.
 15. Anonymous. 2000. Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurised milk. *CDR Weekly* 10: 203-206.
 16. Arras, G., Usai, M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection* 64: 1025-1029.
 17. Aureli, P., Costantine, A., Zolea, S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55: 344-348.
 18. Ayoola, G.A., Lawore, F.M., Adelowotan, T., Aibinu, I.E., Adenipekun E., Coker, H.A.B., Odugbemi, T.O. 2008. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove). *African Journal of Microbiology Research* 2: 162-166.
 19. Babu, A.J., Sundari, A.R., Indumathi, J., Surjan, R.V.N., M. Sravanthi, M. 2011. Study on the Antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils of Spices. *Veterinary World* 4: 311-316.
 20. Badei, A.Z.M., Faheid, S., El-Akel, A.T.M., Mahmoud, B.S. 2002. Application of some spices on flavoring and preservation of cookies: Antimicrobial and sensory properties of cardamon, cinnamon and clove. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 98: 261-265.
 21. Bachiega, T.F., de Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Sfrocin, J.M. 2012. Clove and eugenol in mononcytotoxic concentrations exert immunomodulatory /antimicrobial action on cytokine production by murine macrophages. *Journal of Pharmacy Pharmacologic* 64: 610-616.

22. Bagamboula, C.F., Uyttendaelae, M., Debevere, J. 2003. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Journal of Food Protection*, 66:668-673
23. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.
24. Balchin, M.L, Deans, S.G. 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 6: 759-762.
25. Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Gombossy de Melo Franco, B.D., Converti, R.P., Oliveira, R.P.S. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32: 134-142.
26. Barakat, S.M., Mahmoud, Yamazakia, K., Miyashita, K., Il-Shik, S., Dong-Suk, C., Suzuki, T. 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology* 21: 657-666.
27. Barbosa, B., Cabedo, L., Wederquist, H. J., Sofos, J.N., Schmidt, G.R. 1994. Growth Variation among Species and Strains of *Listeria* in Culture Broth. *Journal of Food Protection* 57: 765-769.
28. Bassole, I.H.N, Lamien-Meda, A., Bay-ala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H. 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules* 15: 7825-7839.
29. Bassolé, N.H.I. Juliani, R.H. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17:3989-4006.
30. Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2001. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.
31. Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3: 1-20.
32. Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goñi, P., López, P., Nerín, C. 2007. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388: 1003-1011.

33. Beecher, C. 2005. Shareholder dairy's milk tests positive for *E. coli*. Capital Press. Disponible en: <http://www.ecolilitigation.com/deecreek008.htm>. Ultimo acceso : Julio 2013
34. Bell, A. 2005. Antimalarial drug synergism and antagonism: mechanistic and clinical significance. *FEMS Microbiology Letters* 253: 171-184.
35. Belletti, N., Kamdem, S.S., Tabanelli, G., Lanciotti, R., Gardini, F. 2010. Modeling of combined effects of citral, linalool and B-pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 136: 283-289.
36. Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology* 43: 149-154.
37. Benencia, F., Courreges, M.C. 2000. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. *Phytotherapy Research* 14: 495-500.
38. Bermudez-Aguirre D., Fernandez, S., Esquivel H., Dunne P.C., Barbosa-Cánovas, G.V. 2011. Milk processed by pulsed electric fields: evaluation of microbial quality, physicochemical characteristics, and selected nutrients at different storage conditions. *Journal of Food Science* 76: 289-299.
39. Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3:1-20
40. Berenbaum, MC. 1989. What is synergy?. *Pharmacology Reviews* 41:93-141.
41. Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Minarikova, H., Jikova, E., Karmali, M.A., Laubova, J., Sikulova, J., Preston, M.A., Khakhria, R., Karch, H., Klazarova, H., Nyc, O. 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goats milk. *Epidemiology and Infection* 119: 299-305.
42. Bille, J., Blanc, D.S, Schmid, S., Boubacer, K., Baumgartner, H., Tritten, L.M., Lienhard, R., Berner, D., Anderau, R., Treboux, M., Ducommun, J.M., Malinverni, R., Genne, D., Gerard, P.H, WAEsp, U. 2006. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland. *Eurosurveillance* 11: 91-93.
43. Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M., Caniaux, I., Monget, D., Rocourt, J. 2006. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1857-1860.

44. Blaszyk, M., Holley, R.A. 1997. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 39: 175-183.
45. Boggs, J.D., Whitwam, R.E, Hale, L.M., Briscoe, R.P., Kahn, S.E. 2001. Outbreak of listeriosis associated with home made Mexican-style cheese- North Carolina, October 2000-January. 2001. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 2001 50: 560-562.
46. Bonapace, C.R., White, R.L., Friedrich, L.V. and Bosso, J.A. 2000. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 38: 43-50.
47. Boor, K.J. 2001. ADSA foundation scholar award fluid dairy product quality and safety: looking to the future. *Journal of Dairy Science* 84: 1- 11.
48. Bouhdid, S., Abrimin, J., Zhiri, A., Espuny, M.J., Munresa, A. 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1558-1568.
49. Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri A., Espuny, M.J., Manresa A. 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1139-1149.
50. Boruki, M.K. Peppin, J.D., White, D., Loge, F., Cal, D.R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Apply Environmental Microbiology*. 68:7336-7342
51. Brady, A., Loughlin, R., Gilpin, D., Kearney, P., Tunney, M. 2006. In vitro activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of meticillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 55: 1375-1380.
52. Brenes, A., Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of actions. *Animal Feed Science and Technology* 158: 1-14.
53. Buchanan, R.L., Golden, M.H., Whiting, R.C., 1993. Differentiation of the effects of pH, and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* in-activation. *Journal of Food Protection* 56: 474-478.

54. Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. 1992. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 12: 235-246.
55. Büla, C.J, Bille, J., Glauser, M.P.1995. An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Diseases* 20: 66-72.
56. Burkey, J.L., Sauer, J.M., McQueen, C.A., Sipes, I.G. 2000. Citotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners—a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutation Research* 453: 25-33.
57. Burri, J., Graf, M., Lambelet, P., Löliger J. 1989. Vanillin: more than a flavoring agent—a potent antioxidant. *Journal of Science and Food Agriculture* 48: 49-56.
58. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential Applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
59. Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36:162-167.
60. Burt, S.A., Van der Zee, R., Koes, A.P., De Graaff, A.M., van Knapen, Gastra W., Haagsmam, H.P., Veldhuizen, E.J.A. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibit synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4484-4490.
61. Buzrul, S., Hami, A., Largeteau, A., Demazeau, G., 2008. Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk. *European Food Research and Technology* 227: 443-448.
62. Cabello, C.M., Bair, W.B., Lamore, S.D., Ley S., Bausse, A.S., Azimian, S., Wondrak, G.T. 2009. The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth. *Free Radical Biology and Medicine* 46: 220-231.
63. Cai, X. and Stiegert, W.K. 2013. Economic analysis of the US fluid milk industry. *Applied Economics Letters*, 20: 971-977.
64. Caillet, S., Millette, M., Turgis, M., Salmieri, S., Lacroix, M. 2006. Influence of antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging on radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* present in ready-to-use carrots (*Daucus carota*). *Journal of Food Protection* 69: 221-227.

65. Callaway, T.R., Carr, M.A., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Nisbet, D.J. 2009. Diet, *Escherichia coli* O 157:H7 and cattle: A review after 10 years. *Current Issues in Molecular Biology*. 11:67_80
66. Cameron, M., McMaster, L.D., Britz, T.J. 2009. Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science and Technology* 89: 83-98.
67. Caminiti, I.M., Noci, F., Muñoz, A., Whyte, P., Morgan, D.J., Cronin, S.A., Lyng, J.G. 2011. Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chemistry* 124: 1387-1392.
68. Campaniello, D., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. 2010. Antifungal activity of Eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* Species. *Journal of Food Protection* 6: 1124-1128.
69. Cano, J.H., Volpato, G. 2004. Herbal mixtures in the traditional medicine of eastern Cuba. *Journal of Ethnopharmacology* 90: 293-316.
70. Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. 1995. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios* 82: 181-185.
71. Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time- kill lysis leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 46: 1914-1920.
72. Cassella, S., Cassella, J.P., Smith, I. 2002. Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. *International Journal of Aromatherapy* 12: 2-14.
73. 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.
74. Cava-Roda, R.M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M.T., Marin-Iniesta, F. 2010. Antimicrobial activity of vanillin and mixtures with cinnamon and clove essential oils in controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food Bioprocess Technology* 6: 2120-2131.
75. CDCP. 2011. Trends in Foodborne Illness in the United States 1996-2010. 2011. <http://www.cdc.gov/foodborneburden/trends-in-foodborne-illness.html>
Published August 12, Ultimo acceso Enero 8, 2013.

76. CDCP. 2007. Centers for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated with Drinking Raw Milk-Washington and Oregon, November-December 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 56, 165-167. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwe/preview/mmwrhtml/mm5608a3.htm>. Ultimo acceso Noviembre 2010
77. CDCP. 2011. Estimates of Foodborne Illness in the United States. Disponible en :<http://www.cdc.gov/Features/dsFoodborneEstimates/> Ultimo acceso 11 Nov 2010.
78. CDCP.2011. Center for Disease Control and Prevention (CDC). National *Listeria* Surveillance Annual Summary. 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
79. CLSTI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Suceptibility Tests; Approved Standard-. Eleventh Edition CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
80. CLSTI (2013). Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing. Twenty-Third edition. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute
81. Cerruti, P., Alzamora, S.M., Vidales, S.L. 1996. Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry purée. *Journal of Food Science* 62:608–661.
82. Cerruti, P., and Alzamora, S.M. 1996. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *International Journal of Food Microbiology*, 29:379-386.
83. Cerruti,P., Alzamora, S.M., and Vidales, S.L. (1997). Vanillin as an antimicrobial for producing shelf-stable strawberry purée. *Journal of Food Science* 62: 608-661.
84. Ceylan, E., Fung, D.Y.C, Sabah, J.R. 2004 .Antimicrobial activity and synergistic. Effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Food Science* 69: 102-106.
85. Ceylan, E., Fung D.Y.C. 2004. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 21: 703-714.
86. Chacon, P.A., Buffo, R.A., Holley, R.A. 2006. Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. *International Journal of Food Microbiology* 107: 231-237.
87. Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T, Kahla-Nakbi A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove

- essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a Short Review. *Phytotherapy Research* 21: 501-506
88. Chand, S., Luzunzi, I., Veal, D.A., Williams, I.R., Karuso, P. 1994. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. *Journal of Antibiotics* 47: 1295-1304.
89. Chang, S.T., Chen, P.F., Chang, S.C. 2001. Antibacterial activity of leaves essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology* 77: 123–127.
90. Chapman, K.W., Boor, K.J. 2001. Acceptance of 2% Ultra-Pasteurized Milk by Consumers, 6 to 11 Years Old. *Journal of Dairy Science* 84: 951-954.
91. Char, C., Guerrero, S., Alzamora, S.M. 2005. Application of Weibull type distribution of resistances model to thermal resistance of *Listeria innocua* in vanillin containing orange juice. Proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 14–18 August 2005, Río de Janeiro, Brazil.
92. Char, C., Guerrero, S., Alzamora, S.M. 2009. Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control* 20: 67–74.
93. Char, C., Guerrero, S., Alzamora, S.M. 2010. Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange Juice. *Food and Bioprocess Technology* 3: 752-761.
94. Cheftel, J.C. 2011. Emerging risks related to food technology. En: Advances in food protection: focus on food safety and defense. Book series: NATO Science for peace and security series A-Chemistry and Biology, pp: 223-254.
95. Chen, H., Hoover, D.G. 2003. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4: 25-34.
96. Chung J, Kwon S.H., Shim S.T., Kyung, K.H. 2007. Synergistic anti-yeast activity of garlic oil and allyl-alcohol derived from allin in garlic. *Journal of Food Science* 72: 437-440.
97. Cilia, A., Alegría, A., de Ancos B., Sanchez-Moreno, C., Cano, M.P., Plaza, L., Lagarda, M.J., Barberá, R.2012. Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascórbico acid from milk-and soy-based fruit beverages: influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.60:7282-7290.

98. Cimanga, K., Apers, S., Bruyne, T., Miert, S.V., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J., Kambu, K., Tona, L. 2002. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Essential Oil Research* 14: 382-387.
99. Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology* 107: 506-513.
100. Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amatto, D., Speranza, B., Sinigaglia, M. 2009. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches. A review. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 225-241.
101. Corte, F.V., De Fabrizio, S.V., Salvatori, D.M., Alzamora, S.M. 2004. Survival of *Listeria Innocua* in apple juice as affected by vanillin or potassium sorbate. *Journal of Food Safety* 24: 1-15.
102. Cowan, M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
103. Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Bacteriology* 88: 170-175.
104. Davidson, P.M., Branen, A.L. 2005. Food antimicrobials - An introduction. In: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branene, A.L. (Eds). *Antimicrobial in Food*. CRC Press, Taylor and Francis Group ed., pp. 1-9.
105. Dairy Foods and DMI. 2005. Adding Value to Milk Through Innovation. [Http://www.Innovatewithdairy.com/SiteCollectionDocuments.DMIfinalr.pdf](http://www.Innovatewithdairy.com/SiteCollectionDocuments.DMIfinalr.pdf).
Último acceso: 17 mayo 2013.
106. Dalton, C. B, Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F, Graves, L.M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine* 336: 100-105.
107. Davidson, P.M. Parish, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43: 148-155.
108. Davis, C.G., Dong, D., Blayney, D., Yen, S.A. and Stillman, R.2012. U.S. Fluid Milk Demand: A Disaggregated Approach. *International Food and Agribusiness Management Review*, 15:25-50

109. Davison, P.M., Harrison, M.A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology* 56: 69-78.
110. De Azeredo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., de Oliveira, M.E.G., de Souza, E.L. 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinales* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44: 1541-1548.
111. De Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M. Neto, N.J.G., De Souza, E.L. 2010. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology* 137: 312-316.
112. Del Campo, J., Amitto, M.J., Nguyen-The, C. 2000. Antimicrobial effect of Rosemary extracts. *Journal of Food Protection* 63:1359-1368.
113. Demuner A.J., Barbosa, L.C.A., Magalhaes, C.G., Da Silva, C.J., Maltha, C.R.A., Pinheiro, A.L. 2011. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. *Molecules* 16, 1181-1191. doi:10.3390/molecules 16021181
114. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74: 101– 109.
115. Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P. 2005. Effect of pH on the Inhibition of *Listeria* spp. by Vanillin and Vanillic Acid. *Journal of Food Protection* 68: 1472-1476.
116. Demuner, A.J., Barbosa, J.C.A., Magalhães, C.G., Da Silva, C.J., Maltha, C.R.A., Pinheiro, A.L. 2011. Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. *Molecules* 16: 1181-1191.
117. Devi K.P., Nisa S.A., Sakthivel R., Pandian S.K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 107-115.
118. Devlieghere, F., Vermeulen, A., Deberverre, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21: 703-714.
119. Di Pascua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol,

- limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2745-2749.
120. Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D., Mauriello G. 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics* 10: 1040-1049.
121. Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4863-4870.
122. Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M. 1993. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie* 48: 301-304.
123. Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M. 1994 Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 69: 25-28
124. Dijoux, N., Guingand, Y., Bourgeois, C., Durand, S., Fromageuz, C., Combe, C., Ferret, P.J. 2006. Assesment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay in vitro. *Journal of Toxicology* 20: 480-489.
125. Ding, F.L., Yeb, Y.X., Ding, Y. 2011. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. *Agricultural Sciences in China* 10: 1482-1487.
126. Doyle, M.P. 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 12:289-301
127. Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents for plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316.
128. Dos Santos Eduardo, A.J. 2007. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés de seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis doctoral. <http://www.tdx.cat/handle/10803/5691>. Ultimo acceso 19 junio de 2013.
129. Du Toit, E.A. Rautenbach, M. (2000). A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods* 42: 159-165.
130. Duan, J., Zhao, Y. 2009. Antimicrobial efficiency of essential oil and freeze-thaw treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Ser. *Enteritidis* in strawberry juice. *Journal of Food Science* 74: 131-137.

131. Dufour, M., Simmonds, R.S. Bremer, P.J. 2003. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of natural antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology* 25: 249-258.
132. Edwin J.A., Veldhuizen, L., Creutzberg, T.O., Burt, S.A., Aagsman, H.P.H. 2007. Temperature and Binding to Food Components Inhibit the Antibacterial Activity of Carvacrol against *Listeria monocytogenes* in Steak Tartare. *Journal of Food Protection* 70: 2127–2132.
133. EFSA-ECDC. 2006. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal* 94: 1-288.
134. EFSA-ECDC. 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013 11: 1-250.
135. Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, Corbo, M.R. and Sinigaglia, M.2005. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *Journal of Food Protection*. 68:1664-1670
136. Fegan, N.,Vanderlinde P., Higgs, G., Desmarchelier, P.2004. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157:H7 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *Journal Dairy Science* 91:2561-2565
137. Filoche, S.K., Soma, K., Sissons, C.H. 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology* 20: 221-225
138. Fu, Y.,Zu, Y.,Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination.*Phytotherapy Research* 10:989-994
139. Edelson-Mammel, S.G., Whiting, R.C., Joseph, S.W., Buchanan, R.L., 2005. Effect of prior growth conditions on the thermal inactivation of 13 strains of *Listeria monocytogenes* in two heating menstrual. *Journal of Food Protection* 68, 168–172.
140. Escobar, D., Clark, S., Ganesan, V., Repiso, L., Waller, J., Hartel, F. 2010. High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition and texture of queso fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 94: 1201-1210.

141. Espié, E., Vaillant V., Mariani-Kurkdjian P., Grimont F., Martin-Schaller R., De Valk, H., Vernozy-Rozand, C. 2006. *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiology and Infection* 134: 143-146.
142. Ettayebi, K., El Yamani, J., Rossi-Hassani, B. 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183: 191-195
143. Evergetis, N., Mallouchos, E., Kalpoutzakis, A., Nychas, E., Haroutounian, G.J. 2006. Characterization of the essential oil volatiles of *Satureja thymba* and *Satureja parnassica*: Influence of harvesting time and antimicrobial activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 3139-3145.
144. Evrendilek, G.A. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yogurt drink, plain yogurt and salted (tuzlu) yogurt: effects of storage time, temperature, back groundflora and product characteristics. *International Journal of Dairy Technology* 60: 118-122.
145. Fakruddin, M.D, Mohammad, M.R., Mannan, B.S. 2011. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Bio.Sci.)* 40: 121-131.
146. Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M.A., Corbo, M.R. Sinigaglia, M. 2005. A Study on the Antimicrobial Activity of Thymol Intended as a Natural Preservative. *Journal of Food Protection* 68: 1664-1670.
147. Faleiro, M.L. 2011. The mode of antibacterial action of essential oils. En: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Mendez-Villas (ed) pp: 1143-1157.
148. Fani, M.M., Kohanteb, J. 2011. Inhibitory activity of *Cinnamon zeylanicum* and *Eucalyptus Globulus* oils on *Streptococcus Mutans*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida* species isolated from patients with oral infections. *Journal of Dentistry (Shiraz University)* 11:14-22.
149. FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series. 2002. Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/assessment/listeria/en>. Ultimo acceso 24 April 2008.
150. Farber, J.M., Daley, E., Coates, F., Emmons, D.B., Mckellar, R. 1992. Factors influencing survival of *Listeria monocytogenes* in milk in a high-temperature short time pasteurizer. *Journal of Food Protection* 55: 946-951.

151. Farber, J.M., Sanders, G.W., Speirs, J.I., D'Aoust, J.Y., Emmons, D.B., McKellar, R., 1988. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 7, 277–286.
152. Fei, L., Yi-cheng D., Xing-Qian, Y., Yu-Ting, D. 2011. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove Oil. *Agricultural Sciences in China* 10: 1482-1487.
153. Fei, L.V., Liang, H., Yuan, Q., Chunfang, L. 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International* 44: 3057-3064.
154. Feng, P., Weagant, S.D., Jinneman, K. 2011. BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli*. En: Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A. Disponible en: <http://www.fdagov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm> Último acceso: Julio, 2013
155. Feng, W., Zheng, X. 2007. Essential oils to control *Alternaria alternate* in vitro and in vivo. *Food Control* 18: 1126-1130.
156. Filoche, S.K., Soma, K., Sissons, C.H. 2002. Isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65: 1545-1560.
157. Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Narbad, A. 2003. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology* 86: 113-122.
158. Fitzgerald, D.J., Stratford, G., Jasson, M., Ueckert, J., Bos, A., Narbad, A. (2004a). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology* 97: 104-113.
159. Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Narbad, A. (2004b). The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices. *Journal of Food Protection* 67: 391-395.
160. Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J. and Narbad, A. 2005. Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 1769-1775.
161. Food and Drug Administration (FDA)/ Centro para Nutrición y la Seguridad Alimentaria (CFSAN) /Food Safety and Inspection Service (FSIS). 2003. Quantitative assesment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponible

- en:<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RiskSafetyAssesment/ucm.183966.htm>. Ultimo acceso, Julio 2013.
162. Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald K.L., Brondum, J., Hayes P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England Journal of Medicine* 312: 404-407.
163. Franz, C., Baser, K.H.C. and Windisch, W. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding-a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25: 327-340.
164. Fretz R., Sagel U., Ruppitsch W., Pietzka A.T., Stöger A., Huhulescu S., Heuberger S., Pichler J., Much P., Pfaff G., Stark K., Prager R., Flieger A., Feenstra O., Allerberger F. 2010. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009. *Eurosurveillance* 15:1-2.
165. Friedman, M., Henika, P.R. Mandrell, R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65: 1545-1560.
166. Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E. 2004. Antibacterial Activities of plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 6042-6048.
167. Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research* 21: 989-994.
168. Gandhi, M., Chikindas, M.L. 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 113: 1-15.
169. García-García, R., López-Malo, A., Palou, E. 2011. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science* 76: 95-100.
170. Gaulin, C., Ramsay, D., Ringuette, L., Ismaïl, J. 2003 First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. *Canada Communicable Disease Report* 29: 181-186.
171. Garedew, L., Berhanu, A., Mengesha, D. and Tsegay, G. 2012. Identification of gram-negative bacteria from critical control points of raw and pasteurized cow milk

- consumed at Gondar town and its suburbs, Ethiopia. *BMC Public Health*. 12:950-959
172. Gaysinsky, S., Taylor, T.M., Davidson, T.M., Michael, P.D, Barry D., Jochen, W. 2007. Antimicrobial efficacy of eugenol microemulsions in milk against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 11: 2631-2637.
173. Geeraerd A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F. 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102: 95-105.
174. Geeraerd, A.H, Valdramidis, V.P., Dewlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., Van Impe, J.F. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology* 91: 229-244.
175. Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73: 83-92
176. Gill, A.O. and Holley, R.A. 2003. Nature of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Lactobacillus sakei* inhibition by eugenol and lactate de sodium. Internal Association of Food Protection. New Orleans. PO156.*Abstract Book*.pp-156,113.
177. Gill, A.O., Holley, R.A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology* 108: 1-9
178. Gill, A.O., Holley, R.A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde againsts *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5750-5755.
179. Gill, A.O., Holley, R.A. 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology* 111: 170-174.
180. Guiller, L., Nazer, A.L. and Brissonnet, D.F.2007. Growth response of *Salmonella typhimurium* in the presence of natural and synthetic antimicrobials: estimation of MICs from three different models. *Journal of Food Protection*. 70:2243-2259
181. Goff, H.D., Griffiths, M.V. 2006. Mayor advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. *Journal of Dairy Science* 89: 1163-1173.

182. Goulet, V., deValk, H., Pierre, O., Stainer, F., Rocout, J., Vaillant, V., Jacquet, C., Desenclos, J.C. 2001. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerging Infectious Diseases* 7: 983-989.
183. Guillier, L., Nazer, A.L., Dubois-Brissonnet, F. 2007. Growth response of *Salmonella typhimurium* in the presence of natural and synthetic antimicrobials: estimation of MICs from three different models. *Journal of Food Protection* 70: 2248-2250.
184. Gupta, G. Garg, A.P., Uniyal, R.C. and Kumari, A. 2008. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. *African Journal of Microbiology Research* 2: 247-251.
185. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124: 91-97
186. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media efficacy, synergistic potential and interaction with food components. *Food Microbiology* 26: 142-150.
187. Hamedo, H.A. 2009. Monitoring of Antimicrobial Activity of Essential Oils Using Molecular Markers. *The Open Biotechnology Journal* 3:103-107.
188. Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal in Applied Microbiology* 86: 985-990
189. Hassani, M., Alvarez, I.A., Raso, J., Condon, S., Pagan, R., 2005. Comparing predicting models for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pH. *International Journal of Food Microbiology* 100, 213–222.
190. Hefnawy, Y., Moustafa, S., Marth, F.1993. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to selected spices. *Journal of Food Protection* 56:876-878
191. Hemaiswarya, S., Doble. M. 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16: 997-1005.
192. Hernández-Ochoa, L., Gonzales-Gonzales, A., Gutiérrez-Mendez, N., Muñoz-Castellanos, L.N., Quintero-Ramos, A. 2011. Study of the antibacterial activity of chitosan-based films prepared with different molecular weights including spices essential oils and functional extracts as antimicrobial agents. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10: 455-463.

193. Hili, P., Evans, C.S., Veness, R.G. 1997. Antimicrobial Action of Essential Oils: The Effect of Dimethylsulphoxide on the Activity of Cinnamon Oil. *Letters in Applied Microbiology* 24: 269-275.
194. Hocking, M. B. 1997. Vanillin: Synthetic Flavoring from Spent Sulphite Liquor. *Journal of Chemical Education* 74: 1055-1059.
195. Holley R.A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22: 273-292.
196. Holowachuk, A.A., Bal'a, F.A., Buddington, K.R. 2003. A kinetic microplate method for quantifying the antibacterial properties of biological fluids. *Journal of Microbiological Methods* 55: 441-446.
197. Honish, L., Predy, G., Hislop, N., Chui, L., Kowalewska-Grochowska K., Trottier, L., Kreplin, C., Zazulak, I. 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of the Public Health* 96: 182-184.
198. Horwath, G., Jambor, N., Vegh, A. 2010. Antimicrobial activity of essential oils: The possibilities of TLC-bioautography. *Flavours and Frangance Journal*. 25: 178-182.
199. Hough, G., Garitta, L., Sanchez, R. 2004. Determination of consumer acceptance limits to sensory defects using survival analysis. *Food Quality and Preference* 15: 729-734.
200. Hussein, S. and Sakuma, T. 2005. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Pre-and Postharvest Control Measures to Ensure Safety of Dairy Cattle Products. *Journal of Food Protection*. 68:199-207
201. Hsieh, P.Ch., Jeng-Leun, M., Huang, S. 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology* 18: 35-43.
202. Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J.M. 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* 62: 359-371.
203. Hussain, A., Brahmhatt, K., Priyani, A., Ahmed, M., Rizvi, T.A. Sharma, C. 2011. Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 26: 519-527.
204. Hussein, H.S., Sakuma, T. 2005. Invited review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science* 88: 450-465.

205. Hussein, H.S., Thran, B.H., Glimp, H.A. 2003. Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in sheep grazing an irrigated pasture or arid rangeland forages. *Experimental Biology and Medicine* 228: 358-364.
206. Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3: 1-24.
207. Abel, G., Reichling, J. 2009. Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris*-chemotype carvacrol. *Planta Medica* 75: 1-6.
208. Jakhetia, V., Patel, R., Khatri¹, P., Pahuja, N., Garg, S., Pandey¹, A. Sharma¹, S. 2010. Cinnamon: A Pharmacological Review. *Journal of Advanced Scientific Research* 1: 19-23.
209. Jayamane, S.V., Samarajeewa U. 2010. Evaluation of the resistance of pathogenic *Listeria monocytogenes* in milk and milk products in Sri Lanka. *Tropical Agriculture Research and Extension* 13: 73-80.
210. Jellin, J.M., Batz, F., Hitchens, K. 2000. Natural Medicines Comprehensive Database. Third Edition. Stockton, California: Therapeutic Research Faculty.
211. Karatzas, K.A., Bennik, M.H., 2002. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 183–189.
212. Karatzas, K.A., Wouters, J.A., Gahan, C.G., Hill, C., Abee, T., Bennik, M.H., 2003. The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Molecular Microbiology* 49, 1227–1238.
213. Jensen, C., Ethelberg, S., Gervelmeyer, A., Nielsen, E.M., Olsen, K.E.P., Molbak, K. 2006. First general outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Denmark. *Eurosurveillance* 11: 55-58.
214. Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S.P., Son, R., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K. 2010. *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*, 17: 1-11.
215. Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 626-631.

216. Kamatou, G., Vermaak, I. and Viljoen, A.M. Eugenol-from the remote Maluku Islands to the International Market Place :a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*. 17 : 6953-6981.
217. Kahlmeter, G., Brown, D.F.J., Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Moouton, J.W., Odenholt, I., Rodloff, A., Sossy, C-J, Steinbakk, M., soriano and Stetsiouk, O. 2006. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* .501-503
218. Keene, W.E., Hedberg, K., Herriott, D.E., Hancock, D.D, McKay, R.W., Barrett T.J., Fleming D.W. 1997. Prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *Journal of Infectious Diseases* 176: 815-818.
219. Kenedy, S.J. Beuchat, L.R. 2004. Survival, growth, and thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in products containing peanut and chocolate. *Journal of Food Protection* 67: 2205-2211.
220. Kessel, J.A.V., Karns, J.S., Lombard, J.E., Koprak, C.A. 2011. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and In-line filters from U.S. dairies. *Journal of Food Protection* 74: 759-768.
221. Khan, M.S.A., Zahin, M., Hasan,S., Hussain, F.M., Ahmad, I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters on Applied Microbiology* 49: 354-360.
222. Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C.I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2839-.
223. Kim, H.O., Park, S.W.,Park. H.D. 2004. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot. *Food Microbiology* 21: 105-110.
224. Kim, S.H., Hyun, S.H., Choung, S.Y. 2006. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology* 104: 119-123.
225. Kiskó, G., Roller, S. 2005. Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *Biomed Central Microbiology* 5: 36-44.

226. Knight, K.P., Mckellar R.C. 2007. The influence of cinnamon and clove essential oils on the D and z values of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 70: 2089-2094.
227. Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., Schoessler, K. 2011. Emerging Technologies in Food Processing. *Annual Review of Food Science and Technology* 2: 203-235.
228. Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., Wichmann-Schauer, H., Hof, H., Werber, D., Stark, K. 2010. Large Listeriosis Outbreak Linked to Cheese Made from Pasteurized Milk, Germany, 2006–2007. *Foodborne Pathogen Diseases* 7:1581-4.
229. Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7681-7685.
230. Kyung K.H. 2011. Antimicrobial properties of *Allium* species. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 142-147.
231. La Stora, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, E., Mauriello, G. 2011. Atomic force microscopy análisis shows surface structure changes in carvacrol treated bacterial cells. *Research in Microbiology* 162: 164-172.
232. Lambert, R.J.W. and Pearson, J. 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology* 88: 784-790.
233. Lambert, R.J.W. 2001. Advances in disinfection testing and modelling. *Journal of Applied Microbiology* 91: 351-363.
234. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91: 453-462.
235. Lambert, R.J.W. 2003. A model for the efficacy of combined inhibitors. *Journal of Applied Microbiology* 95: 734-743.
236. Latorre, A.A., Pradhan, A.K., Van Kessel, J.A., Karns, J.S., Boor, K.J., Rice, D.H., Mangione, K.J., Groh, Y.T., Schukken, Y.H. 2011. Quantitative risk assessment of listeriosis due to consumption of raw milk. *Journal of Food Protection* 74: 1268-1281.

237. Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., Li, C. 2011. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant Essentials oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. 44:3057-3064.
238. Leem, H.H., Kim, E.O., Seo, M.J., Choi, S.W. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition* 40: 1361-1370.
239. Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Journal of Food Microbiology* 55: 181-186.
240. Lewis, R.E., Diekema, D.J., Messer, S.A., Pfaller, M.A., Klepser, M.E. 2002. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49: 345-351.
241. Linnan, M.J., Mascola, L, Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine* 319: 823-8.
242. Liptakova, A., Siegfried, L., Rosocha, J., Podracka, L., Bogyiova, E., Kotulova, D. 2004. A family outbreak of haemolytic uraemic syndrome and haemorrhagic colitis caused by verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 from unpasteurised cow's milk in Slovakia. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 576-578.
243. Lopez, P., Sanchez, S.A., Batlle, R., Nerián, C. 2005. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 6939-6946.
244. Lopez-Malo Vigil, A., Palou, E., Alzamora, S.M. 2005. Naturally occurring compounds-plant sources. En: *Antimicrobials in Food*, 3rd edición. ed. Davidson, P.M., Sofos, J.N. and Branen, A.L., New York: CRC Press pp. 429-451.
245. Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M., Palou, E. 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* 99: 119-128.
246. Lopez-Malo, A., Alzamora, S.M., Argai, A. 1997. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. *Food Microbiology* 14: 117-124.

247. Lorenzen, P., Radecker, I., Einhoff, I.K., Hammer, P., Hartmann, W., Martin, D., Molkenstein J., Devrese, M. 2011. A survey of the quality of extended shelf life (ESL) milk in relation to HTST and UHT milk. *International Journal of Dairy Technology* 64: 167-178.
248. Lu, L., Hume, M.E., Pillai, S.D., 2004. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives. *Journal of Food Microbiology* 67:1457-1462
249. Lu, F., Ding, Y-C, Xing-gian, Y.E., Ding, Y-T. 2011. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. *Agricultural Sciences in China* 10: 1482-1487.
250. Liu, Y.Q., Zhang, Y.Z., Gao, P.J. 2004. Novel concentration-killing curve method for estimation of bactericidal potency of antibiotics in an in vitro dynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 3884-3891.
251. Mahaboob, A.S., Dhan, A.A., Musaddig, A.M., Ahmed, S.K., Polasa, H., Venkateswar, R., Habibullah, C.M., Sechi, L.A., Ahmed, N. 2005. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 4: 1-7.
252. Maisnier-Patin, S., Tatini, S.R., Richard, J., 1995. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in milk. *Le Lait* 75, 81–91.
253. Mahfuzul Hoque, M.H., Bari, M.L., V.K., Kawamoto, S. 2008. Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria, and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken meat with their essential oils. *Republic. National' Food Research Institute* 72: 9-21.
254. Mann, C.M., Markham, J.L. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 538-544.
255. Maralhas, A., Monteiro, A., Martins, C., Kranendonk, M., Laines, A., Rueff, J., Rodriguez, A.S. 2006. Genotoxicidad and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. *Mutagenesis* 21: 199-204.
256. Marcm, Y.L.E., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuauh. 2003. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 11: 219-237.

257. Marino, M., Bersani, C., Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67: 187-195.
258. Martin, M.L., Shipman, L.D., Wells, J.G., Potter, M.E., Hedberg, K., Wachsmuth, I.K., Tauxe, R.V., Davis, J.P., Arnoldi, J., Tilleli, J. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* 328: 1043.
259. Martin-Diana, A.B., Rico, D., Barat, J.M., Barry-Ryan, C. 2009. Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 590-600.
260. Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107: 180-
261. Matan, M. 2012. Antimicrobial activity of edible film incorporated with essential oils to preserve dried fish (*Decapterus maruadsi*). *International Food Research Journal* 19: 1733-1738.
262. Mattos de Oliveira, M.M, Brugnera, D.F., Do Nascimento, J.A., Batista, N.N., Piccoli, R.H. 2012. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *European Food Research and Technology* 234: 821-832.
263. Mejlholm, O., Dalgaard, P., 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* 34, 27-31.
264. Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N.S., Abrini, I., Zhiri, A., Baudous, D., Diallo, B., Jaziri, M.E., Idaomar, M. 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research* 629: 109-110.
265. MMWR. 2013. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food foodborne diseases active surveillance network, 10US. Sites, 1996-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 62: 283-287.
266. Molevar, V., Narasimham, P. 1992. Antibacterial activity of essential oils components. *International Journal of Food Microbiology* 16: 337-342.

267. Moon, K., Delaquis, P., Poivonen, T., Stanich, K. 2006. Effect of vanillin on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in a model apple juice medium and in apple juice. *Food Microbiology* 23: 169-174.
268. Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology* 38: 565-570.
269. Moreira, M., Ponce, A., Del Valle, C., Roura, S.(2007). Effect of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* O157:H7 in blanched spinach and minced cooked beef. *Journal of Food Processing and Preservation* 31:379-391
270. Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B., Majid, F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection* 111: 181-187.
271. Moritz, C.M.F., Rall, V.L.M., Saeki, M.J., Fernandes, A. 2012. Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. *Brazilian Journal of Microbiology* 43: 1147-1156.
272. Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, Martin-Belloso, O. 2008. Non thermal pasteurization of fruit juices by combining high intensity pulsed- electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science and Emerging Tecnologies* 9: 328-340.
273. Mourey, A., Canillac, N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils of conifers. *Food Control* 13: 289-292.
274. Muthuswamy, S., Rupasinghe, H.P.V, Stratton, G.W. 2008. Antimicrobial effect of cinnamon bark extract on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* and fresh-cut apple slices. *Journal of Food Safety* 28: 534-549.
275. Mytle, N., Anderson, G.L., Doyle, M.P., Smith, M.A. 2004. Antimicrobial activity of clove (*Syzgium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food control* 17: 102-107.
276. Nadine, Y., Patel, J., Miller, P., Martin, L.Y. 2010. Antimicrobial activity of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 in organic soil. *Food Control* 21: 1458-1465.
277. Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I., Michael, G. 1996. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Medica* 62: 275-277.

278. Nanasombat, S., Wimuttigol, P. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology* 20: 45-53.
279. Nataro, J., Kaper, J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 142-201.
280. NCCLS, 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14, NCCLS, Wayne, Pa. USA. Vol. 24 No. 1 pp. 1-159.
281. NCCLS. 1999. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline Vol. 19 No. 18 pp. 1-32.
282. Nguetack, J., Budde, B.B., Jakobsen, M. 2004. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Letters in Applied Microbiology* 94: 329-334.
283. Nielsen, S.B., Otzen, D.E. 2010. Impact of the antimicrobial peptide novicidin on membrane structure and integrity. *Journal of Colloid and Interface Science* 345: 248-256.
284. Noriega, L., Ibáñez, S., González, P., Yamamoto, M., Vial, P. 2008. *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología* 25: 342-349.
285. Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Bisignano, G. 2012. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:1029-38
286. Nuryastuti, T.H., Van der Mei, C.H., Busscher, S.J., Irvati, A.T., Krom, B.P. 2009. Effect of Cinnamon Oil on *icaA* Expression and Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6850-6855.
287. Nzeako, B.C., Al-Kharaqsi, Z.S.N., Al-Mahrooqi, Z. 2006. Antimicrobial activities of clove and thyme extracts. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 6:33-39.7
288. Obeidat, M., Shatnawi, M., Al-alawi, M., Al-Zu'bi, E., Al-Dmoor, H., Al-Qudah, M., Otri, I.J. 2012. Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves. *Research Journal of Microbiology* 7: 59-67.
289. Odds, F.C. 2003. Synergy, antagonism and what checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 1-3.

290. Olivier, S.P., Boor, K.J., Murphy, S.C., Murinda, E.S.: Review food safety hazard associated with consumption of raw milk. *Journal of Dairy Science*. 85:112-121.
291. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. 2012. Investigation of antibacterial activity cinnamon bark essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) in vitro antibacterial activity against five food spoilage bacteria. *Iranian Journal of Food Science and Technology* 9: 67-76.
292. Olivier, S.P., Boor, K.J., Murphy, S.C., Murinda, S.E. 2000. Food Safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogen Diseases* 6: 793-806.
293. Onawunmi, G.O. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology* 9: 105-108.
294. Ooi, L.S., Li Y., Kam, S.L., Wang, H., Wong, E.Y., Ooi, V.E. 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *American Journal of Chinese Medicine* 34: 511-22.
295. Oussalah, M, Caillet, S. Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 69: 1046-1055.
296. Oyedemi, S.O., Okoh, A.I., Mabinya, L.V., Pirochenva, G., Afolayan, A.J. 2009. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* 8: 1280-1286.
297. Packiyasothy, E.V., Kyle, S., 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia* 54: 384-387.
298. Paibon, W., Yimnoi, C.A., Tembalb, N., Boonlue, W., Jampachaisri, K., Nuengchamngong, N., Waranuch, N., Ingkaninan, K. 2011. Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. *International Journal of Cosmetic Science* 33: 150-156.
299. Pandey, P., Singh, P. 2011. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research* 1: 69-80.
300. Park, I.K., Lee, H.S., Lee, S.G., Park, J.D., Ahn, Y.J. 2000. Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus*

- (Coleoptera: Attelabi-dae). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 2528-2531.
301. Park, S.H., Sim, Y.B., Lee, J.K., Kim, S.M., Kang, Y.J., Jung, J.S., Suh, H.W. 2011. The analgesic effects and mechanisms of orally administered eugenol. *Archives of Pharmacology Research* 34: 501-507
302. Pauli, A., Kubeczka, K.H. 2010. Antimicrobial properties of volatile phenylpropanes. *Natural Products Communication* 5: 1387-1394.
303. Pearce, L.E., Truong, H.T., Crawford, R.A., Yates, G.F., Cavaignac, S., Lisle G.W.D. 2001. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis added to raw milk. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3964-3969.
304. Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cin-namaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science* 74: 379-383.
305. Peleg, M., Pechina, C.M., 2000. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40, 159–172
306. Pereira, R.N., Vicente, A.A. 2010. Novel Technologies for Milk Processing. Chapter 7. En: Engineering Aspects of Milk and Dairy Products. Ed. J.S.R. Coimbra y Teixeira, J.A pp. 155-174.
307. Pérez-Conesa, D., Cao, J., Mc Landsborough, C. L, Weiss, L. 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *Journal of Food Protection* 74: 55-62.
308. Pfaller, M.A., Sheehan, D.J., Rex, J.H. 2004. Determination of fungicidas activities against yeast and molds: “Lessons learned from bactericidal testing and the need for standarization”. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 268-280.
309. Pina-Perez, M.C., Silva-Angulo, A.B., Muguierza-Marquinez, B., Aliaga, D.R., López, A.M. 2009. Synergistic effect of High Hydrostatic Pressure and natural antimicrobials on inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a liquid whole egg and skim milk mixed beverage. *Foodborne Pathogens and Disease* 6: 649-656.
310. Pichersky, E., Noel, J.P. and Dudareva, N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles:nature’s diversity and ingenuity. *Science*, 311:808-811.
311. Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of

- Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 17: 15-19.
312. Pitt, W., Harden, T., Hull, R. 1999. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology* 54: 49-65.
313. Ponce, C.P.A., Buera, M.P., Ellizalde, B.E. 2010. Encapsulation of cinnamon and thyme essentials oils components (cinnamaldehyde and thymol) in B-cyclodextrin: Effect of interacions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering* 99: 70-75.
314. Prazak, M.A., Murano, E.A., Mercado, I., Acuff, G.R., 2002. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. *Journal of Food Protection* 65: 1796-1799.
315. Prasad, P., Pagan, R., Kauter, M. and Price, N. 2004. Eco-efficiency for the Dairy Processing Industry. Dairy Australia. Manual prepared by the UNEP working group for cleaner production in de food industry. Disponible en: http://dmsc.com.au/wp-content/uploads/2011/03/Eco-efficiency_manual.pdf. Último acceso: Julio, 203
316. Probst, I.S., Sforcin, J.M., Rall, V.L.M., Fernandes, A.A.H., Fernandes Júnior, A. 2011. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 17: 159-167.
317. Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J.M., Michel, G.M., Baccou, J.C., 1995. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.) evaluation of its bacterioatatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research* 7: 165-173.
318. Rahman, S., Parvez, A.K., Islam, R., Khan, M.H. 2011. Antibacterial activity of natural spices on multiple durg resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water, Bangradesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 10:10.
319. Rakchoy, S., Rakchoy, Suppakul, P. and Jinkarn, T. 2009 Antimicrobial effects of vanillin coated solution for coating paperboard intended for packaging bakery products *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2: 138-147.
320. Ramachandra, R.S, Ravishankar, G.A. 2000. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 289-304.

321. Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R. 2010. Mechanism of anti-fungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 54:5062–5069.
322. Rasooli, I. 2007. Food preservation-A biopreservative approach. Food Global science Books. 1:111-136.
323. Rattanachaikunsopon, P., and Phumkhachorn, P. 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110: 614-619.
324. Ravishankar, S., Jaroni, D., Zhu, L., Olsen, C., McHugh, T., Friedman, M. 2012. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ham and bologna using pectin-based apple, carrot, and hibiscus edible films containing carvacrol and cinnamaldehyde. *Journal of Food Science* 77: 377-382.
325. Raybaudi-Massilia, R.M., Rojas-Grau, M.A., Mosqueda-Melgar, J. 2008. Comparative study on essential oils incorporated into an alginate based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut fuji apples. *Journal of Food Protection* 71: 1150-1161.
326. Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine* 312: 404-407.
327. Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research* 5: 179-184.
328. Remmal, A., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Ettayebi, M. 1993. Inhibition of antibacterial activity of essential oils Tween 80 and ethanol in liquid medium. *Journal de Pharmacie de Belgique* 48: 352- 356.
329. Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K. y Remmal, A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research* 15: 356-362.
330. Rios, J.L. Recio, M.C., Villar, A. 1998. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 2-3: 127-149.
331. Richards, E. 2013. EU Dairy Markets, Situation and Outlook. Special reports produced for CLAL (Dairy Economic Consulting Firm). Disponible

- en:http://www.milkproduction.com/Global/PDFs/Rich_CLAL_%20EU_Outlook_Jan-Apr_2013.pdf. Ultimo acceso : Julio 2013
332. Roberts, J.A., Upton P.A., and Azene, G. 2000. *Escherichia coli* O157: H7; an economic assessment of an outbreak. *Journal of Public Health Medicine* 22: 99-107.
333. Rodriguez-Angeles, G.2002.Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública Mex.Cuernavaca. 44.Disponible en: :
: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342002000500011&Ing=es&tlng=pt.
334. Rohner E., Carabet A. Buchernauer H. 2004. Effectiveness of plant extracts of *Paeonia suffruticosa* and *Hedera helix* against diseases caused by *Phytophthora infestans* in tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten and Pflanzenschutz. Journal of Plant diseases and Protect* 111: 83-95.
335. Rupasinghe, H.P.V., Yu, L.J. 2012. Emerging Preservation Methods for Fruit Juices and Beverages.Chapter 4. En: *Food Additive*.Ed. Yehia El-Samragy, ISBN 978-953-51-0067-6
336. Rupasinghe, H.P.V., Boulter-Bitzer, J., Ahn, T., Odumeru, J.A. 2006. Vanillin inhibits pathogenic and spoilage microorganisms in vitro and aerobic microbial growth in fresh-cut apples. *Food Research International* 39: 575-580.
337. Rysstad, G., Kolstad. J. 2006. Extended shelf life milk - advances in technology. *International Journal of Dairy Technology* 59: 85-96.
338. Shaareff, A.A- 2011. Evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Cinnamomum* sp. and *Boswellia* sp. *Journal of Basrah Researches*.37:60-71
339. Salvat, A., Antonnacci, L., Fortunato, R.H., Suarez, E.Y., Godoy, H.M. 2001. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 32: 293-297.
340. Salvia-Trujillo, L., Morales de la Peña, Rojas-Grau, Martin-Belloso.2011. Microbial and enzimática stability of fruit juice-milk beverages treated by high intensity pulsed electric fields or heat during refrigerated storage. *Food Control*. 22:1639-1646
341. Santiesteban-Lopez, A., Palou, E., Lopez-Malo, A. 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. *Journal of Applied Microbiology* 102: 486-497.
342. Saraf, S., Mishra, M.S., Sharma, K. 2011. Antibacterial Activity of commercial and wild cinnamon species. *Journal of Phytochemistry* 3: 102-106.

343. Sauders, B.D., Pettit, D., Currie, B., Suits, P., Evans, A., Stellrecht, K., Dryja, D.M., Slate, D., Wiedmann, M. 2005. Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in human stool. *Journal of Food Protection* 68: 178-181.
344. Sellim, S. 2011. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157:H7 in Feta Soft Cheese and Minced Beef Meat. *Brazilian Journal of Microbiology*.42:187-196
345. Scallan, E., Hoekstra R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L. 2011. Foodborne illness acquired in the United States mayor pathogens. *Emerging and Infectious Diseases* 17: 7-15.
346. Scheltz, Z., Molnar J., Holmann, J. 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77: 279-285.
347. Schöbitz R., Marín, M., Horzella, M. 2001. Presencia de *L. monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro sur* 29: 114-119.
348. Senatore, F. 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1327-1332.
349. Senatore, F., Napolitano, F., Ozcan, M., 2000. Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 15: 186-189.
350. Senhaji, O.S., Faid M., Kalalou, I. 2007. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by essential oil from *Cinnamomum zeylanicum*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11: 234-236.
351. Shafer, H., Wink, M. 2009. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms of plants: Progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnolog. Journal* 4: 1684-1703.
352. Shah, B, Davidson, P.M., Zhong, Q. 2012. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity againts *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*.161:53-59
353. Shapiro, S., Guggenheim, B. 1995. The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 10: 241-246.
354. Shapiro, S., Meier, A., Guggenheim, B. 1994. The antimicrobial activity of essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 9: 202-208.

355. Shareef, A.A. 2011 Evaluation of antibacterial activity of essential oils of *Cinnamomum sp.* and *Boswellia sp.* *Journal of Basrah Researches* 37: 60-71.
356. Shaughnessy, D.T., Schaaper, R.M., Umbach, D.M. DeMarini. 2006. Inhibition of spontaneous mutagenesis by vanillin and cinnamaldehyde in *Escherichia coli*: Dependence on recombinational repair. *Mutation Research* 602: 54-64.
357. Shelz, A., Molnar, J., Hohmann, J. 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77: 279-285.
358. Si, W., Gong, J.R., Tsao, T., Zhou, H., Yu, C., Poppe, R., Johnson, Z. .2005. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 100: 296-305
359. Singh, A., Singh, R.K., Bhunia A.K., Singh, N. 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36: 787-794.
360. Skrinjar, M.M., Nemet, N.T.(2009). Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. *APTEF* 40: 1-220.DOI:2298/APT0940195S
361. Szlachta, K., Keller, S.E., Shazer, A., Chirtel, S., 2010. Thermal Resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in ultrafiltered milk as related to the effect of different milk component. *Journal of Food Protection* 73: 2010–2115.
362. Smith, K., Mittal, G.S., Griffith, M.W. 2002. Pasteurization of milk using Pulsed Electrical Field and Antimicrobials. *Journal of Food Science* 67: 2304-2308.
363. Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26: 118–122.
364. Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Neto, N.J.G., Oliveria, M.E.G., Souza, E.L. 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 44: 1541-1548.
365. Suhr, K.I., Nielsen, P.V. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 665-674.
366. Sukatta, U. Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, Dilokkunanant, W.U., Suppakul, P. 2008. Antifungal activity of clove and cinnamon oil and their synergistic against

- postharvest decay fungi of grape in vitro. *Kasetsart Journal Natural Science* 42: 169-174.
367. Suppakul, P., Jinkarn, T. 2009. Antimicrobial effects of vanillin coated solution for coating paperboard intended for packaging bakery products. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2: 138-147.
368. Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., Impe, J.F. 2004. Predictive modelling the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:137-159.
369. Szabo, I.A., Varga, G.Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., Molnar, J. 2010. Inhibition of Quorum-sensing signals by essential oils. *Phytotherapy Research* 24: 782-786.
370. Stumbo, C.R., 1973. *Thermobacteriology in Food Processing*. Academic Press, New York.
371. Tajkarimi, M.M., Ibrahim S.A., Cliver, DO 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21: 1199-1218.
372. Tamaki, Y, Narimatsu, H., Miyazato, T., Nakasone, N., Higa, N., Toma, C., Iwanaga, M. 2005. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 58: 65-69.
373. Tassou, C., Koutsoumanis, K., Nychas, G.J.E., 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International* 33: 273-280.
374. Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J. 2009. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5987-6000.
375. Toit, E.A. and Rautenbach, M. 2000. A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 42:159-165.
376. Tsao, R, Zhou, T. 2007. Natural antimicrobial from plant essential oils. En: *New Biocides development combined approach of chemistry and microbiology*. Book series. *Acs Symposium Series* Vol. 967 pp. 364-387.
377. Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., Krisch, J. 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth

- medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology* 144: 480-486.
378. Turgis, M., Borsa, J., Millette, M., Salmieri, S., Lacroix, M. 2008. Effect of selected plant essential oils or their constituents and modified atmosphere packaging on the radiosensitivity of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi* in ground beef. *Journal of Food Protection* 71: 516-521
379. Turgis, M., Han, J., Caillet, S., Lacroix, M. 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O 157:H7 y *Samonella typhi*. *Food Control* 26: 194-198.
380. Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A., 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry* 122: 101–113.
381. Tyler, V.E. 1999. Phytomedicines: back to the future. *Journal of Natarual Products* 62: 1589-1592.
382. Ultee, A., Kets E.P.W., Alberda, M. 2000. Adaptation of the food- borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174: 233-238.
383. Ultee, A.B., Beenik, M.H.J., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1561-1568.
384. Unlu, M., Ergene, E., Unlu, V., Zeytinoglu, H.S., Vural, N. 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essentials oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology* 48: 3274-3280.
385. Upton, P., Coia, J.E. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *The Lancet* 344: 1015.
386. USDA, 2013. Estimated Fluid Milk Products Sales Report.Agricultural Marketing Service.EFSM0003.
:http://http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5102996
. Ultimo acceso Junio 2013
387. Usta, J., Kreydiyyeh, S., Bajakian, K., Nakkash-Chmairie, H. 2002. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. *Food and Chemical Toxicology* 40: 935-940.
388. Utkun, S., Kunduhoglu, B. 2012. Combined effect of ultrasound and selected essential oil constituents on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* reduction in orange juice. *African Journal of Microbiology Research* 37: 6642-6652.

389. Waak, E., Tham, W., Danielsson-Tham, M.L., 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3366–3370
390. Valero, M., Salmeron, M.C. 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 85: 73-81.
391. Van Vuuren SF. The antimicrobial activity and essential oil composition of medicinal aromatic plants used in African traditional healing [PhD thesis]. South Africa: University of the Witwatersrand; 2007
392. Van Vuuren, S., Viijoen, A.M. 2008. In vitro experience of phytosinergy for plant combinatios of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 700-704.
393. Van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 74:139-159
394. Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey, P.M., Harbone, J.D. (eds). *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, pp: 47-69.
395. Vargas, A-P., and Bottia, E.J.S. 2008. Estudio de la composición química de los aceites de seis especies cultivadas en los municipios de Bolívar y el Penón_Santander, Colombia. Tesis Doctoral. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 2008
396. Vazquez, B.I., Fente, C., Franco, C.M., Vázquez, M.J., Cepeda, A. 2001. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology* 67: 157-163.
397. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egidio, J., Marín, S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 89: 145-154
398. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and transcinnamaldehyde. *Food Microbiology*, 28: 149-157.

399. Vijoen, A.M., Van Vuuren, S.F., Gwebu, L., Demirci, B., Baser, K.H.C. 2006. The geographical variation and antimicrobial activity of African Wormwood (*Artemisa afra* Jacq) essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 18: 19-25.
400. Vincent, H.W.S. 2003. Theory and application of microbiological assay. London: Academic Press (II nd) London: Academic Press.
401. Vuuren, S.V., Viljoen, A. 2011. Plant-Based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaccion between natural products. *Planta Medica* 77: 1168-1182.
402. Wallace, R.J., Oleszek, W., Franz, C., Hahn, I., Baser, K.H., Mathe, A., Teichmann, K. 2010 .Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. *British Poultry Science* 51: 461-487.
403. Wals, S.E., Maillard, J.Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 94: 240-247.
404. Warnke, P.H., Becker, S.T., Podschun, R., Sivananthan, S., Springer, N., Russo, P.A.J., Wiltfang, J., Fickenscher, H., Sherry, E. 2009. The battles against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 37: 392-397.
405. Wen, A.P.J., Delakis, P., Stanich, K. 2003. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology* 20: 305-311.
406. Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M., 1993. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection* 56: 410-413.
407. Wink, M. and Schimmer, O. 2010. Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. En: Funtions and biotechnology of plant secondary metabolites. 2nd edition. Edited by Michael Wink.p.cm-(Annual plant review;vol.39)
408. Xing, Y.G., Hong L.X., Qing L.X., Chong X. Sh., J.Y. 2011. Antimicrobial activitiy, cherry tomato, cinnamon oil, microencapsulation. *Advanced Materials Research* 236-238: 2307-2310.
409. Yen, T.B., Chang S.T. 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 99: 232-236.

-
410. 348.Yogalakshmi, B., Viswanathan, P., Anuradha, C.V. 2010. Investigation of anti-oxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 268: 204-212.
411. Yoshida, M., Muneyuki, E., Hisabori, T. 2001. ATP synthase a marvellous rotary engine of the cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 669-677.
412. Yuste, J., Fung, D.Y.C., Thompson, L.K., Crozier-Dodson, B.A. 2002. Combination of carbon dioxide and cinnamon to inactivate *E. coli* O157:H7 in apple juice. *Journal of Food Science* 67, 3087–3090.
413. Zabbia, A., Buys, E.M., Kocl, H.L. 2012. Undesirable sulphur and carbonyl flavor compounds in UHT milk: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 21-30.
414. Zhao, D.J., Source, Y. 2009. Antimicrobial efficiency of essential oil and freeze-thaw treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* ser. *enteritidis* in strawberry juice. *Journal of Food Science* 74: 131-137.
415. Zulueta, A., Esteve, M.J., Frasquet, I., Frígola, A. 2007. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry* 103:1365-1374
416. Zhou, S., Koh, H.L., Gao, Y., Gong, Z.Y., Lee, E.J. 2004. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Science* 74: 935-968.

