



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Aplicación Combinada de Sonicación y Aceites  
Esenciales en la Conservación de Zumos  
Naturales de Fruta

**Dña. Marta Sánchez Rubio  
2016**







**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Aplicación combinada de sonicación y aceites  
esenciales en la conservación de zumos naturales de fruta

**D<sup>a</sup> Marta Sánchez Rubio**

2016



Parte del contenido de esta tesis ha sido publicado como:

#### Artículos científicos

1. Guerrouj, K., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R.M., Marín-Iniesta, F. (2016) Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioproducts Processing*, 99, 20-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.03.007>. Editorial: Elsevier; ISSN: 0960-3085. Lugar de publicación: EEUU. JCR Impact Factor 2015: 2.687, (Q1, nº 23 de 123 en FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)
2. Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R.M., López-Gómez, A., Marín-Iniesta, F. (2016). Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. *LWT- Food Science and Technology*. 73, 140-146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.005> Editorial: Elsevier; ISSN: 0023-6438. Lugar de publicación: EEUU. JCR Impact Factor 2015: 2.711, (Q1, nº 22 de 123 en FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)
3. Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R.M., López-Molina, D., Marín-Iniesta, F. (2016). Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in culture broth and natural orange juice. *Journal Food Science and Technology*, Enviado a publicar: abril 2016. Editorial: Elsevier. ISSN: 0023-6438. Lugar de publicación: EEUU. JCR Impact Factor 2015: 1.504, (Q2 en FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY)
4. M. Sánchez-Rubio, A. Taboada-Rodríguez, M.E.A. Alnakip, M. Abouelnaga, F. Marín-Iniesta. Effect of thermosonication and cinnamon leaf essential oil on total phenols and anthocyanins content of natural pomegranate juice using response surface methodology. *Acta Horticulturae*, Volumen: Páginas: 1-8, Fecha: enviado a publicar. Editorial: International Society for Horticultural Science (ISHS). ISSN 0567-7572 print and ISSN 2406-6168 electronic. Lugar de publicación: Bélgica. Indexado por: Thomson Reuters Web of Science® ConferenceProceedingsCitationIndexSM (CPCI) de Thomson Reuters-JCR, ISI Web of Science, Researcher ID.

#### Capítulos de libro:

1. Marta Sánchez-Rubio, Amaury Taboada-Rodríguez, Rita María Cava-Roda, Kamal Guerrouj, Fulgencio Marín-Iniesta. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* in refrigerated fresh orange juice treated with cinnamon leaf essential oil and thermo-sonication. Editor: International Institute of Refrigeration. Libro: *Improving Quality of Life, Preserving the Earth*, 5255 páginas (7 volúmenes), Capítulo: 593, Páginas 1-5. Fecha: 2015. ISBN: 978-1-5108-1206-2. Printed by Curran Associates, Inc. Indexado por: Thomson Reuters Web of Science® ConferenceProceedingsCitationIndexSM (CPCI) de Thomson Reuters-JCR, ISI Web of Science, Researcher ID.
2. Marta Sánchez-Rubio, Amaury Taboada-Rodríguez, Fulgencio Marín-Iniesta. Efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* LM82 en zumo natural de manzana refrigerado. Libro: *Advances in Refrigeration Sciences and Technologies – VIII*. Editorial: SECYTEF y Univ. Coimbra. Editors: Adélio Manuel Rodrigues Gaspar y Celestino Rodrigues Ruivo. ISBN: 978-989-99080-4-8. Capítulo: 07.517, Páginas: 1-7.

## Comunicaciones a congresos

1. Combined use of thermosonication and cinnamon essential oil to inactive *Saccharomyces cerevisiae*. INNOVA 2013. Sexto Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos. Paradigmas en la Ciencia y Tecnología de Alimentos: una visión de futuro. 7/8/9 de octubre de 2013. Laboratorio Tecnológico del Uruguay. Montevideo, Uruguay.
2. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* in refrigerated fresh orange juice treated with cinnamon leaf essential oil and thermo-sonication. The 24th IIR International Congress of Refrigeration ICR2015 Improving Quality of Life, Preserving the Earth August 16 - 22, 2015, Yokohama, Japón.
3. Efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 5297 y *Listeria monocytogenes* LM82 en zumo natural de manzana refrigerado. CYTEF 2016 – VIII Congreso Ibérico | VI Congreso Iberoamericano de las Ciencias y Técnicas del Frío. Coimbra-Portugal, 3-6/ mayo/2016.
4. Effect of thermosonication and cinnamon leaf essential oil on total phenols and anthocyanins content of natural pomegranate juice using response surface methodology. VIII International Postharvest Symposium. Universidad Politécnica de Cartagena and International Society for Horticultural Science. Cartagena. Spain. 21-24 June, 2016

A mis padres, Conchi y Antonio, a los que les debo todo

A mis hermanos, Dora y Lorenzo





## **Agradecimientos**

Al Dr. Fulgencio Marín, por abrirme las puertas del laboratorio del grupo BTA y darme la oportunidad de seguir aprendiendo cada día y por tus consejos. Gracias por tu amabilidad y tu amistad.

Al Dr. Amaury Taboada, por todo. Por tu inestimable ayuda en el laboratorio, con los artículos, los proyectos y los informes, y con el procesamiento de los datos. Gracias por tu ayuda durante el desarrollo de la tesis. Pero sobre todo, por tu amistad y tu confianza.

A la Dra. Rita Cava, por tu amistad y por tu apoyo en los malos momentos durante todos estos años... y por las risas. Por tu ayuda con los proyectos y los artículos.

A la Dra. Dorotea López, por tu amistad, risas y confianzas. Por tu apoyo durante estos años y por tu ayuda con los proyectos y los artículos.

Al Dr. Sancho Bañón por sus ánimos durante los trámites finales de la tesis.

A Carmen Hernández Macanás y a Carmen Cárceles, por vuestra amistad y los momentos compartidos.

A la Dra. Isabel García, por tu compañerismo y por enseñarme todo lo que sé sobre los compuestos bioactivos.

Al Dr. Álvaro Sánchez, por tu sinceridad y tus consejos durante estos años.

A mi familia. Siempre os llevo en mi corazón.

A Pedro Esteve, gracias por tu ayuda y tus consejos.

A Raquel, por ayudarme con el formato de la tesis.

A mis amigas María, Elisa y Edurne, por estar a mi lado estos últimos años apoyándome y dándome ánimos en los malos momentos.



## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	xv
ÍNDICE DE TABLAS .....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xxi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Ultrasonido (US).....	1
1.1. Teoría y fundamentos del US .....	3
1.1. Clasificación de las aplicaciones del US.....	5
1.2. Las aplicaciones del US .....	6
1.2.1. Las aplicaciones del US de baja intensidad (US de diagnóstico).....	6
1.2.2. Las aplicaciones del US de alta intensidad (US de potencia).....	7
1.3. Mecanismo de acción del US de alta potencia: cavitación acústica .....	8
1.3.1. Clasificación de la cavitación acústica .....	11
1.3.2. Efectos de la cavitación acústica .....	12
1.4. Principios del US de alta potencia.....	13
1.5. Las aplicaciones del US en la tecnología de los alimentos .....	15
1.5.1. El US en la conservación de alimentos .....	16
1.6. Inactivación de microorganismos por US .....	18
1.6.1. Factores que afectan a la eficacia de la inactivación microbiana.....	18
1.6.2. Mejora de la inactivación microbiana .....	20
1.6.3. Microorganismos inactivados con US .....	21
2. Compuestos químicos orgánicos del metabolismo secundario vegetal .....	23
3. Definición de aceite esencial .....	26
3.1. Composición química de los AEs .....	27
3.2. Factores que afectan a la composición y actividad antimicrobiana/antioxidante de los AEs.....	28

3.3. Mecanismos de acción antimicrobiana de los AEs .....	30
3.4. Susceptibilidad de mohos, levaduras y bacterias Gram-negativas y Gram-positivas .....	35
3.4.1. Estructura y composición molecular de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> .....	35
3.4.2. Estructura y composición molecular de la pared y membrana celular de las bacterias .....	37
3.5. Los AEs como conservantes. Factores que afectan al efecto antibacteriano de los AEs o de sus componentes en los alimentos.....	41
JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL.....	45
OBJETIVOS.....	47
OBJETIVO GENERAL.....	47
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
RESUMEN .....	49
ABSTRACT .....	53
CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL EFECTO COMBINADO DE LA TERMOSONICACIÓN Y EL ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EN CALDO DE CULTIVO Y EN ZUMO NATURAL DE NARANJA .....	55
1.1. Justificación del estudio.....	55
1.2. Diseño experimental y metodología .....	57
1.2.1. Preparación de los inóculos.....	57
1.2.2. Preparación de las soluciones madre de aceite esencial de hoja de canela (AEC).....	57
1.2.3. Actividad antimicrobiana del AEC. Determinación de la CMI, de las CPIs y del %IC.....	57
1.2.4. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre <i>S. cerevisiae</i> .....	58

1.2.5. Ajuste de las curvas a los modelos “Shoulder+log-linear” y “Weibull” .....	59
1.2.6. Análisis estadístico.....	60
1.3. Resultados y discusión.....	61
1.3.1. Actividad antimicrobiana del AEC. Determinación de la CMI, de las CPIs y del %IC .....	61
1.3.2. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre <i>S. cerevisiae</i> .....	63
1.3.3. Ajuste de las curvas a los modelos “Shoulder+log-linear” y “Weibull” .....	68
CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> EN ZUMOS NATURALES DE NARANJA Y DE GRANADA POR COMBINACIÓN DE TERMOSONICACIÓN Y ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA .....	79
2.1. Justificación del estudio.....	79
2.2. Diseño experimental y metodología .....	80
2.2.1. Preparación de los zumos naturales de naranja (ZnN) y de granada (ZnG).....	80
2.2.2. Determinación del pH y de los °BRIX .....	81
2.2.3. Preparación de los zumos con AEC .....	81
2.2.4. Evaluación sensorial.....	81
2.2.5. Preparación de los inóculos de <i>S. cerevisiae</i> .....	82
2.2.6. Tratamientos de termosonicación con AEC en ZnN y en ZnG.....	82
2.2.7. Supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en ZnN y ZnG tratados durante su almacenamiento a 5°C .....	83
2.2.8. Análisis estadístico.....	84
2.3. Resultados y discusión.....	84
2.3.1. Evaluación sensorial.....	84

2.3.2. Tratamientos de termosonicación con AEC en ZnN y en ZnG.....	88
2.3.3. Supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en ZnN y ZnG tratados durante su almacenamiento a 5°C .....	95
<b>CAPÍTULO 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SONICACIÓN EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL ZUMO NATURAL DE NARANJA .....</b>	<b>99</b>
3.1. Justificación del estudio.....	99
3.2. Diseño experimental y metodología .....	100
3.2.1. Preparación del zumo de naranja .....	100
3.2.2. Tratamientos de sonicación.....	100
3.2.3. Análisis microbiológico .....	102
3.2.4. Determinación del contenido en compuestos bioactivos y de la actividad antioxidante .....	102
3.2.4.1. Determinación del contenido en fenoles totales (FT).....	102
3.2.4.2. Determinación del contenido en flavonoides totales (FvT).....	103
3.2.4.3. Determinación del contenido en carotenoides totales (CT).....	103
3.2.4.4. Determinación del contenido en ácido ascórbico (AA).....	103
3.2.4.5. Determinación de la actividad antioxidante. ....	104
3.2.5. Determinación del color, del pH y de los °Brix .....	105
3.2.6. Determinación del índice de pardeamiento no enzimático (IP) .....	105
3.2.7. Análisis sensorial.....	105
3.2.8. Estudio de vida útil.....	106
3.2.9. Análisis estadístico.....	106
3.3. Resultados y discusión.....	106
3.3.1. Análisis microbiológico .....	106
3.3.2. Determinación del contenido en compuestos bioactivos y de la actividad antioxidante .....	108

3.3.2.1. Determinación del contenido en FT .....	108
3.3.2.2. Determinación del contenido en FvT .....	109
3.3.2.3. Determinación del contenido en CT .....	110
3.3.2.4. Determinación del contenido en AA .....	110
3.3.2.5. Determinación de la actividad antioxidante .....	111
3.3.3. Determinación del pH, de los °Brix y del color .....	112
3.3.4. Determinación del IP.....	113
3.3.5. Análisis sensorial.....	114
3.3.6. Estudio de vida útil.....	115
CAPÍTULO 4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TERMOSONICACIÓN Y EL ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE ZUMOS NATURALES DE NARANJA Y DE GRANADA UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA. ....	119
4.1. Justificación del estudio.....	119
4.2. Diseño experimental y metodología .....	120
4.2.1. Preparación del ZnN y del ZnG. Preparación de las muestras con AEC.....	120
4.2.2. Diseño experimental. Modelo matemático simplificado.....	121
4.2.3. Tratamientos de termosonicación con AEC. Efecto sobre la microflora natural del ZnN y del ZnG .....	122
4.2.4. Determinación de los compuestos bioactivos y de la actividad antioxidante .....	122
4.2.4.1. Determinación del contenido en FT .....	122
4.2.4.2. Determinación del contenido en FvT .....	122
4.2.4.3. Determinación del contenido en CT en ZnN.....	123
4.2.4.4. Determinación del contenido en antocianinas monoméricas totales (AMT) en ZnG. Método del pH diferencial.....	123



4.2.4.5. Determinación de la actividad antioxidante .....	123
4.2.5. Determinación del pH, de los °Brix y del color .....	123
4.2.6. Estudio de estabilidad de los ZnN y ZnG conservados a 5°C .....	124
4.3. Resultados y discusión.....	124
4.3.1. Parámetros de calidad de los zumos naturales sin tratar .....	124
4.3.2. Ajuste al modelo matemático simplificado.....	125
4.3.3. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre la microflora natural del ZnN y del ZnG .....	129
4.3.4. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante .....	131
4.3.4.1. Determinación del contenido en FT .....	131
4.3.4.2. Determinación del contenido en FvT .....	135
4.3.4.3. Determinación del contenido en CT en ZnN.....	138
4.3.4.4. Determinación del contenido en AMT en ZnG.....	141
4.3.4.5. Determinación de la actividad antioxidante .....	146
4.3.5. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre el color, el pH y los °Brix.....	149
4.3.6. Estudio de estabilidad de los ZnN y ZnG conservados a 5°C.....	155
 CAPÍTULO 5. ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> <i>O157:H7 5297</i> Y <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> LM82 EN ZUMO NATURAL DE MANZANA TRATADO CON TERMOSONICACIÓN Y ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA.....	 165
5.1. Justificación del estudio.....	165
5.2. Diseño experimental y metodología .....	166
5.2.1. Microorganismos y preparación de los inóculos.....	166
5.2.2. Actividad antimicrobiana. Determinación de la CMI, de las CPIs y de la CMB .....	167

5.2.3. Preparación del zumo natural de manzana (ZnM). Preparación de la muestras con AEC.....	168
5.2.4. Determinación del pH y de los °Brix.....	168
5.2.5. Tratamientos de termosonicación con AEC en ZnM.....	168
5.2.6. Supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7 5297 y <i>L. monocytogenes</i> LM 82 en ZnM tratado durante su almacenamiento a 8°C.....	169
5.2.7. Análisis estadístico.....	169
5.3. Resultados y discusión.....	169
5.3.1. Actividad antimicrobiana. Determinación de la CMI, las CPIs y la CMB.....	169
5.3.2. Tratamientos de termosonicación en ZnM con AEC.....	179
5.3.3. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> LM82 y <i>E. coli</i> O157:H7 5297 en ZnM durante su almacenamiento a 8°C.....	189
CONCLUSIONES GENERALES .....	195
BIBLIOGRAFÍA .....	199
ANEXO: ARTÍCULOS.....	231



## ABREVIATURAS

AA: ácido ascórbico

AE: aceite esencial

AEs: aceites esenciales

AEC: aceite esencial de hoja de canela

AEL: aceite esencial de limón

AM: aerobios mesófilos

AMT: antocianinas monoméricas totales

AP: agua de peptona

Cf: cloranfenicol

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

CPI: concentración parcialmente inhibitoria

CT: carotenoides totales

DCPIP: 2,6-diclorofenol-indofenol

DO: densidad óptica

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

*E. coli* O157:H7 5297: *Escherichia coli* O157:H7 5297

FT: fenoles totales

FvT: flavonoides totales

GRAS: generalmente reconocido como seguro

IC: Intensidad de color

IP: índice de pardeamiento no enzimático

*L. monocytogenes* LM82: *Listeria monocytogenes* LM82

ML: mohos y levaduras

MS: manosonicación  
MSR: metodología de superficie de respuesta  
MTS: manotermosoniación  
PCA: Métodos Estándar Agar  
%Am: porcentaje de amarillo  
%Az: porcentaje de azul  
%IC: porcentaje de inhibición del crecimiento  
%Rj: porcentaje de rojo  
PM: peso molecular  
*S. cerevisiae: Saccharomyces cerevisiae*  
Strep: estreptomicina  
Tn: Tono  
TS: termosonicación  
TSB: caldo de soja triptona  
uma: unidad de masa atómica  
US: ultrasonido  
valor D: tiempo de reducción decimal  
ZM: zumo de manzana  
ZN: zumo natural  
ZNs: zumos naturales  
ZnG: zumo natural de granada  
ZnM: zumo natural de manzana  
ZnN: zumo natural de naranja  
ZN: zumo de naranja

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones del ultrasonido según la potencia de la onda ultrasónica.	6
Tabla 1.1. Concentración mínima inhibitoria, concentraciones parcialmente inhibitorias y porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en TSB a 25°C/24h.	62
Tabla 1.2. Tiempos de reducción decimal a 50°C para la inactivación de <i>S. cerevisiae</i> durante los tratamientos de termosonicación ( $D_{50/US}$ ) en TSB con y sin aceite esencial de hoja de canela.	70
Tabla 1.3. Parámetros para las curvas de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en TSB, a diferentes temperaturas, suplementado con aceite esencial de hoja de canela y sometido a sonicación.	71
Tabla 1.4. Parámetros para las curvas de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en zumo natural de naranja, a diferentes temperaturas, suplementado con aceite esencial de hoja de canela y sometido a tratamiento con US.	75
Tabla 2.1. Diseño experimental de los tratamientos en los zumos naturales.	83
Tabla 2.2. Evaluación sensorial del zumo natural de naranja (ZnN) y del zumo natural de granada (ZnG) con aceite esencial de hoja de canela (n=22).	86
Tabla 2.3. Tiempos de reducción decimal ( $D_{50}$ , minutos) de <i>S. cerevisiae</i> en ambos zumos.	90
Tabla 3.1. Diseño experimental y parámetros de los tratamientos de sonicación.	101
Tabla 3.2. Efecto de los tratamientos de sonicación en el contenido en fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides totales, actividad antioxidante y ácido ascórbico en el zumo natural de naranja.	109
Tabla 3.3. Efecto de la sonicación sobre el pH y los °BRIX en ZnN (n=3±ds).	112
Tabla 3.4. Efecto de la sonicación sobre los atributos de color en ZnN (n=3±ds).	113
Tabla 4.1. Diseño aleatorizado de 15 ejecuciones.	121
Tabla 4.2. Parámetros de calidad de los zumos naturales sin tratar.	125
Tabla 4.3. Población microbiana de los zumos sin tratar.	125

Tabla 4.4. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los parámetros de color del zumo natural de granada.	126
Tabla 4.5. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los parámetros de color del zumo natural de naranja.	127
Tabla 4.6. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los parámetros de calidad del zumo natural de naranja y del zumo natural de granada.	127
Tabla 4.7. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del zumo natural de naranja.	128
Tabla 4.8. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del zumo natural de granada.	128
Tabla 4.9. Efecto de los tratamientos de termosonicación sobre la microflora natural del zumo natural de naranja y del zumo natural de granada.	130
Tabla 4.10. Efecto de la termosonicación y del aceite esencial de hoja se canela sobre el contenido en fenoles totales de los zumos naturales de granada y de naranja.	132
Tabla 4.11. Efecto de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en flavonoides totales del los zumos naturales de granada y de naranja.	135
Tabla 4.12. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre el contenido en carotenoides totales del zumo natural de naranja.	138
Tabla 4.13 Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre el contenido en antocianinas monoméricas totales del zumo natural de granada.	141
Tabla 4.14. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre la actividad antioxidante de los zumos naturales de granada y de naranja.	146
Tabla 4.15. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre el pH de los zumos naturales de granada y de naranja.	149
Tabla 4.16. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre los °Brix de los zumos naturales de granada y de naranja.	150
Tabla 4.17. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre los parámetros de color de los zumos naturales de naranja y de granada.	154

Tabla 4.18. Parámetros de color de los zumos naturales sin tratar (Tiempo 0 y Tiempo 30 días a 5°C).	156
Tabla 4.19. Compuestos bioactivos de los zumos naturales sin tratar (Tiempo 0 y Tiempo 30 días a 5°C).	156
Tabla 4.20. Compuestos bioactivos del zumo natural de naranja tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).	157
Tabla 4.21. Compuestos bioactivos del zumo natural de granada tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).	159
Tabla 4.22. Parámetros de color del zumo natural de naranja tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).	162
Tabla 4.23. Parámetros de color del zumo natural de granada tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).	163
Tabla 5.1. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de <i>E. coli</i> O157:H7 5297 y <i>L. monocytogenes</i> LM82.	174
Tabla 5.2. Porcentajes de inhibición del crecimiento de las concentraciones inhibitorias y de las concentraciones parcialmente inhibitorias.	175





# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Onda mecánica longitudinal.	3
Figura 2. Intervalos de frecuencia de sonido (Tomado de Mason, 1998)	5
Figura 3. Relación generalizada de la tasa de flujo (L/h) frente la energía (kW) para varias aplicaciones ultrasónicas (Tomado de Patist y Bates, 2008).	8
Figura 4. Cavitación ultrasónica (Soria y Villamiel, 2010).	9
Figura 5. Generación de energía ultrasónica.	14
Figura 6. Metabolismo secundario vegetal (Kuklinski, 2000).	24
Figura 7. Lugares y mecanismos en la célula bacteriana Gram-negativa donde actuarían los componentes de los AEs (las bacterias Gram-positivas no tienen membrana externa) (Modificado de: Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009; Tongnuanchan y Benjakul, 2014).	32
Figura 8. Un modelo para la arquitectura molecular de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i> (Osumi, 1998; Smits y col., 2001).	37
Figura 9. Pared y membrana bacteriana.	38
Figura 1.1. Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en TSB con diferentes concentraciones de aceite esencial de hoja de canela (♦ 650 mg/L, ■ 320 mg/L, ▲ 160 mg/L, ● 80 mg/L, — control).	61
Figura 1.2. Reducciones logarítmicas de <i>S. cerevisiae</i> obtenidas por aplicación de tratamientos de termosonicación (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL; 30°, 40° y 50°C; 30 minutos) en TSB con aceite esencial de hoja de canela (□ 0 mg/L; □ 40 mg/L; □ 80 mg/L; □ 160 mg/L; ■ 320 mg/L; ■ 650 mg/L)	64
Figura 1.3. Efecto de la sonicación (24 kHz, 105 µm, 33,31 W/mL), la temperatura (50°C) y el aceite esencial de hoja de canela en la supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en zumo natural de naranja (pH: 3,97; °Brix: 11,6) (□ control; □ control+650mg/L; □ 50°C; □ 50°C+650mg/L; ■ 50°C+US; ■ 50°C+650mg/L+US).	65
Figura 1.4. Reducciones logarítmicas de <i>S. cerevisiae</i> obtenidas mediante tratamientos de sonicación (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL), temperatura (50°C) y aceite esencial de hoja de canela (0 y 650 mg/L) en TSB (■) y en zumo natural de naranja (□).	66

Figura 1.5. Ajuste del modelo Weibull al conjunto de datos de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> suspendida en TSB suplementado con aceite esencial de hoja de canela (◆ 650 mg/L, ▲ 320 mg/L, ■ 160 mg/L, ◇ 80 mg/L, Δ 40 mg/L, □ control) durante los tratamientos (a: 50°C 30 minutos. b: US+50°C 30 minutos).	74
Figura 1.6. Ajuste del modelo Weibull al conjunto de datos de supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> suspendida en zumo natural de naranja tratado con US y suplementado con aceite esencial de hoja de canela. (□control, Δ control 650mg/L, ◇50°C, ■50°C+650 mg/L, ▲50°C+US, ◆50°C+650 mg/L +US).	76
Figura 2.1. Evaluación sensorial del zumo natural de naranja (a) y del zumo natural de granada (b) con aceite esencial de hoja de canela (◆0 mg/L; ■20 mg/L; ▲40 mg/L; ◇80 mg/L).	87
Figura 2.2. Supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> en zumo natural de naranja (a) y en zumo natural de granada (b) sin y con aceite esencial de hoja de canela y tratados con termosonicación (◆ control; ■ S1: 50°C; ▲ S2: 50°C+20 mg/L; □ S3: 50°C+US; Δ S4: 50°C+20 mg/L+US).	89
Figura 2.3. Evolución de células de <i>S. cerevisiae</i> en zumo natural de naranja (a) y en zumo natural de granada (b) tratados y conservados en refrigeración (28 días, 5°C) (◆control; ■S1: 50°C; ▲S2: 50°C+20 mg/L; □S3: 50°C+US; ΔS4: 50°C+20 mg/L+US).	96
Figura 3.1. Efecto de la sonicación en la supervivencia de los microorganismos en el zumo natural de naranja (◆ aerobios mesófilos; ■ mohos y levaduras; ▲ temperatura).	107
Figura 3.2. (a): Índice de pardeamiento del zumo natural de naranja durante los tratamientos de sonicación y evolución del IP de las muestras almacenadas a 5°C durante 28 días (■ T0; ■ T15; □ T28 días) (b): Porcentaje de incremento del IP (◆control; ■ 1min; ▲ 10 min; ◇ 20 min; □ 30 min)	114
Figura 3.3. Evaluación sensorial del zumo natural de naranja tratado por sonicación (◆ control, ■1 min, ▲10 min, ◇20 min, □30 min).	115
Figura 3.4. Supervivencia de aerobios mesófilos totales (a) y de mohos y levaduras (b) durante el almacenamiento refrigerado (5°C) (■control;■1 min; ■10 min; ■20 min; ■30 min).	117
Figura 4.1. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en fenoles totales. A: zumo granada. B: zumo naranja. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg Eq ág. gálico/100 mL. ■ 50-70; ■ 70-90; □ 90-110; □ 110-130; ■ 130-150; ■ 150-170; ■ 170-190; □ 190-210.	134
Figura 4.2. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el	137

contenido en flavonoides totales. A: zumo granada. B: zumo naranja. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg Eq catq/100 mL. ■ 0-5; ■ 5-10; □ 10-15; □ 15-20; ■ 20-25; ■ 25-30; ■ 30-35.

Figura 4.3. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en carotenoides totales en zumo natural de naranja. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg/100 mL. ■ 0,2-0,4; ■ 0,4-0,6; □ 0,6-0,8. 140

Figura 4.4. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en antocianinas monoméricas totales del zumo natural de granada. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg cianidina-3-glucósido/100 mL. ■ 0-1; ■ 1-2; □ 2-3; □ 3-4; ■ 4-5; ■ 5-6; ■ 6-7; □ 7-8. 145

Figura 4.5. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre la actividad antioxidantes. A: zumo natural de granada B: zumo natural de naranja. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. % Inhibición. ■ 10-20; ■ 20-30; □ 30-40; □ 40-50; ■ 50-60. 148

Figura 4.6. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en fenoles totales del zumo natural de naranja al final del almacenamiento refrigerado. 0% amplitud. mg Eq. Ác. Gálico/100 mL. ■ 50-70; ■ 70-90. 158

Figura 4.7. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en fenoles totales del zumo natural de granada al final del almacenamiento refrigerado. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg Eq. Ác. Gálico/100 mL. ■ 0-20; ■ 20-40; □ 40-60; □ 60-80; ■ 80-100; ■ 100-120; ■ 120-140; □ 140-160. 160

Figura 4.8. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en antocianinas monoméricas totales del zumo natural de granada al final del almacenamiento refrigerado. 0% amplitud. mg cianidina-3-glucósido/100 mL. ■ 0-1; ■ 1-2; □ 2-3; □ 3-4; ■ 4-5; ■ 5-6; ■ 6-7; □ 7-8. 161

Figura 5.1. Crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (a) y *L. monocytogenes* LM82 (b) en TSB suplementado con aceite esencial de hoja de canela. (▲ 2.631 mg/L, ● 1.316 mg/L, ◇ 658 mg/L, △ 329 mg/L, — control). 171

Figura 5.2. Crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (a) y *L. monocytogenes* LM82 (b) en TSB suplementado con aceite esencial de limón. (◆ 8.500 mg/L; ■ 4.250 mg/L; ▲ 2.125 mg/L, ● 1.063 mg/L, ◇ 531 mg/L, Δ 266 mg/L, — control). 172

Figura 5.3. Crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (a) y *L. monocytogenes* LM82 (b) en TSB suplementado con limoneno (◆ 8.500 mg/L; ■ 4.250 mg/L; ▲ 2.125 mg/L, ● 1.063 mg/L, ◇ 531 mg/L, Δ 266 mg/L, — control). 173

Figura 5.4. Inactivación de *L. monocytogenes* LM82 (a) y *E. coli* O157:H7 5297 (b) en zumo natural de manzana (– control; ■ 20 mg/L; ▲ 40°C; ◆ 40°C+20 mg/L, □ 40°C+US; Δ 40°C+20 mg/L +US). 181

Figura 5.5. Reducciones logarítmicas de *L. monocytogenes* LM82 (□) y *E. coli* O157:H7 5297 (■) en zumo natural de manzana. 182

Figura 5.6. Supervivencia de *L. monocytogenes* LM82 (a) y *E. coli* O157:H7 5297 (b) en zumo natural de manzana durante su almacenamiento a 8°C (29 días) (– control; ■ 20 mg/L; ▲ 40°C; ◆ 40°C+20 mg/L, □ 40°C+US; Δ 40°C+20 mg/L +US). Todos los tratamientos duraron 5 minutos. 191

# INTRODUCCIÓN

## 1. Ultrasonido (US)

El proceso más utilizado en la conservación de alimentos se basa en la aplicación de temperaturas elevadas durante un determinado periodo de tiempo (pasterización y esterilización). La eficacia del tratamiento térmico depende tanto de la temperatura como del tiempo de aplicación del mismo. En la mayoría de los casos, el conocimiento que se tiene sobre las variables y controles del proceso proviene de la investigación empírica del efecto de la temperatura y del tiempo de exposición sobre la cinética de supervivencia microbiana, pero sin que se haya tenido en cuenta los efectos que tienen los tratamientos térmicos sobre la calidad nutricional y la estructura de los alimentos (Dolatowski y col., 2007; Kuldiloke, 2002).

El tratamiento térmico a altas temperaturas destruye a los microorganismos vegetativos y a la mayoría de las esporas, afectando a sus componentes celulares y a sus estructuras biológicas. Sin embargo, la intensidad del tratamiento, el tiempo y la temperatura empleados es proporcional a la cantidad de pérdida de nutrientes, al desarrollo de sabores indeseables, al deterioro de las propiedades funcionales de los alimentos (Dolatowski y col., 2007), a los efectos negativos causados por la deformación de las estructuras de plantas y animales, a la modificación de macromoléculas y a la producción de nuevas sustancias a partir de reacciones catalizadas por el calor (Dolatowski y col., 2007; Kuldiloke, 2002).

Actualmente existe un gran interés industrial en el desarrollo de tratamientos mínimos de conservación, que podrían reemplazar a los métodos que emplean calor intenso. Estos tratamientos mínimos, destinados al control microbiano, no afectarían negativamente a los atributos de calidad, como son sabor, olor, color, textura y valor nutricional, además no necesitarían usar aditivos o los usarían a muy baja concentración. Los tratamientos mínimos se aplicarían a productos de vida útil corta, como frutas y hortalizas frescas, zumos, alimentos refrigerados y platos preparados estables, tales como carnes y verduras cocidas.

El tratamiento ultrasónico es una de estas tecnologías emergentes que podrían ser una alternativa al tratamiento térmico intenso. Los efectos beneficiosos del uso del

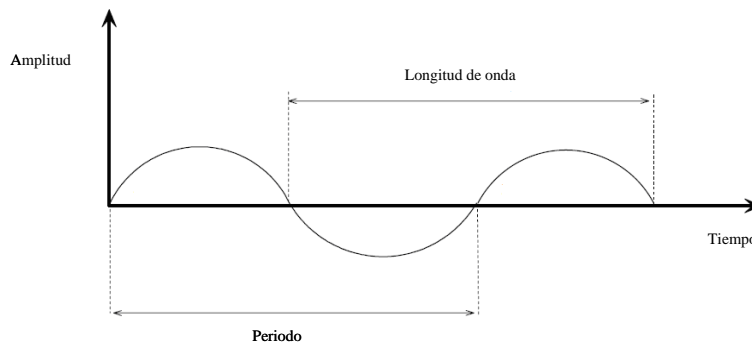
US se deben a sus efectos químicos, mecánicos o físicos en el proceso o en el producto (Kuldiloke, 2002). El mecanismo de acción del US se atribuye a varias acciones mecánicas y químicas causadas por la cavitación, que incluyen puntos localizados calientes, formación de ondas de choque, microcorrientes y chorros de líquido, así como la producción de especies químicas que también tienen un impacto en la cinética del proceso y en los atributos de calidad de los alimentos (Feng y col. 2008). Estos mecanismos de acción permiten emplear la capacidad del US de dañar las células para los nuevos tratamientos combinados de conservación, que permitirán además reducir la pérdida de calidad sensorial y nutricional de los alimentos causada por los tratamientos térmicos tradicionales (Kuldiloke, 2002).

El US se refiere a ondas de sonido cuya frecuencia es igual o superior a 20 kHz (Piyasena y col., 2003), y dentro del intervalo de frecuencia de 20 a 100 kHz tiene la capacidad de causar la cavitación, fenómeno que se describe como rápida creación, crecimiento y ruptura abrupta de burbujas, que producen temperaturas (hasta 5.500°C) y presiones (hasta 5 MPa) localizadas extremadamente altas, que alteran las estructuras celulares y causan finalmente la muerte microbiana. La energía liberada por la cavitación depende de la tensión superficial; por lo tanto, los alimentos con alta tensión superficial, como los zumos de frutas, son excelentes candidatos para ser procesados por la tecnología ultrasónica (Chandrapala y col., 2012; Chemat y col., 2011; Mason, 1998; Mason y col., 1996; Piyasena y col., 2003; Soria y Villamiel, 2010). Se ha sugerido que el US podría ser más eficaz en la inactivación de los microorganismos cuando se utiliza en combinación con otros factores de estrés en un enfoque multifactorial, tales como calor moderado, valores de pH extremos, cloración y/o adición de conservantes (Guerrero y col., 2001a; McClements, 1995). También han sido investigados los efectos combinados del US y la temperatura (termosonicación, TS), la presión (manosonicación, MS) y la temperatura con presión (manotermosonicación, MTS) (Guerrero y col., 2001a; García y col., 1989; Lee y col., 2009; Raso y col., 1998a; 1998b). Específicamente, la sensibilidad de las células microbianas a la acción del US en combinación con temperaturas moderadas, la adición de conservantes (sintéticos y/o naturales) y el control de pH han sido ensayados (Bevilacqua y col., 2013; Bevilacqua y col., 2014; Gastélum y col., 2012; López-Malo y col., 2005a, 2005b). Los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que la resistencia de las diferentes especies microbianas al US difiere ampliamente, en particular, los microorganismos esporulados

son mucho más resistentes que los hongos y éstos son más resistentes en general que las bacterias vegetativas (Guerrero y col., 2001a).

### 1.1. Teoría y fundamentos del US

En general, las ondas se clasifican en cuatro categorías diferentes (ondas longitudinales/de compresión, ondas transversales/*shear waves*, ondas de superficie/de Rayleigh y ondas placa/de Lamb) en función del modo de vibración de la partícula en el medio, con respecto a la dirección de propagación de las ondas iniciales (Wu y col., 2013). El sonido es una onda mecánica longitudinal (Figura 1) que se propaga a través de la mayoría de los materiales (aire, agua) ejerciendo un movimiento armónico (alrededor de una posición de equilibrio) a sus moléculas.



**Figura 1. Onda mecánica longitudinal**

Los parámetros que caracterizan a las ondas sonoras son (García Pérez, 2007):

Velocidad acústica ( $c$ , m/s): es la velocidad de propagación de la onda, que depende del material donde se propaga, y puede verse afectada por variables ambientales como la temperatura y presión.

Longitud de onda ( $\lambda$ , en m o cm): es la distancia entre dos planos en los que las partículas se encuentran en el mismo estado de vibración. Se determina a partir de la velocidad de la onda y la frecuencia.

Frecuencia ( $f$ , Hz): es el número de vibraciones o ciclos completados por la onda en una unidad de tiempo. Al inverso de la frecuencia se le denomina periodo y se define como el tiempo necesario para que la onda realice un ciclo.



Amplitud de onda (A, m): es el máximo desplazamiento de la partícula desde la posición de equilibrio. Cuanto mayor sea este valor mas fuerte será la sensación del sonido percibido.

Presión acústica (PA, N/m<sup>2</sup>): es la presión existente en las diversas zonas del material. Esta presión será mayor que la normal en las zonas de contracción de partículas y menor en las zonas dilatadas, por lo que la presión acústica es alterna. La desviación máxima en relación a la normal se denomina amplitud de la presión acústica y está relacionada con la amplitud de oscilación de la onda.

Intensidad acústica (I, W/m<sup>2</sup>): es la energía media transmitida a través de la unidad de área perpendicular a la dirección de propagación de la onda por unidad de tiempo. La intensidad acústica es proporcional al cuadrado de presión acústica máxima.

Densidad de energía (E, J/m<sup>3</sup>): Al propagarse una onda, se transmite energía que puede ser disipada en forma de calor debido al trabajo realizado al desplazar las partículas en un medio sujeto a fuerzas contrarias al desplazamiento de las mismas. La densidad de energía puede expresarse como el cociente entre la intensidad acústica y la velocidad de propagación de la onda.

Potencia acústica (P, W): es la energía total irradiada por la fuente ultrasónica por unidad de tiempo. Se puede calcular a partir de la intensidad acústica y del área de la superficie radiante.

Atenuación: En la propagación de la onda por un medio, la intensidad de la onda disminuye al aumentar la distancia a la fuente que la produce. La atenuación puede ser consecuencia de la reflexión, la dispersión o la difracción de la onda durante su propagación, o como consecuencia de la conversión de parte de la energía cinética de la onda en calor. La atenuación es más importante conforme aumenta la frecuencia de la onda.

La clasificación del sonido en función de la frecuencia (Figura 2) de la onda de sonido sería:

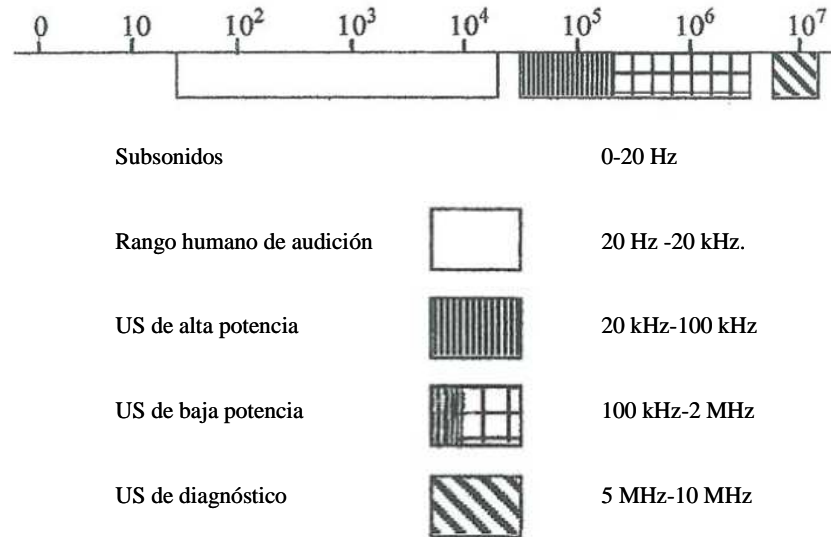
Subsonidos: frecuencia entre 0-20 Hz

Rango humano de audición: frecuencia entre 20 Hz-20 kHz.

US de alta potencia: frecuencia entre 20 kHz y 100 kHz

US de baja potencia: frecuencia comprendida entre 100 kHz y 2 MHz

US de diagnóstico: frecuencia entre 5 MHz y 10 MHz.



**Figura 2. Intervalos de frecuencia de sonido (Tomado de Mason, 1998)**

El término “ultrasonido” designa aquellas ondas sonoras con una frecuencia superior a 20 kHz (Figura 2), la máxima que el oído humano es capaz de percibir (Dolatowski y col., 2007). Las ondas ultrasónicas tienen todas las propiedades características de las ondas mecánicas longitudinales sonoras.

### 1.1. Clasificación de las aplicaciones del US

Para la clasificación de las aplicaciones del US (Tabla 1), el criterio más importante es la cantidad de energía del campo de sonido generado, caracterizado por la potencia acústica (W), la intensidad del sonido ( $W/m^2$ ) o la densidad de energía del sonido ( $W/m^3$ ) (Dolatowski y col., 2007). Basado en el rango de frecuencia, las aplicaciones del US en la industria alimentaria se pueden dividir en baja y alta energía.

**Tabla 1. Aplicaciones del ultrasonido según la potencia de la onda ultrasónica.**

	<b>Frecuencia</b>	<b>Potencia</b>	<b>Aplicaciones</b>
Baja energía Baja potencia	> 100 kHz (alta)	< 1 W/cm <sup>2</sup> (baja)	Ensayos de materiales, diagnóstico médico
Alta energía Alta potencia	< 100 kHz (baja)	>1 W/cm <sup>2</sup> (alta)	Desintegración celular, homogeneización

Las aplicaciones del US de baja energía (baja potencia, baja intensidad, alta frecuencia, US de diagnóstico) implican el uso de frecuencias mayores de 100 kHz (2–20MHz) a intensidades por debajo de 1 W/cm<sup>2</sup> (0,1–1 W/cm<sup>2</sup>). Sin embargo, el US de alta energía (alta potencia, alta intensidad, baja frecuencia, US de potencia) utiliza intensidades superiores a 1 W/cm<sup>2</sup> (10-1.000 W/cm<sup>2</sup>) a frecuencias entre 20 y100 kHz (Awad y col., 2012; Feng y col., 2008; Kuldiloke, 2002; Mason y col., 1996; McClements, 1995; Tiwari y Mason, 2012; Wu y col., 2013).

## **1.2. Las aplicaciones del US**

La diferencia principal entre las aplicaciones del US de baja y alta intensidad es el nivel de potencia utilizado. El diseño de los transductores ultrasónicos utilizados para generar ondas ultrasónicas de alta intensidad suele ser muy diferente de la de los que se utilizan para las aplicaciones del ultrasonido de baja intensidad (McClements, 1995).

### **1.2.1. Las aplicaciones del US de baja intensidad (US de diagnóstico)**

A bajas intensidades (baja potencia, baja energía, alta frecuencia), los valores de potencia son tan pequeños que la onda ultrasónica no causa alteraciones físicas o químicas en las propiedades del material a través del cual pasa la onda, es decir, no es destructivo (McClements, 1995; Feng y col., 2008).

El US de baja intensidad se utiliza para el análisis no invasivo y el seguimiento de los diversos materiales alimenticios durante el procesamiento y almacenamiento para garantizar la calidad y seguridad (Awad y col., 2012; Feng y col., 2008). El US tiene ventajas sobre otras técnicas analíticas tradicionales porque las mediciones son rápidas, no destructivas, precisas, totalmente automatizadas y pueden llevarse a cabo tanto en un laboratorio como en línea (Dolatowski y col. 2007).

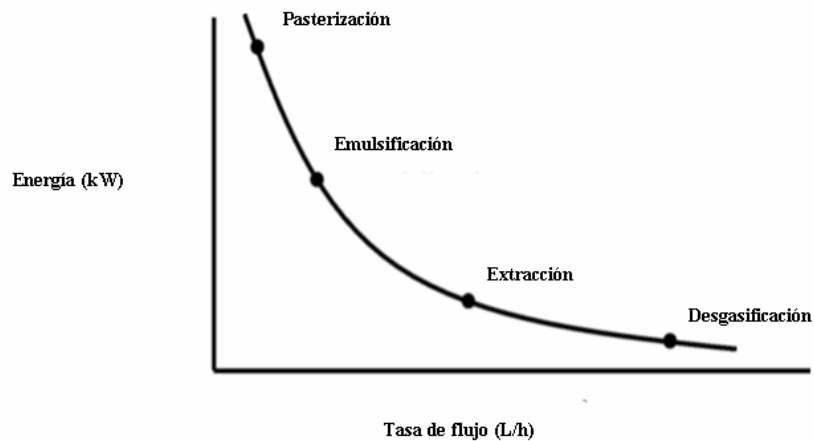
Aplicado como técnica analítica, el US de baja intensidad proporciona información sobre las propiedades físico-químicas de los alimentos, como son la composición, la estructura, el estado físico y la velocidad de flujo (Dolatowski y col., 2007; McClements, 1995). También se utiliza para el control de calidad de verduras frescas y frutas, tanto en pre- y post- cosecha, del queso durante el procesamiento, de los aceites de cocina comerciales, del pan, de los cereales y de los productos alimenticios a base de grasa emulsionada, así como de los geles alimenticios y los alimentos congelados. Otras aplicaciones incluyen la detección de la adulteración de la miel y la evaluación del estado de agregación, del tamaño y del tipo de proteína (Awad y col., 2012).

#### 1.2.2. Las aplicaciones del US de alta intensidad (US de potencia)

El US de alta intensidad (alta potencia, alta energía, baja frecuencia) es destructivo. Los efectos que produce sobre las propiedades físicas, mecánicas o químicas/bioquímicas de los alimentos son inducidos por la generación de intensos gradientes de presión, de cizallamientos y de altas temperaturas en el medio en el que se propagan las ondas ultrasónicas (Dolatowski y col. 2007; McClements, 1995). Estos efectos del US se utilizan para modificar las propiedades fisicoquímicas y mejorar la calidad de los alimentos durante su procesamiento (Awad y col., 2012; Mason y col., 2011).

El US de alta intensidad se puede aplicar usando baños de sonicación o sondas ultrasónicas de inmersión de diferentes longitudes, diámetros y geometrías de la punta en función de las aplicaciones (Awad y col., 2012).

Hay un gran número de posibles aplicaciones del US de alta intensidad en la industria alimentaria. Entre ellas destaca la ruptura celular, la desgasificación de líquidos, la limpieza, la homogeneización de emulsiones y la dispersión de materiales agregados (Dolatowski y col. 2007; McClements, 1995). Entre las aplicaciones del US se puede destacar la pasterización (Figura 3) para la cual se requieren niveles altos de energía.



**Figura 3. Relación generalizada de la tasa de flujo (L/h) frente a la energía (kW) para varias aplicaciones ultrasónicas (Tomado de Patist y Bates, 2008).**

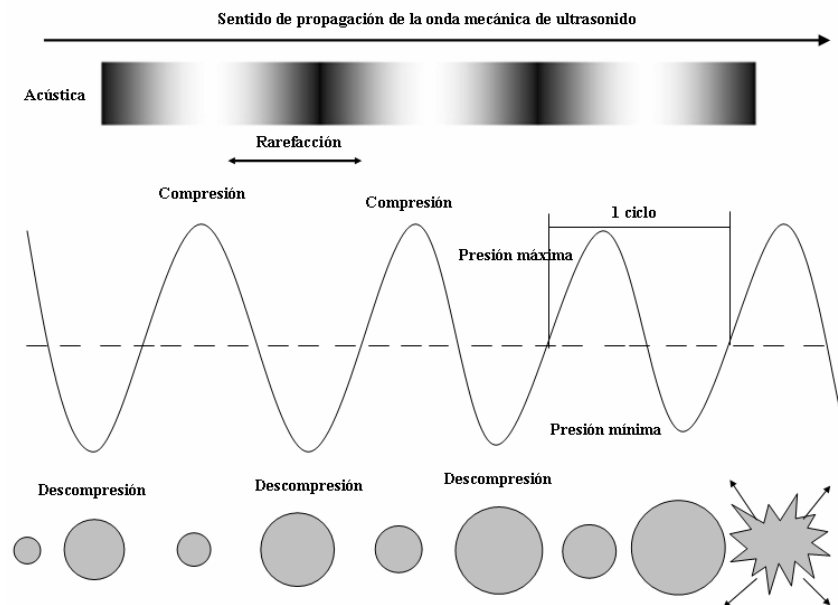
Su efecto mecánico se ha utilizado como alternativa a las operaciones convencionales de procesamiento de alimentos para la extracción de sabores, la desgasificación, como antiespumante y emulsionante, para los procesos de cristalización, como modificador de la microestructura y de la textura, y para facilitar la extracción de diversos componentes bioactivos de los alimentos (Awad y col., 2012; Dolatowski y col. 2007; Higaki y col., 2001; McClements, 1995). En medicina, el ultrasonido de alta intensidad que utiliza transductores en forma de lente se utiliza para destruir y extirpar el tejido enfermo (Awad y col., 2012).

Sus efectos químicos y bioquímicos son herramientas eficaces para la esterilización de equipos, la prevención de la contaminación por bacterias patógenas de las superficies donde se procesan los alimentos, la eliminación de biofilms bacterianos, la inactivación o aceleración de la actividad enzimática para mejorar la vida útil y la calidad de los alimentos, la inactivación microbiana y la promoción de reacciones de oxidación (Awad y col., 2012; Baumann y col., 2009; Dolatowski y col. 2007; McClements, 1995).

### **1.3. Mecanismo de acción del US de alta potencia: cavitación acústica**

Durante el proceso de sonicación, las ondas mecánicas longitudinales se crean cuando una onda sonora se encuentra con un medio líquido, formando así regiones alternas de compresión y expansión (rarefacción, descompresión) (Dolatowski y col.,

2007). Los ciclos de compresión ejercen una presión positiva y atraen, juntando entre sí, a las moléculas del líquido, mientras que los ciclos de expansión ejercen una presión negativa y separan a las moléculas (Vajnhandl y Marechal, 2005; Wu y col., 2013). Cuando la amplitud de la presión es superior a la resistencia de la tracción de líquido en las regiones de expansión (descompresión), se forman pequeñas cavidades llenas de vapor, son las llamadas burbujas de cavitación (Chen, 2012; Wu y col., 2013). La formación, el crecimiento y la implosión en un líquido de estas cavidades llenas de gas/vapor se llama cavitación (Figura 4) (Awad y col., 2012; Feng y col., 2008; Tiwari y Mason, 2012).



**Figura 4. Cavitación ultrasónica (Soria y Villamiel, 2010).**

El fenómeno de cavitación consiste en la repetición de tres etapas distintas: formación (nucleación) de la burbuja, crecimiento rápido (expansión) durante los ciclos hasta alcanzar un tamaño crítico, y el colapso violento en el líquido (Pang y col. 2011). Las burbujas de cavitación tienen un área superficial más grande durante el ciclo de expansión, aumentando la difusión del gas y haciendo que la burbuja se expanda. Tanto en el campo acústico de baja o de alta intensidad, una vez que una burbuja/cavidad experimenta un rápido crecimiento y ya no puede absorber la energía de manera eficiente, el líquido se precipitará (apresurará) en la cavidad y, finalmente, implosionará. Se alcanza un punto donde la energía ultrasónica suministrada no es

suficiente para retener la fase de vapor en el interior de la burbuja; por lo tanto, se produce la condensación rápidamente. Las moléculas condensadas chocan violentamente, creando ondas de choque. Al colapsar, cada una de las burbujas actuará como un punto caliente, generando energía para aumentar la temperatura y presión hasta 5.500°C y 50 MPa, respectivamente, con rápidas velocidades de enfriamiento de 109 °K/s. Estas burbujas colapsantes crean un mecanismo inusual para las reacciones químicas de alta energía debido a las altas temperaturas y presiones locales (Tiwari y Mason, 2012; Wu y col., 2013). La cavitación producida permite concentrar la energía difusa del sonido y también provocar la aparición de microcorrientes capaces de mejorar la transferencia de calor y de masa (Dolatowski y col., 2007; Jayasooriya y col. 2004, Tiwari y Mason, 2012; Zheng y Sun, 2006). La cavitación también puede mejorar la transferencia de calor por convección y generar la explosión de la burbuja, produciendo lo que se conoce como punto local caliente que puede causar la destrucción de los microorganismos y de las enzimas (Kuldiloke, 2002).

La capacidad del US para provocar la cavitación depende de las características del tratamiento ultrasónico (frecuencia, intensidad, energía, presión, velocidad, temperatura), las propiedades del producto (viscosidad, tensión superficial) y las condiciones ambientales (temperatura, presión) (Awad y col., 2012; Dolatowski y col., 2007). En concreto, el papel de estos factores en la cavitación es:

a) frecuencia: a mayor frecuencia, menor es el tiempo dado a la burbuja para que crezca y afecte al sistema, por lo que el efecto de la cavitación es menor. La intensidad del US requerida para causar la cavitación aumenta notablemente con frecuencias superiores a 100 kHz;

b) viscosidad: cuanto más viscoso es un líquido, menor es el efecto de la cavitación;

c) temperatura: cuanto mayor es la temperatura, la cavitación tiene lugar para intensidades acústicas menores;

d) presión externa: el aumento de este factor provoca una mayor violencia en la colisión de las burbujas;

e) intensidad: en general, a mayor intensidad ultrasónica, mayor es el efecto de este fenómeno.

### 1.3.1. Clasificación de la cavitación acústica

Hay dos tipos de cavitación, cavitación transitoria y la estable (Feng y col., 2008; Wu y col., 2013). En la cavitación transitoria, una burbuja o cavidad sólo dura varios ciclos acústicos antes de colapsar, mientras que una burbuja de cavitación estable se quedaría en un líquido durante decenas o incluso cientos de ciclos acústicos (Feng y col., 2008; Tiwari y Mason, 2012). Sin embargo, la cavitación estable podría llevar a convertirse en cavitación transitoria y viceversa (Vajnhandl y Marechal 2005; Wu y col., 2013).

Cuando se introduce un campo acústico de alta intensidad (US de alta energía, alta potencia, US de baja frecuencia, US de potencia), generalmente se produce la cavitación transitoria. Esto causa el crecimiento cada vez mayor de la burbuja de cavitación hasta que finalmente se vuelve inestable después de varios ciclos y la onda ultrasónica colapsa durante el ciclo de compresión. En este fenómeno de cavitación, el tamaño de la burbuja aumenta drásticamente de decenas a cientos de veces el radio de equilibrio antes de colapsar violentamente en menos de un microsegundo (Wu y col., 2013).

Cuando se introduce un campo acústico de baja intensidad (US de baja energía, baja potencia, US de alta frecuencia, US diagnóstico), se produce la cavitación estable, lo que produce microcorrientes a lo largo de la burbuja y crea altas tensiones de cizallamiento hidrodinámico, que son acciones mecánicas que pueden ser utilizadas en muchas aplicaciones de procesamiento (Feng y col., 2008). En este fenómeno de cavitación, la pared de la burbuja se empareja con el campo acústico, y oscila sobre el radio de equilibrio durante varios ciclos, y el tamaño de la burbuja oscila en fase con los ciclos de expansión y de compresión y las burbujas crecen lentamente durante muchos ciclos acústicos (Thangavadivel y col., 2012). Debido a su pequeña variación en los cambios de tamaño de la burbuja, este proceso es de poca importancia en términos de efectos químicos (Destailats y col., 2003). El proceso también se denomina difusión rectificadora pues durante la expansión, el vapor de agua, así como los gases disueltos y los vapores orgánicos entrarán en la burbuja y saldrán durante la contracción (Thangavadivel y col. 2012; Wu y col., 2013).



### 1.3.2. Efectos de la cavitación acústica

Los efectos del US de alta potencia se producen por el fenómeno acústico de cavitación, que como ya se ha descrito es la formación, crecimiento y colapso implosivo de burbujas de gas (burbujas de cavitación) en los líquidos, que liberan grandes cantidades de energía muy localizada (Awad y col., 2012).

El colapso de las burbujas transitorias crea en el líquido tanto efectos mecánicos como químicos.

Los efectos mecánicos incluyen alta presión localizada (hasta 1.000 atm), alta temperatura (5.500°C), una alta tasa de calentamiento/enfriamiento (10<sup>9</sup> °K/s), y la formación de ondas de choque. Estas ondas de choque pueden causar la ruptura de la envoltura celular y facilitar las reacciones sonoquímicas. El colapso de las burbujas de cavitación cerca de superficies sólidas forma microchorros asimétricos, que limpian las superficies de contaminantes. Además, los microchorros generados cerca de la interfaz entre dos líquidos inmiscibles (por ejemplo, aceite y agua) facilitan la emulsificación (Awad y col., 2012; Thompson y Doraiswamy, 1999; Tiwari y Mason, 2012). En las interfases sólido y líquido, la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación transitoria genera chorros de líquido que pueden tener una velocidad del líquido en flujo de hasta 156 m/s, lo que puede causar daños graves en la envoltura celular, limpiar una superficie sólida, y promover la bioseparación (Feng y col., 2008).

Los efectos químicos del US de alta potencia no se producen a partir de una interacción directa con especies moleculares, sino por el fenómeno acústico de cavitación. Con la cavitación, las moléculas de agua se pueden dividir para formar radicales libres, lo cual intensifica las reacciones químicas y también induce la reticulación de las moléculas de proteína en un medio acuoso (Cavalieri y col., 2008) y aumenta la velocidad de las reacciones de transporte de masa debido a la generación de turbulencias locales y a la microcirculación del líquido (corriente acústica) (Awad y col., 2012; Gogate y col., 2006; Gogate y Pandit, 2011a).

Los efectos químicos incluyen la formación de radicales OH<sup>-</sup> y H<sup>+</sup> y de peróxido de hidrógeno que tienen importantes propiedades bactericidas. Los radicales de hidróxido (OH<sup>-</sup>) y los radicales de hidrógeno (H<sup>+</sup>) se generan durante la disociación de las moléculas de agua en soluciones acuosas, como resultado de la alta temperatura y la presión del gas de las burbujas colapsantes asociadas con la cavitación (sonólisis)

(Riesz y Kondo, 1992; Tiwari y Mason, 2012). También hay evidencias de que los radicales libres se forman por cavitación en soluciones no acuosas y polímeros. Sin embargo, la cavitación funciona mejor en medios acuosos en comparación con medios orgánicos (Awad y col., 2012). La formación de radicales libres por US puede ser o no beneficioso (Ashokkumar y col., 2008; Earnshaw, 1998). En aplicaciones en las que los radicales libres tienen efectos nocivos, el uso de altas frecuencias se prefiere pues tanto el número de burbujas como de radicales libres se reducirá así como utilizar etanol o ácido ascórbico, que son inactivadores de radicales libres (Beckett, 1999).

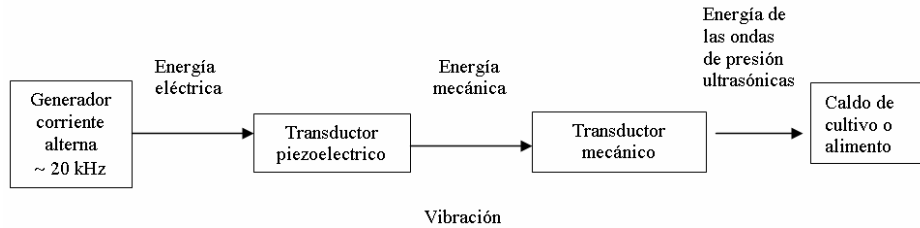
Por tanto, es importante tener en cuenta que los parámetros del US de alta potencia (duración, intensidad y frecuencia de las ondas ultrasónicas) así como sus efectos sobre las propiedades tecnológicas y funcionales de los alimentos deben tenerse en cuenta y ajustarse para cada una de las diferentes aplicaciones mencionadas anteriormente (Awad y col., 2012; Soria y Villamiel, 2010).

#### **1.4. Principios del US de alta potencia**

El uso del US en los procesos industriales requiere un medio líquido (mínimo del 5%) y una fuente de vibraciones de alta energía que genere el US.

La producción de ultrasonidos consiste en la conversión de cualquier otro tipo de energía (eléctrica, magnética o mecánica) en energía acústica. Los dos componentes esenciales de un sistema ultrasónico son una fuente de energía y un transductor, el cual es el encargado de transformar la energía proporcionada por la fuente en energía acústica (García Pérez, 2007). El transductor ultrasónico es el responsable de la producción de los ultrasonidos. La energía que proviene de la fuente genera una serie de cambios en su forma o dimensiones que provocan la aparición de la onda mecánica. Hay dos tipos principales de transductores; el piezoeléctrico y el magnetostrictivo. Los transductores más utilizados en la aplicación de ultrasonidos de potencia son los piezoeléctricos, cuyo fundamento se basa en el efecto piezoeléctrico que presentan algunos cristales o cerámicas (García Pérez, 2007). Los transductores piezoeléctricos son los más comúnmente utilizados en aplicaciones a escala comercial debido a su escalabilidad; pues la potencia máxima por único transductor es generalmente mayor que la de los transductores magnetostrictivos (Patist y Bates, 2008).

El equipo necesario para la aplicación de ultrasonidos de potencia consta de un generador, un transductor y un emisor (transductor mecánico) (Figura 5). El generador es el encargado de transformar la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada. El transductor es el equipo encargado de la conversión de la señal eléctrica de alta frecuencia en vibraciones mecánicas. El emisor irradia la energía acústica generada por el transductor al medio a tratar (García Pérez, 2007).



**Figura 5. Generación de energía ultrasónica.**

Los sistemas tipo sonda de aplicación de ultrasonidos utilizan una sonda metálica o sonotrodo para aplicar al medio líquido la vibración generada en el transductor. La potencia aplicada depende de la amplitud de vibración en la punta de la sonda que se controla variando la potencia eléctrica suministrada por el equipo generador/amplificador. Tanto el diseño como la forma de la sonda tienen mucha importancia. La longitud de la misma debe de ser de media longitud de onda o múltiplo de dicha longitud. Las sondas cilíndricas transmiten la energía acústica al medio a tratar y si a lo largo de la sonda hay reducción del diámetro, aumenta la amplitud de vibración (García Pérez, 2007).

El efecto fundamental del US en un fluido continuo es imponer una presión acústica ( $P_a$ ), además de la presión hidrostática que ya actúa sobre el medio. El US de alta potencia puede ser descrito por la siguiente ecuación (Ec. 1) (Patist y Bates, 2008):

$$P_a = P_{a,max} * \text{sen}(2\pi ft) \text{ (Ec. 1)}$$

donde  $P_a$  es la presión acústica,  $t$  es el tiempo,  $f$  es la frecuencia y  $P_{a,max}$  es la amplitud de presión máxima de la onda (Muthukumaran y col., 2006).  $P_{a,max}$  está relacionada con la entrada de energía (potencia) o la intensidad ( $I$ ) del transductor (Ec. 2):

$$I = P_{a,max} / 2\rho v \text{ (Ec. 2)}$$

donde  $\rho$  es la densidad del medio y  $v$  es la velocidad del sonido en el medio.

Con intensidades bajas (frecuencias altas), la onda de presión induce la formación de la llamada corriente acústica (Patist y Bates, 2008) que es el movimiento y mezclado que se produce en el líquido pero sin formación de burbujas de cavitación (Alzamora y col., 2011). A intensidades más altas (bajas frecuencias) se induce la formación de la cavitación acústica (Mason, 1998) debido a la generación, el crecimiento y colapso de burbujas grandes, lo que provoca la liberación de energías elevadas (Alzamora y col., 2011; Awad y col., 2012).

En general, los líquidos puros poseen una mayor resistencia a la tracción y, por tanto, los generadores de ultrasonidos disponibles no son capaces de producir presiones negativas suficientemente altas como para causar la cavitación. Sin embargo, la mayoría de los líquidos son generalmente impuros y su resistencia a la tracción se reduce debido a la presencia de numerosas partículas pequeñas, sólidos disueltos preexistentes y otros contaminantes. Las impurezas en el líquido representan puntos débiles en los cuales se producirá la nucleación de las burbujas de cavitación (Vajnhandl y Marechal, 2005). Por ejemplo, cuando se utiliza agua pura, se requieren más de 1.000 atm de presión negativa para generar la cavitación mientras que para el agua del grifo, sólo unas pocas atmósferas de presión serían suficiente para formar las burbujas de cavitación (Chowdhury y Viraraghavan, 2009; Wu y col., 2013).

### **1.5. Las aplicaciones del US en la tecnología de los alimentos**

Las aplicaciones de US tanto de alta como de baja frecuencia en la industria de alimentos han demostrado tener un potencial, ya sea para la modificación o para la caracterización de las propiedades de los alimentos. En muchos casos, las técnicas basadas en el US tienen considerables ventajas sobre las tecnologías existentes (Dolatowski y col., 2007).

Las aplicaciones potenciales del US de alta intensidad (US de potencia) en la industria alimentaria son diversas, pues se utiliza para modificar, ya sea física o químicamente, las propiedades de los alimentos, por ejemplo para generar emulsiones, romper las células, promover reacciones químicas, inhibir enzimas, ablandar la carne y modificar los procesos de cristalización (McClements, 1995). El US hace uso de los fenómenos físicos y químicos que son fundamentalmente diferentes si se comparan con los aplicados en las técnicas de extracción, de procesamiento o de conservación

convencionales. El US ofrece una ventaja neta en términos de productividad, rendimiento y selectividad, con un mejor tiempo de procesamiento, mejora de la calidad, reducción de riesgos químicos y físicos, además de ser respetuoso con el medio ambiente (Chemat y col., 2011).

El US de alta intensidad (US de potencia) se ha probado para la inactivación microbiana y enzimática, la separación de bio-componentes, la emulsificación, el calor y la mejora de la transferencia de masa, el corte, la mejora de la cristalización, y la extracción de componentes bioactivos en alimentos y plantas. Debido a los nuevos avances en las técnicas de generación de ultrasonidos, así como una mayor comprensión de los fenómenos de cavitación, el interés en los últimos años ha aumentado para examinar el uso del US de alta intensidad como una herramienta alternativa en el procesamiento y conservación de alimentos (Feng y col., 2008; Tiwari y Mason, 2012).

### 1.5.1. El US en la conservación de alimentos

Los microorganismos, tales como bacterias, y las esporas, son uno de los principales factores responsables del deterioro de los alimentos. Los microorganismos, necesitan ambientes ricos en nutrientes y agua para crecer y multiplicarse, por lo que son medios apropiados para ellos (Chemat y col., 2011).

Tradicionalmente el tratamiento térmico (pasterización y esterilización) es el método empleado para la conservación de los alimentos porque tiene la capacidad de destruir tanto microorganismos vegetativos como la mayoría de esporas, e inactivar las enzimas, todos ellos responsables del deterioro de los alimentos (Awad y col., 2012; Chemat y col., 2011). Su eficacia depende del tiempo de exposición a las altas temperaturas de tratamiento, produciéndose la pérdida de nutrientes, el desarrollo de sabores y colores indeseables, y el deterioro de las propiedades organolépticas de los alimentos (Awad y col., 2012; Chemat y col., 2011).

Actualmente, el reto es combinar al mismo tiempo la temperatura moderada con nuevas aplicaciones para la destrucción microbiana. Las nuevas tecnologías que se están desarrollando aseguran la conservación de los alimentos sin el uso de conservantes, mientras que mantienen sin cambios su valor nutricional y las características organolépticas (textura, color y sabor), con un bajo consumo de energía y un coste competitivo, respetando al medio ambiente y con un alto grado de seguridad (Chemat y col., 2011).

Los métodos de conservación de menor intensidad energética, incluyen la presión, la radiación ionizante, los campos eléctricos pulsantes, la microfiltración, la radiación ultravioleta y el US de alta intensidad (US de potencia), y todos ellos son costo-eficientes y respetuosos con el medio ambiente. En combinación con temperatura moderada, estos métodos pueden acelerar la velocidad de esterilización de alimentos, disminuyendo así la duración y la intensidad del tratamiento térmico y el daño resultante a los componentes de los alimentos (Awad y col., 2012; Piyasena y col., 2003).

El uso del US de alta intensidad (US de potencia) ha mostrado varias ventajas en comparación con la pasteurización por calor, tales como la minimización de la pérdida de sabor en los zumos de frutas, una mayor homogeneidad y un importante ahorro energético (Awad y col., 2012; Chemat y col., 2011; Dolatowski y col., 2007). El US podría dañar las paredes de las células microbianas y dar lugar a su inactivación. Se ha demostrado que las ondas ultrasónicas de alta intensidad pueden romper las células y desnaturalizar las enzimas, y que incluso el US de baja intensidad es capaz de modificar el metabolismo celular. Es necesario aplicar una potencia acústica suficientemente alta para provocar la ruptura de las paredes o membranas celulares. Una célula puede ser inactivada a una intensidad menor que la necesaria para causar la ruptura de su pared o de su membrana. El mecanismo de acción antimicrobiano es debido a la alteración de las membranas celulares, el calentamiento localizado y la producción de radicales libres (Chemat y col., 2011; Dolatowski y col., 2007).

Varios autores han estudiado el mecanismo desempeñado por el US en la disrupción de la membrana de los microorganismos (Baumann y col., 2005; Earnshaw y col., 1995; García y col., 1989; Guerrero y col., 2001a; Guerrero y col., 2005; López-Malo y col., 1999; Raso y col., 1998a), y se ha concluido que es debido a la cavitación acústica y a sus efectos físicos, mecánicos y químicos que inactivan las células microbianas y producen también la desaglomeración de grupos o flóculos celulares (Awad y col., 2012).

En concreto, la cavitación acústica transitoria produce altas temperaturas y presiones locales que desintegrarían las células biológicas y desnaturalizarían las enzimas. La burbuja de implosión también produce fuerzas de cizallamiento y chorros de líquido en el solvente usado que puede tener energía suficiente para dañar físicamente la pared celular o la membrana celular. Las burbujas inducen

microcorrientes en el líquido circundante, que también pueden inducir estrés en los microorganismos. El efecto de inactivación del US también se ha atribuido a la generación de cavitación intracelular y estos choques mecánicos pueden alterar los componentes estructurales y funcionales celulares hasta el punto de la lisis celular (Chemat y col., 2011).

### **1.6. Inactivación de microorganismos por US**

La cavitación transitoria generada por el US de alta intensidad (US de potencia) se ha utilizado para facilitar la descontaminación microbiana de varios tipos de alimentos, probablemente debido a las altas presiones, las fuerzas de cizallamiento y las temperaturas generadas afectan a la integridad de los microorganismos (Kuldiloke, 2002; McClements, 1995). Las pruebas de inactivación microbiana por lo general se llevan a cabo a 20 kHz, una frecuencia situada en el extremo inferior del espectro de frecuencias del ultrasonido de potencia (Feng y col., 2008).

#### **1.6.1. Factores que afectan a la eficacia de la inactivación microbiana**

Desafortunadamente, se necesitan intensidades muy altas si se utiliza sólo el US para conseguir la esterilización permanente. La combinación del US con otros tratamientos tales como la presión, la temperatura moderada, la cloración o valores extremos de pH ha sido estudiado (Dolatowski y col., 2007; Feng y col., 2008; McClements, 1995).

La combinación del US con calor o presión o ambos puede acelerar la velocidad de esterilización de los alimentos, disminuyendo así tanto la duración y la intensidad del tratamiento térmico como el daño resultante a los componentes de los alimentos. Los tratamientos de termosonicación (calor más sonicación, TS), manosonicación (presión más sonicación, MS), y manotermosonicación (calor más presión y sonicación, MTS) son probablemente los mejores métodos, ya que son más energicamente eficientes y más eficaces para inactivar los microorganismos. Por lo general, un efecto aditivo e incluso sinérgico se ha observado en la inactivación de microorganismos y de enzimas alimentarias en tratamiento de termosonicación o de manotermosonicación (Chemat y col., 2011; Feng y col., 2008).

La combinación de calor y US es mucho más eficiente en cuanto a duración del tratamiento y la energía consumida si se compara con el tratamiento individual (Chemat y col., 2011). Sin embargo, la industria de los alimentos, alberga preocupaciones sobre el uso del US para el procesamiento de alimentos, referentes a la calidad del alimento, al escalado y a los aspectos económicos (Feng y col., 2008).

Se ha demostrado que no todos los microorganismos reaccionan de la misma manera al tratamiento con US. Los factores que influyen en la eficacia de la inactivación microbiana son la frecuencia y la amplitud de las ondas, el tiempo de exposición o contacto, el volumen y la composición de los alimentos procesados, la temperatura de tratamiento y el volumen de la suspensión bacteriana (Awad y col., 2012; Chemat y col., 2011; Raso y col., 1998a).

La eficacia de un tratamiento con US también depende del tipo, forma o diámetro de los microorganismos estudiados (Chemat y col., 2011). Se ha encontrado que las esporas, las células Gram-positivas y los cocos, son más resistentes al tratamiento con US que las células vegetativas, las células Gram-negativas, y las células con forma de bastón respectivamente (Feng y col., 2008). Las células de mayor tamaño son más sensibles que las pequeñas, probablemente debido a su área de superficie más grande (Chemat y col., 2011). Las bacterias Gram-positivas son conocidas por ser más resistentes que las Gram-negativas, posiblemente a causa de su pared celular más gruesa, y a la capa estructuralmente más fuerte de peptidoglicano presente en las células Gram-positivas, que les proporciona una mejor protección contra los efectos del US. En cuanto a la forma de los microorganismos, los cocos son más resistentes que los bacilos debido a la relación superficie celular y volumen. Finalmente, las esporas son muy difíciles de destruir en comparación con las células vegetativas que están en fase de crecimiento (Awad y col., 2012; Cameron y col., 2008; Chemat y col., 2011). Para el mismo microorganismo, la resistencia al tratamiento con US varía entre las diferentes cepas (Feng y col., 2008).

Otros dos factores que afectan a la eficacia del US, son la temperatura de cultivo de las células y la viscosidad del medio. Las células cultivadas a 37°C son dos veces más resistentes al US que los que crecen a 4°C, mientras que a viscosidades más altas la cavitación es más difícil de lograr, pero el colapso final de la burbuja es más violento. Se ha demostrado que existe una relación lineal entre la potencia aplicada al medio y los tiempos de reducción decimal, por lo que a mayor energía ultrasónica aplicada al medio



mayor inactivación se consigue, dependiendo de la frecuencia y la intensidad de la energía ultrasónica aplicadas el sistema (Chemat y col., 2011).

Aunque existe una información sobre el efecto del US sobre la inactivación de microorganismos (Chemat y col., 2011; Dolatowski y col., 2007; Piyasena y col. 2003), se necesitan más datos sobre el efecto del US sobre la inactivación de las células vegetativas, levaduras, mohos, esporas, virus y toxinas de los alimentos. Esta necesidad se debe a que los datos de inactivación existentes son a menudo difíciles de comparar debido a la falta de un parámetro de control bien definido y a los diversos protocolos de ensayo y sistemas de ultrasonidos utilizados (Feng y col., 2008).

### 1.6.2. Mejora de la inactivación microbiana

Para mejorar la inactivación microbiana en los alimentos líquidos, el US de alta intensidad (US de potencia) se combina con otros tratamientos tales como presión (manosonicaión), calor (termosonicación), presión y calor (manotermosonicación) y antimicrobianos (Earnshaw y col., 1995; López-Malo y col., 1999; Piyasena y col., 2003; Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Raso y col., 1998a, 1998b). Estos tratamientos combinados son más energético-eficientes y eficaces para matar los microorganismos que si se aplica sólo el US de alta intensidad (Awad y col., 2012).

La cinética de inactivación a temperaturas subletales por lo general presenta una relación log-lineal, mientras que a temperaturas letales la cinética de inactivación se han reportado como no log-lineal. Se considera que los hombros son causados por la disgregación de grupos celulares, mientras que la presencia de colas se ha relacionado con una pérdida progresiva de la intensidad de la cavitación durante el tratamiento de sonicación, que puede ser cierto para un sistema abierto en el que se puede producir el arrastre de aire y la intensidad de cavitación está, por tanto, reducida (Chemat y col., 2011; Peleg, 2000; Peleg y Cole, 1998).

Cuando se aplica el US de alta intensidad a un alimento líquido a temperaturas bajas, la inactivación microbiana es causada por el US y la tasa de muerte es relativamente baja, especialmente a bajas densidades de energía acústica. Cuando se aplica el US de alta intensidad a temperaturas moderadas (termosonicación), la inactivación es el resultado de una acción combinada del calor y el US, pudiéndose observar efectos aditivos o incluso sinérgicos. Cuando se introduce presión de 200 a

500 kPa en un sistema de termosonicación para lograr MTS, se ha observado un aumento adicional de la tasa de inactivación (Feng y col., 2008).

Los estudios de la lesión de células han demostrado que la termosonicación provoca graves daños físicos en la envoltura celular en forma de arrugas, rupturas y perforaciones (Ugarte y col., 2006). En las pruebas de sonicación asistidas con presión externa elevada, las células supervivientes Gram-positivas y Gram-negativas que se recuperaron en medios con cloruro de sodio son prácticamente idénticas a las recuperadas en un medio no selectivo (Pagán y col., 1999). La ausencia de células subletalmente lesionadas en los estudios actuales se ha atribuido al daño físico irreversible a la membrana externa (Feng y col., 2008; Mañas y Pagán, 2005).

Raso y col. (1998a) estudiaron la influencia de la temperatura y la presión sobre la letalidad del US sobre la bacteria patógena *Yersinia enterocolitica* y observaron que los niveles de letalidad del US aumentaron en gran medida con el incremento de la presión y/o temperatura estática. Knorr y col. (2004) observaron una mejora en la inactivación de *E. coli* cuando el US de alta intensidad (US de potencia) se combinó con la temperatura. También ha sido observado un efecto letal sinérgico entre el calor y el US bajo presión en la inactivación de *Salmonella senftenberg* 775W (Álvarez y col., 2006). Otros investigadores han demostrado que la combinación de US (38.5-40.5 kHz) con antimicrobianos químicos mejora la muerte o la eliminación de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 en semillas de alfalfa (Scouten y Beuchat, 2002), y la reducción del número de bacterias en muestras de agua (Phull y col., 1997). Seymour y col. (2002) describen el potencial de usar el US de alta intensidad para la descontaminación de productos frescos, debido al efecto mecánico generado por las burbujas de cavitación. Indicaron que la cavitación aumenta la eliminación mecánica de las bacterias adheridas en la superficie de los productos frescos desplazando o aflojando las partículas a través de una acción de cizallamiento o de lavado, logrando una reducción logarítmica adicional cuando se aplica a un lavado de agua clorada.

### 1.6.3. Microorganismos inactivados con US

En los últimos años se ha estudiado el efecto de la aplicación de US sobre la inactivación de diferentes microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, bacterias mesófilas, mohos y levaduras, *Bacillus* spp., *Streptococcus*

*faecium*, *Salmonella enteritidis*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* sp.,...) en modelos de alimentos (agua, tampones fosfato, caldo Sabouraud,...) y alimentos (leche UHT, leche entera cruda, ZN, zumos,...). En ellos se observó que cuando se combinó el US con el tratamiento térmico moderado ( $\leq 55^{\circ}\text{C}$ ) y/o con la presión (200-400 kPa), los índices de mortalidad se incrementaron y disminuyeron los valores de reducción decimal en comparación con las tasas de inactivación y los valores D obtenidos cuando se aplicaron los tratamientos por separado, observándose además un efecto sinérgico en lugar de un efecto aditivo (Awad y col., 2012; Chemat y col., 2011; Tiwari y Mason, 2012; Zinoviadou y col., 2015).

Se ha observado que la eficacia del US se podría mejorar aumentando la presión y/o aumentando la potencia de sonicación y/o aumentando la amplitud del US. Se ha observado que en el tratamiento con manosonificación para inactivar bacterias, en comparación con el tratamiento térmico solo, la recuperación de bacterias es mucho menor y que no parece depender del medio de tratamiento empleado. El tratamiento de US permite inactivar los microorganismos y mejorar la calidad de producto final (Chemat y col., 2011; Tiwari y Mason, 2012; Wu y col., 2013).

Se ha observado la disminución de *Salmonella* en piel de pollos de engorde en agua de peptona cuando se aplica sonicación a 20 kHz durante 30 minutos, y que el tratamiento con US disminuye significativamente la contaminación microbiológica de la carne (Dolatowski y col., 2007; Feng y col., 2008).

En una prueba de termosonificación en leche a  $60^{\circ}\text{C}$ , el valor de reducción decimal (D) de *L. monocytogenes* es de 0,3 minutos, lo que representa un aumento de siete veces en la tasa de inactivación en comparación con el tratamiento térmico solo a la misma temperatura (Earnshaw y col., 1995). Sin embargo, existe un límite superior de temperatura para cada microorganismo más allá del cual la aplicación del US a un sistema de alimentación no supone una inactivación adicional (Feng y col., 2008; Ugarte y col., 2007).

Las esporas microbianas son muy resistentes a los tratamientos de inactivación, incluso bajo condiciones extremas, por ejemplo las esporas de *Bacillus thermophilus* son destruidas sólo calentando a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 4 h. Las esporas de *B. subtilis* son muy difíciles de destruir y a menudo se emplean para determinar la eficacia de los procesos de esterilización. Cuando se estudió el efecto combinado del US (20 kHz) aplicado con

sonda con la presión, se observó que aumentando la presión, la amplitud y la temperatura se producía una mayor inactivación de las esporas en comparación con el tratamiento térmico solo (Chemat y col., 2011).

Los protozoos, como *Cryptosporidium parvum*, son responsables de la enfermedad criptosporidiosis transmitida por el agua a los seres humanos. La técnica de desinfección más comúnmente utilizada en el tratamiento del agua, es decir, la cloración y la luz ultravioleta es ineficaz, pero el ozono combinado con ultrasonido parece ser capaz de destruir algunos de estos ooquistes (Chemat y col., 2011).

## **2. Compuestos químicos orgánicos del metabolismo secundario vegetal**

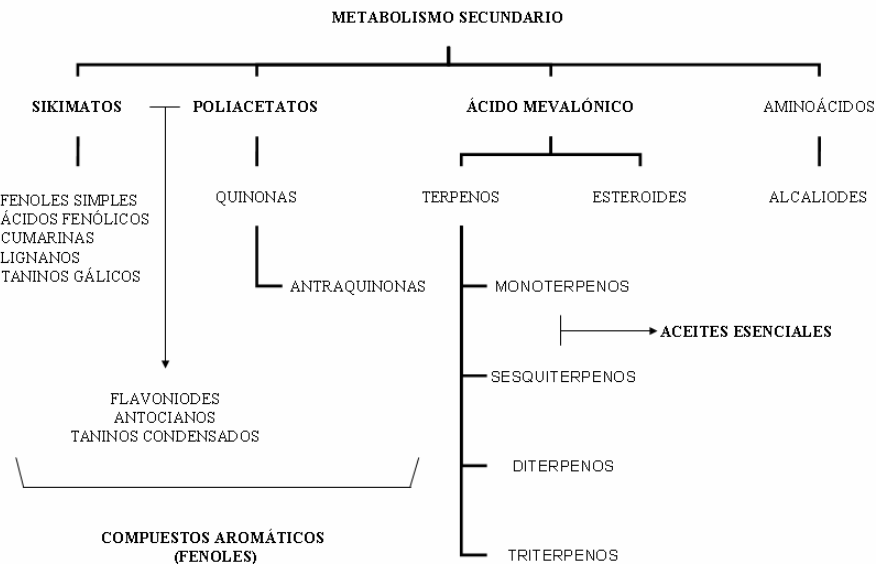
Los vegetales sintetizan diferentes fotoquímicos o sustancias bioactivas a través de su metabolismo secundario, muchas de las cuales son fisiológicamente activas cuando se consumen y pueden jugar un importante papel como factores de protección frente al estrés oxidativo, o la carcinogénesis y son potencialmente efectivos para reducir el riesgo de enfermedades crónicas. Las rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos secundarios son:

Ruta del ácido siquímico: compuestos fenólicos, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, lignanos y cumarinas.

Ruta del acetato-malonato (ruta de los policétidos): flavonoides, antraquinonas.

Ruta del acetato-mevalonato (ruta del ácido mevalónico o ruta de la condensación isoprénica): alcaloides, esteroides, terpenos, carotenoides.

Los compuestos químicos orgánicos procedentes del metabolismo secundario vegetal (Figura 6) se clasifican en tres grandes grupos: Compuestos fenólicos (flavonoides como los fitoestrógenos o la quercetina, el flavonoide más habitual en la dieta); Terpenoides (isoprenoides, carotenoides y esteroides) y Alcaloides (compuestos nitrogenados).



**Figura 6. Metabolismo secundario vegetal (Kuklinski, 2000).**

Muchos de estos compuestos químicos tienen un papel importante en la protección de la salud humana. Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo regular de frutas y vegetales está asociado con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, problemas cardiovasculares, Alzheimer, derrame cerebral, cataratas o el empeoramiento funcional asociado al envejecimiento (Duthie y col., 2000; Hertog y col., 1995; Netzel y col., 2007; Pérez-Vicente y col., 2002; Zafra-Stone y col., 2007). El efecto benéfico sobre la salud de las frutas y hortalizas se atribuye principalmente a los polifenoles, la vitamina C, los carotenoides y la vitamina E, por su acción antioxidante (Rivas-Soler, 2012). Los polifenoles tienen un papel beneficioso para nuestra salud debido al efecto antioxidante que proporcionan, que previene el envejecimiento celular. Además, los polifenoles poseen varias propiedades biológicas y exhiben además propiedades anticancerígena, antiviral y anti-inflamatoria. Las frutas y los vegetales constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta. La mayoría de estos compuestos permanecen en los productos elaborados a base de frutas como por ejemplo zumos (García-Alonso, 2005). Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios de las plantas que desempeñan un papel considerable en el desarrollo del color y del sabor característico de los zumos de frutas (Abid y col., 2014a).

En los últimos años, los compuestos fenólicos y las antocianinas, así como la vitamina C, han atraído el interés por su efecto protector así como su potencial nutritivo y sus efectos terapéuticos (Pérez-Vicente y col., 2002). Los zumos de frutas naturales son ricos en fenoles, flavonoides y antocianinas (Nuncio-Jáuregui y col., 2015; Varela-Santos y col., 2012). Los zumos de naranja y de granada son muy valorados por los consumidores por su contenido nutricional, color atractivo y su dulce sabor refrescante.

El zumo de naranja es una fuente importante de compuestos antioxidantes como carotenoides, compuestos fenólicos y vitamina C (Polydera y col., 2003, 2005). La calidad nutricional del zumo de naranja se relaciona principalmente con el contenido en ácido ascórbico (Zerdin y col., 2003), además de con los ácidos fenólicos y flavonoides, que son los dos grupos principales de compuestos fenólicos en el zumo de naranja (Abid y col., 2014a). Los principales compuestos fenólicos del zumo de naranja son los ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, p-cumárico, sinápico y cafeico) y los flavonoides, entre los cuales los flavonoides en forma de glucósidos (hesperidina y narirutin) predominan (Gattuso y col., 2007; Gardner y col., 2000; Kelebek y col., 2009; Stinco y col., 2015).

La granada (*Punica granatum*, *Punicaceae*) es muy valorada debido principalmente a sus excepcionales propiedades sensoriales y nutricionales (López-Rubira y col., 2005). Los polifenoles son el grupo de fitoquímicos mayoritario de la granada, que incluye a los flavonoides (antocianinas), taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos) (Gil y col., 2000; Hernández y col., 1999; Jaiswal y col., 2009; Poyrazoglu y col., 2002), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido egálico) (Mousavinejad y col., 2009) y ácidos orgánicos (ácido málico) (Poyrazoglu y col., 2002). También destaca por su contenido en vitamina C (Pérez-Vicente y col., 2002). Se ha informado que el consumo de granadas tiene beneficios nutricionales y medicinales, incluyendo la reducción del estrés oxidativo, modificaciones aterogénicas del LDL, y agregación plaquetaria, así como actividades anticancerígenas, antibacterianas y antivirales (Nuncio-Jáuregui y col., 2015; Qu y col., 2010). El zumo de granada contiene polifenoles (principalmente anillos fenólicos con varios grupos hidroxilo) y ácido ascórbico. Los polifenoles del zumo de granada incluyen flavonoides (flavonoles, flavanoles y antocianinas), taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables (ácido gálico y galotaninos) (Li y col, 2015; Viuda-Martos y col, 2010).

La manzana es una de las frutas más valoradas, formando parte de una dieta saludable aportando antioxidantes, vitaminas, minerales, fibra y compuestos bioactivos, como son los fenoles y los flavonoides (Abid y col., 2014a; Aguilar-Rosas y col., 2007).

Por estas razones, se necesitan métodos de procesamiento alternativos de los zumos de frutas que puedan incrementar su estabilidad microbiológica y preservar sus características nutricionales y sus compuestos bioactivos (Patras y col., 2010).

### **3. Definición de aceite esencial**

Los aceites esenciales (AEs), también llamados aceites volátiles o etéreos, son líquidos oleosos aromáticos de origen vegetal, que tienen una amplia gama de aplicaciones en las industrias de etnomedicina, conservación, saborizante de alimentos, fragancias y perfumes (Unlu y col., 2010). Los AEs, son mezclas complejas de sustancias volátiles generalmente presentes en baja concentración en los tejidos vegetales. Son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de materiales vegetales (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutas y raíces), que se pueden obtener mediante presión, fermentación, “enfleurage” (enfloración) o extracción, aunque los métodos de arrastre por vapor, hidrodestilación, destilación al vapor, prensado en frío y métodos combinados destilación-extracción se utilizan más comúnmente para la producción comercial de AEs (Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009; Reyes-Jurado y col., 2015; Tajkarimi y col., 2010; Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

Los AEs se utilizan principalmente como aromas alimentarios, en perfumes (fragancias y lociones para después del afeitado), y como componentes funcionales en productos farmacéuticos (Raybaudi-Massilia y col., 2009). Los diferentes constituyentes presentes en AEs exhiben olores y/o sabores variables cuya percepción por el consumidor depende de su umbral (Burt, 2004; Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Los componentes individuales los AEs también se utilizan como aromas alimentarios, y éstos son extraídos a partir de material vegetal o se fabrican sintéticamente. Aunque la mayoría de los AEs se clasifican como sustancias GRAS (Burt, 2004), su uso en los alimentos como conservantes es a menudo limitado debido a su impacto sensorial negativo. Muchas hierbas, AEs y extractos de plantas poseen actividades

antimicrobianas contra una amplia gama de bacterias, levaduras y mohos (Raybaudi-Massilia y col., 2009; Tajkarimi y col., 2010).

### 3.1. Composición química de los AEs

Los AEs de plantas son, por lo general, una mezcla compleja de compuestos naturales, tanto polares como no polares, y pueden comprender más de sesenta componentes individuales (Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009; Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Los AEs contienen típicamente decenas de constituyentes relacionados, pero con estructuras químicas distintas (Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009). Los componentes principales pueden constituir hasta 85% del AE, mientras que otros componentes sólo están presentes como trazas (Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009).

Estos compuestos consisten en moléculas orgánicas de peso molecular relativamente bajo que contienen principalmente carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre; también se pueden encontrar cloro y bromo con menor frecuencia, en particular en los volátiles de algas marinas. En general, estos compuestos tienen <500 Da de peso molecular y contienen sólo 1-3 átomos de oxígeno. Debido a su gran importancia, se han desarrollado muchos métodos de detección para determinar la presencia y concentración de estos compuestos. Entre ellos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) son los más utilizados (Reyes-Jurado y col., 2015).

Los AEs son metabolitos secundarios altamente enriquecidos en compuestos basados en una estructura de isopreno (Cowan, 1999). De acuerdo con Tongnuanchan y Benjakul (2014), los compuestos y aromas de los aceites esenciales se pueden dividir en 2 grandes grupos: hidrocarburos terpénicos y compuestos oxigenados.

Los hidrocarburos terpénicos están compuestos de átomos de H y C dispuestos en cadenas. Estos hidrocarburos pueden ser acíclicos, alicíclicos (monocíclico, bicíclico o tricíclico), o aromáticos. También llamados terpenos, su estructura química general es  $C_{10}H_{16}$ , y se clasifican como diterpenos, triterpenos, y tetraterpenos ( $C_{20}$ ,  $C_{30}$ , y  $C_{40}$ ), así como hemiterpenos ( $C_5$ ) y sesquiterpenos ( $C_{15}$ ). Los terpenos son la clase más común de compuestos químicos que se encuentran en los AEs. Los terpenos están hechos de



unidades de isopreno (5 unidades de carbono, C<sub>5</sub>), a la combinación de 2 unidades de isopreno se le llama "unidad de terpeno" (Cowan, 1999).

Los compuestos oxigenados son la combinación de C, H y O, y hay una gran variedad de compuestos que se encuentran en los AEs. Los compuestos oxigenados se pueden derivar de los terpenos, denominándose "terpenoides (un terpeno que contiene oxígeno)" (Burt 2004; Cowan, 1999; Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Los terpenoides son sintetizados a partir de unidades de acetato, y como tal que comparten sus orígenes con los ácidos grasos. Se diferencian de los ácidos grasos en que están muy ramificados y en que se pueden ciclar (Cowan, 1999).

Los AEs contienen principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, que son C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> (PM 136 uma: unidad de masa atómica) y C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> (PM 204 uma), respectivamente. Aunque los sesquiterpenos son moléculas más grandes, la estructura y las propiedades funcionales de los sesquiterpenos son similares a las de los monoterpenos. Respecto a los diterpenos, triterpenos, y tetraterpenos, son más grandes que los monoterpenos y sesquiterpenos, pero están presentes en muy baja concentración en los AEs (Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Los hidrocarburos no terpenoides son los alcoholes de cadena corta, fenilpropanoides, ácidos, cetonas, ésteres y aldehídos formados por conversión metabólica o la degradación de fosfolípidos y ácidos grasos. Además, diferentes compuestos que contienen nitrógeno y azufre, que imparten atributos sensoriales característicos, son también componentes importantes de muchos AEs (Reyes-Jurado y col., 2015).

### **3.2. Factores que afectan a la composición y actividad antimicrobiana/antioxidante de los AEs**

Entre los factores extrínsecos que afectan a la composición de los AEs se encuentran las condiciones ambientales, el método de extracción y/o las condiciones de almacenamiento. Entre las condiciones ambientales, están el clima, el agua, la luz del sol, la duración del día, la fluctuación diurna, la presión atmosférica, los nutrientes, el tipo de suelo, las enfermedades y los daños por insectos (Reyes-Jurado y col. 2015). La composición en AEs de una especie particular de planta puede diferir entre las temporadas de cosecha y entre las fuentes geográficas. En general, los AEs producidos a

partir de plantas cosechadas durante o inmediatamente después de la floración poseen una actividad antimicrobiana más fuerte (Burt, 2004).

Dentro de los factores intrínsecos la composición de los AEs en una misma planta puede variar ampliamente entre las de diferentes partes de la misma. Por ejemplo, el AE de las semillas de cilantro (*Coriandrum sativum* L.) tiene una composición muy diferente al AE de las hojas inmaduras de cilantro obtenido de la misma planta (Burt, 2004). La composición del AE varía debido tanto a factores genéticos como ambientales que influyen en la expresión genética. Las plantas que contienen AEs poseen una variación en la composición del aceite a través de las diferentes partes la planta; además, diferentes especies de plantas pueden acumular principios activos distribuidos por toda la planta o concentrados sólo en ciertos órganos de la misma. Por ejemplo, la presencia y la composición del AE de las estructuras de secreción en la hoja, flor, raíz y rizoma de *Alpinia zerumbet* fueron estudiadas por Jezler y col. (2013), y determinaron que los órganos analizados de esta planta presentaban AE, pero mientras que el compuesto principal de la hoja fue el 1,8-cineol, en la flor y el rizoma fue el  $\alpha$ -terpineol. La variedad de planta es otro factor intrínseco que afecta su composición; por ejemplo, Aligiannis y col. (2001) estudiaron la composición del AE de las partes aéreas de *Origanum scabrum* y *O. microphyllum*. Identificaron veinte y ocho constituyentes en *O. scabrum*, siendo el principal componente carvacrol (74,9%), mientras que en *O. microphyllum* identificaron 41 constituyentes, siendo el cis-sabinen hidrato (31,1%) el compuesto principal.

La actividad de los AEs está relacionada con la composición, los grupos funcionales, y las interacciones sinérgicas entre los componentes (Dorman y Deans 2000; Tongnuanchan y Benjakul, 2014). La estructura química de los componentes individuales de un AE afecta a su modo preciso de acción y a su actividad antibacteriana (Burt, 2004). Se ha demostrado que los enantiómeros de los componentes de un AE presentan actividad antimicrobiana en diferentes grados (Reyes-Jurado y col., 2015). La importancia del anillo fenólico (electrones conjugados) se demuestra por la falta de actividad antimicrobiana del mentol en comparación con el carvacrol. Por otra parte, la adición de un resto de etilo a la molécula parece aumentar la actividad antibacteriana. En lo que se refiere a componentes no fenólicos del AE, el tipo de grupo alquilo influye en la actividad (alquenilo > alquilo) (Burt, 2004). Generalmente, los AEs que poseen las propiedades antibacterianas más fuertes contra los patógenos

transmitidos por los alimentos contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos, tales como carvacrol, eugenol (2-metoxi-4- (2-propenil)-fenol) y timol (Burt, 2004). La eliminación del anillo alifático del carvacrol disminuye ligeramente su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, el 2-amino- $\rho$ -cimeno tiene una estructura similar a la del carvacrol, excepto el grupo hidroxilo y se ha determinado que, la actividad antimicrobiana del 2-amino- $\rho$ -cimeno, es 3 veces menor en comparación con la del carvacrol, lo que indica el papel esencial de grupo hidroxilo en la actividad antimicrobiana del carvacrol (Veldhuizen y col., 2006). En concreto, el grupo hidroxilo presente en la estructura de los compuestos fenólicos les confiere actividad antimicrobiana y su posición relativa es realmente crucial para la eficacia de estos componentes naturales; esto puede explicar la actividad antimicrobiana superior del carvacrol y del timol, en comparación con otros compuestos fenólicos vegetales (Burt, 2004; Tongnuanchan y Benjakul, 2014; Veldhuizen y col., 2006).

### **3.3. Mecanismos de acción antimicrobiana de los AEs**

Los AEs están presentes como partes del sistema de defensa de la planta original contra la infección microbiana. Los AEs pueden ser letales para bacterias, virus, hongos, así como protozoos, parásitos, ácaros e insectos, o pueden simplemente inhibir la producción de metabolitos tales como las micotoxinas (Reyes-Jurado y col., 2015; Tajkarimi y col., 2010).

La actividad antimicrobiana de los AEs se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, fenoles, aldehídos, y alcoholes (Reyes-Jurado y col., 2015). Por lo tanto, parece razonable que su mecanismo de acción sea similar al de otros fenoles, y se considera generalmente que éste consiste en la perturbación de la membrana citoplásmica, lo que altera la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación del contenido de las células (Burt, 2004).

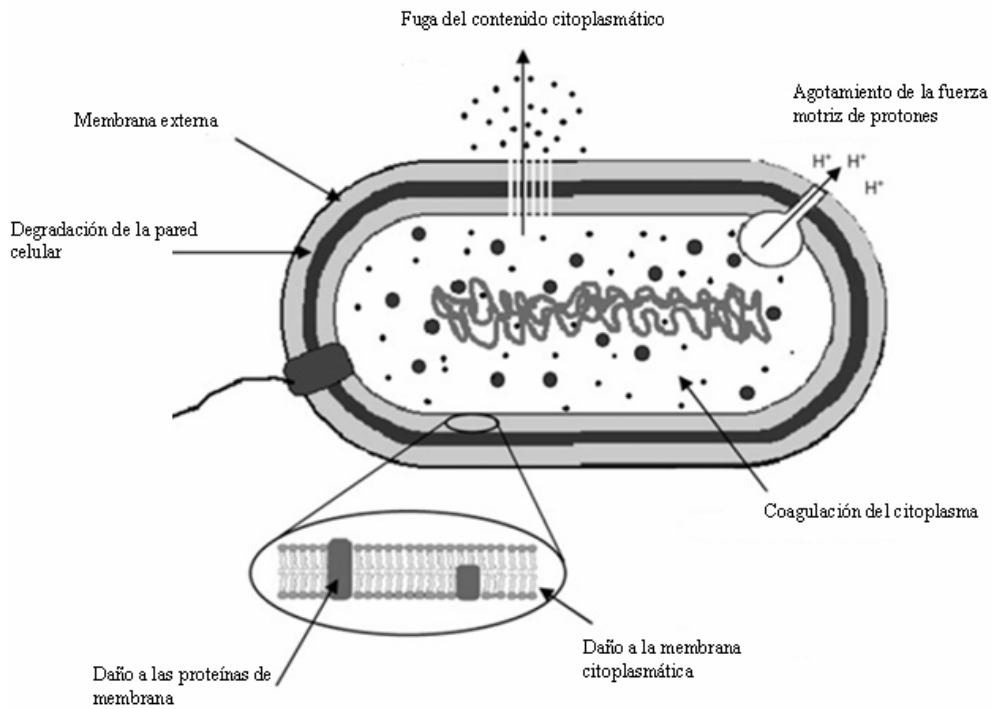
Hay algunas evidencias de que los componentes minoritarios juegan un papel importante en la actividad antibacteriana (Espina y col., 2012; Espina y col., 2011), posiblemente mediante un efecto sinérgico con otros componentes (Burt, 2004).

Muchos investigadores mencionan que la actividad antimicrobiana de los AEs depende principalmente de tres características: del carácter del AE (hidrófilo o hidrófobo), de sus componentes químicos y del tipo de organismo diana (Reyes-Jurado

y col., 2015; Tajkarimi y col., 2010). También se indica que el rango óptimo de hidrofobicidad está implicado en la toxicidad de los AEs (Tajkarimi y col., 2010).

Teniendo en cuenta el gran número de diferentes grupos de compuestos químicos presentes en los AEs, lo más probable es que su actividad antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino que se deba a la existencia de varias dianas en la célula (Burt, 2004). Como lipófilos típicos, los AEs pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, alteran la estructura de sus distintas capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos, permeabilizando y causando daños estructurales y funcionales a las membranas celulares microbianas. En las bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada con la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones, y el agotamiento de la reserva de ATP. Los AEs pueden coagular el citoplasma y dañar las proteínas y los lípidos, este daño a la pared celular y la membrana puede provocar la fuga de las macromoléculas y a la lisis celular (Reyes-Jurado y col., 2015). Otro parámetro importante respecto a los efectos de los conservantes de alimentos es la capacidad para reducir el valor de pH en el interior de la célula bacteriana ( $pH_{IN}$ ). Se ha demostrado que  $pH_{IN}$  tanto de *E. coli* como de *Salmonella* se reduce por el efecto del AE de mostaza (Tajkarimi y col., 2010; Turgis y col., 2009).

Se ha informado de la ubicación y los mecanismos de acción de los AEs en la célula bacteriana (Figura 7), y son: la degradación de la pared celular, el daño a la membrana citoplasmática y a las proteínas de membrana, atacando la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, alterando los sistemas enzimáticos, coagulando el citoplasma, comprometiendo el material genético de las bacterias, formando hidroperóxido de ácido graso causado por la oxigenación de ácidos grasos insaturados, fuga del contenido celular al exterior, y el agotamiento de la fuerza motriz de protones (Arques y col., 2008; Burt, 2004; Burt y col., 2007; Lanciotti y col., 2004; Proestos y col., 2008; Raybaudi-Massilia y col., 2009; Silva y col., 2007; Skocibusic y col., 2006; Tajkarimi y col., 2010). No todos estos mecanismos son dianas independientes, algunos se ven afectados como consecuencia de ser diana de otro mecanismo (Burt, 2004).



**Figura 7. Lugares y mecanismos en la célula bacteriana Gram-negativa donde actuarían los componentes de los AEs (las bacterias Gram-positivas no tienen membrana externa): degradación de la pared celular; daño a la membrana citoplasmática (Knobloch y col., 1989; Sikkema y col., 1995); daño a las proteínas de membrana (Ultee y col., 1999); fuga del contenido de las células (Cox y col., 2000; Lambert y col., 2001); coagulación del citoplasma; agotamiento de la fuerza motriz de protones (Ultee y col., 1999) (Modificado de: Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009; Tongnuanchan y Benjakul, 2014)**

Nychas y col. (2003) indicaron que el modo de acción de los AEs es dependiente de la concentración, lo que indica que las concentraciones bajas inhiben enzimas asociadas con la producción de energía, mientras que cantidades mayores pueden precipitar proteínas. El isotiocianato de alilo derivado de la mostaza parece tener un mecanismo de acción multi-diana actuando en las vías metabólicas, en la integridad de la membrana, en la estructura celular y en una mayor liberación estadísticamente significativa de los compuestos celulares de *E. coli* O157: H7 (Turgis y col., 2009). El carvacrol aumenta la proteína de choque térmico “proteína 60HSP60” (GroEL) e inhibe significativamente la síntesis de flagelina en *E. coli* O157: H7 (Burt y col., 2007; Tajkarimi y col., 2010).

Una característica importante de los AEs y sus componentes es su hidrofobicidad, lo que les permite disolver parcialmente los lípidos de la membrana celular bacteriana y de las mitocondrias, perturbar las estructuras y hacerlos más permeables, produciéndose en consecuencia una fuga de iones y otros componentes celulares. A pesar de que las células bacterianas pueden tolerar cierta fuga de contenido desde su interior sin pérdida de viabilidad, cuando se produce una gran pérdida del contenido celular así como la salida de moléculas e iones críticos, se produce la muerte. Estudios realizados con aceite del árbol del té y *E. coli* han demostrado que la muerte celular puede ocurrir antes de la lisis (Burt, 2004).

Los componentes de los AEs también parecen actuar sobre proteínas celulares embebidas en la membrana citoplasmática. Se conocen enzimas tales como las ATPasas que se encuentra en la membrana citoplasmática y están rodeadas por moléculas lipídicas. Se han sugerido dos mecanismos posibles mediante el cual los componentes cíclicos de los AEs podrían actuar sobre estas proteínas situadas en la membrana. En el primero, las moléculas lipófilas de los AEs se acumularían en la bicapa lipídica y distorsionarían la interacción lípido-proteína; en el segundo, se produciría la interacción directa de los compuestos lipofílicos con partes hidrofóbicas de la proteína. Algunos AEs podrían actuar sobre las enzimas implicadas en la regulación de la energía o en la síntesis de los componentes estructurales. Se ha demostrado que el AE de canela y sus componentes inhiben las descarboxilasas de aminoácidos en *Enterobacter aerogenes*, siendo el mecanismo de acción la unión a proteínas (Burt, 2004).

La canela (*Cinnamomum* sp.) pertenece a las *Lauraceae*, una familia de importancia económica formada principalmente por árboles. El AE de *Cinnamomum* sp. es reconocido como un aditivo alimentario seguro, ampliamente utilizado como agente aromatizante y por su acción inhibidora contra bacterias patógenas, hongos, virus y microorganismos alterantes (Al-Bayati y Mohammed, 2009; Burt, 2004; Tzortzakis, 2009). Los componentes principales del AE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) son el cinamaldehído (principal constituyente del AE de corteza de canela) y el eugenol (principal componente del AE de hoja de canela) (Ranasinghe y col., 2002; Suhr y Nielsen, 2003). Por lo tanto, es posible utilizar el AE de hoja de canela (AEC) o sus componentes como conservantes para extender la vida útil de los alimentos seleccionados teniendo en cuenta su clasificación como GRAS y su actividad antimicrobiana (Pei y col., 2009).

Se ha determinado que el eugenol, componente principal del AE de clavo (aproximadamente 85%) y del AEC, cuando es empleado a concentraciones subletales, inhibe la producción de amilasa y proteasas de *B. cereus*. También se detectó el deterioro de la pared de la célula y un alto grado de lisis celular. Se cree que el grupo hidroxilo del eugenol se une a las proteínas, impidiendo la acción enzimática en *E. aerogenes* (Burt, 2004). Por otro lado, el cinamaldehído (3-fenil-2-propenal) es conocido por inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* a concentraciones similares que el carvacrol y el timol, pero el cinamaldehído no desintegra la membrana externa o agota la reserva de ATP intracelular, sino que su grupo carbonilo se une a las proteínas, impidiendo así la acción de las descarboxilasas de aminoácidos en *E. aerogenes* (Burt, 2004).

Ha sido demostrado que los AEs de orégano, de ajedrea, de hierba de limón, y sus compuestos activos, tales como timol, eugenol y carvacrol causan la alteración de la membrana celular, la inhibición de la actividad de la ATPasa, y la liberación de ATP intracelular y otros constituyentes de microorganismos, tales como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. enteritidis* y *S. aureus* (Lambert y col., 2001; Gill y Holley 2006a; Oussalah y col., 2006; Raybaudi-Massilia y col., 2006). Sin embargo, Oussalah y col. (2006) y Gill y Holley (2004, 2006b) indicaron que el AE de canela y el cinamaldehído producen una disminución en el ATP intracelular por alteración de la actividad ATPasa pero sin cambios aparentes en la membrana celular de *E. coli*, y *L. monocytogenes*. Este hecho podría atribuirse a la interacción del cinamaldehído con la membrana celular, lo que puede causar suficiente disrupción para dispersar la fuerza motriz de protones por la fuga de iones pequeños pero sin que se produzca la fuga de moléculas celulares más grandes, tales como el ATP. Wendakoon y Sakaguchi (1995) informaron de una posible acción del cinamaldehído en las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática de *E. aerogenes* por la inhibición de los enzimas descarboxilasa de aminoácidos, que son necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y la biodegradación.

Por otro lado, Raybaudi-Massilia y col., (2008b) indicaron que el AE de hierba de limón y su compuesto activo principal (cital) actuaron más rápido frente a *E. coli* O157:H7 en 0 días que los AEs de canela y de clavo o sus compuestos activos (cinamaldehído y eugenol). Este hecho sugiere que los coeficientes de reparto de los

compuestos activos pueden influir en su velocidad de difusión a través de la membrana celular (Raybaudi-Massilia y col., 2008b; Raybaudi-Massilia y col., 2009).

### **3.4. Susceptibilidad de mohos, levaduras y bacterias Gram-negativas y Gram-positivas**

Los AEs son eficaces contra mohos, levaduras y bacterias (Reyes-Jurado y col., 2015). Es comúnmente conocido que las bacterias Gram-positivas son más susceptibles a los AEs. Muchos trabajos de investigación confirman este fenómeno, pero hay algunas excepciones, por ejemplo, *E. coli* es más susceptible al AE del árbol del té y muchos otros AEs que *S. aureus*. *Proteus vulgaris* es destruida por los AEs de especias con más eficacia que una variedad de bacterias Gram-positivas. Se ha demostrado que *Vibrio vulnificus* es más susceptible a los constituyentes de AEs, mientras que *L. monocytogenes* es la menos sensible entre un conjunto de bacterias estudiadas. Los hongos son más susceptibles que las bacterias a algunos AEs, por ejemplo, AE de milenrama, AE de pimienta, AE de canela, AE de zanahoria, mientras que son más resistentes a otros, por ejemplo, AE de enebro, AE de tanaceto y a otros más de 45 AEs estudiados (Kalemba y Kunicka, 2003; López y col., 2005; Reyes-Jurado y col., 2015).

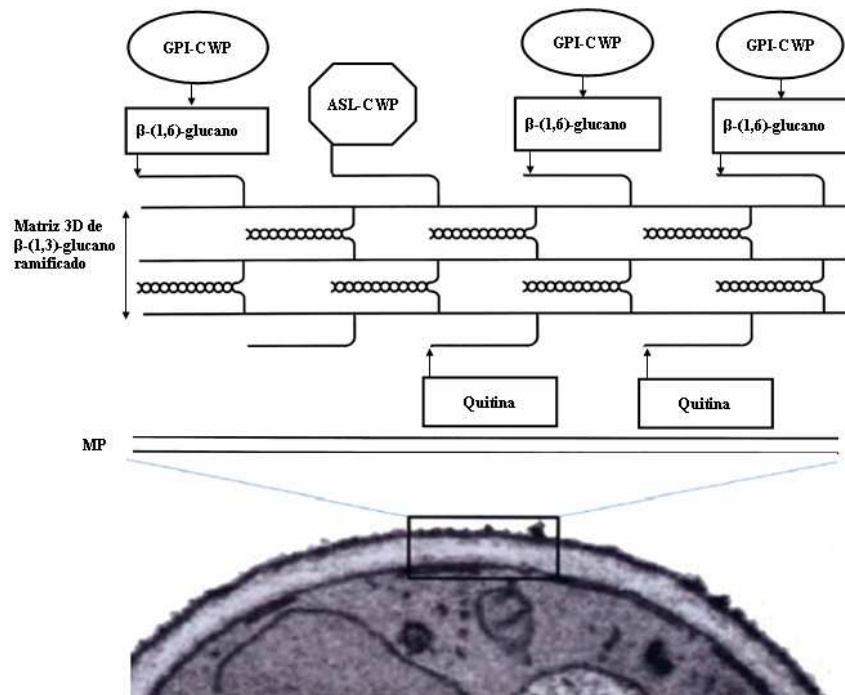
#### 3.4.1. Estructura y composición molecular de la pared celular de *S. cerevisiae*

Las levaduras son células individuales de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de tamaño y de forma esférica u oval; que están rodeadas por una pared celular gruesa, rígida y duradera. La pared celular de la levadura *S. cerevisiae* representa el 30% del peso seco de la célula y está constituida principalmente por polisacáridos (85%) y proteínas (15%). Entre los polisacáridos destacan la quitina y el glucano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Desde un punto de vista bioquímico, los polisacáridos están constituidos por residuos de glucosa que representa un 80-90% del total, un 1-2% de N-actetilglucosamina (NAcGlc) y un 10-20% de residuos de manosa (Lesage y Bussey, 2006) (Figura 8). La capa estructural interna consiste en moléculas de 1,3-b-glucano que forman una red tridimensional que rodea toda la célula. Esta red se fortalece a través de múltiples puentes de hidrógeno entre las moléculas alineadas 1,3-b-glucano. En el exterior de la capa estructural, las proteínas de la pared celular están vinculados a los extremos no reductores de las moléculas de 1,3-b-glucano



bien sea directamente (Pir-CWP) o indirectamente a través de la unión del resto/fracción 1,6-b-glucano y del remanente de un anclaje GPI (GPI-CWP). Algunos GPI-CWP, como Cwp1p, pueden estar unidos en ambos sentidos. Después de la citocinesis, la capa estructural se fortalece por el acoplamiento de las cadenas de quitina a extremos no reductores de las cadenas de 1,3-b-glucano. Esto tiene lugar principalmente en el interior de la capa estructural. El 1,6-b-glucano está mucho más ramificado que el 1,3-b-glucano. De esta manera, 1,6-b-glucano probablemente funciona como una correa de sujeción flexible para GPI-CWP (Kollar y col., 1995, 1997).

El análisis de la pared celular de *S. cerevisiae* mediante microscopía electrónica evidencia su estructuración en varias capas (Osumi, 1998). La capa externa, electrodensa, está formada fundamentalmente por manoproteínas altamente glicosiladas que, entre otras funciones, limitan la accesibilidad de moléculas extrañas a la capa más interna de la pared y a la membrana plasmática. La capa interna (70-100 nm de grosor), transparente al paso de electrones, es la responsable de la rigidez de la pared y está constituida por glucano y quitina.



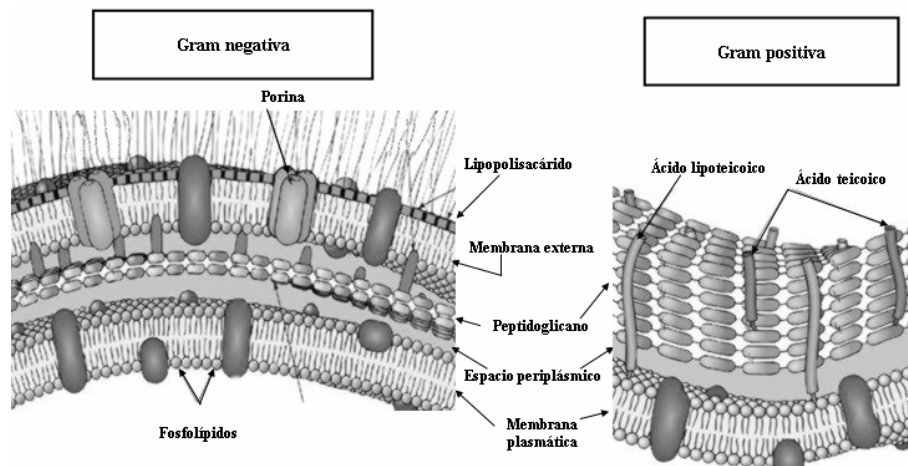
**Figura 8. Un modelo para la arquitectura molecular de la pared celular de *S. cerevisiae*. Por razones de claridad, se han omitido las proteínas no unidas covalentemente y las proteínas unidas a través de puentes disulfuro a otras proteínas de la pared celular (Osumi, 1998; Smits y col., 2001).**

La pared celular de *S. cerevisiae* tiene como función principal garantizar la supervivencia de la célula, para lo cual mantiene las condiciones de estabilidad osmótica intracelular, brinda protección ante condiciones de estrés físico, mantiene la integridad y la forma celular durante los procesos de crecimiento y división; limita la permeabilidad de macromoléculas a través de la pared celular y la protege del ataque de proteínas externas; y evita el escape hacia el medio externo de moléculas solubles intermediarias durante la construcción de la pared celular, y crea los micro-ambientes internos adecuados para la membrana celular durante las fases de latencia.

### 3.4.2. Estructura y composición molecular de la pared y membrana celular de las bacterias

Las envolturas celulares de los microorganismos consisten básicamente en una pared celular y una o dos membranas lipídicas. Para las eubacterias, se pueden distinguir dos grupos principales en función de la composición de su envoltura celular: las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas. Las bacterias Gram-positivas tienen

una sola membrana, la membrana citoplasmática, que está rodeada por una pared celular rígida y espesa que contiene peptidoglicano. Las bacterias Gram-negativas tienen, además de la membrana citoplasmática, una membrana externa que consiste en fosfolípidos y lipopolisacáridos. Entre la membrana externa y la membrana citoplasmática hay una capa delgada de peptidoglicano (Sikkema y col., 1995). La estructura de la pared y de la membrana celular bacteriana está representada en la Figura 9.



**Figura 9. Pared y membrana bacteriana.**

La membrana externa funciona como un tamiz molecular a través de la cual las moléculas con una masa de más de 600 a 1000 Da no pueden penetrar. La pared celular se compone de una variedad de polímeros de azúcares, el grupo más común de las cuales son los peptidoglicanos, y forma la capa de soporte de la envoltura celular (Sikkema y col., 1995).

La membrana citoplasmática de las células consiste en una bicapa de fosfolípidos y forma una matriz en la que están incrustadas las enzimas y proteínas de transporte. Estas últimas permiten la captación selectiva y la excreción de solutos. Además de su papel en el transporte de solutos, la membrana citoplasmática juega un papel crucial en el mantenimiento del estado energético de la célula, la regulación del medio intracelular, la presión de turgencia, la transducción de señales y de energía (Sikkema y col., 1995). En general, la membrana citoplasmática de las bacterias tiene 2 funciones principales: (a) la función de barrera y de transducción de energía, que permiten a la membrana formar gradientes iónicos que se pueden utilizar para conducir

los diversos procesos, y (b) la formación de una matriz para las proteínas embebidas en la membrana (como el complejo integrado de membrana  $F_0$  de la ATP sintasa) (Hensel y col., 1996; Sikkema y col., 1995; Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

Las células se adaptan a los estímulos externos mediante la alteración de la composición de lípidos, de manera que la fluidez de la bicapa permanece relativamente constante (Sikkema y col., 1995). La membrana citoplasmática tiene una baja permeabilidad para las moléculas polares, mientras que los compuestos apolares, tales como hidrocarburos cíclicos, pueden penetrar fácilmente en la bicapa lipídica. La transferencia de estas moléculas a través de la membrana, por lo tanto, es muy probablemente un proceso de difusión.

La mayoría de los estudios que investigan la acción de los AEs contra los microorganismos alterantes y los patógenos transmitidos por los alimentos están de acuerdo en que, en general, los AEs son más activos frente a bacterias Gram-positivas que frente a bacterias Gram-negativas; estas diferencias en la susceptibilidad pueden estar relacionadas con la presencia de la membrana externa en las Gram-negativas (Burt, 2004; Tongnuanchan y Benjakul, 2014). Los extremos lipofílicos de los ácidos lipoteicoicos en la membrana celular de las bacterias Gram-positivas pueden facilitar la penetración de los compuestos hidrófobos de los AEs (Cox y col., 2000). Por otro lado, la resistencia de las bacterias Gram-negativas a los AEs se asocia con el papel protector de las proteínas extrínsecas de membrana o los lipopolisacáridos de la pared celular, lo que limita la velocidad de difusión de los compuestos hidrófobos a través de la capa de lipopolisacárido (Burt, 2004). La disipación de los gradientes iónicos conduce a un deterioro de los procesos esenciales en la célula y finalmente a la muerte celular (Tongnuanchan y Benjakul, 2014; Ultee y col., 1999). La actividad antimicrobiana en bacterias Gram-negativas implica un retardo del efecto, por lo que para lograr el mismo efecto letal se requeriría una exposición más larga a los AEs (Fisher y Phillips, 2008; Kokoska y col., 2002; Okoh y col., 2010; Reyes-Jurado y col., 2015; Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

Sin embargo, no todos los estudios sobre AEs han llegado a la conclusión de que los Gram-positivos son más susceptibles. De hecho *Aeromonas hydrophila* (Gram-negativa) parece ser una de las especies más sensibles (Burt, 2004). Se ha postulado que los componentes individuales de los AEs presentan diferentes grados de actividad contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos y se sabe que la

composición química de los AEs de una especie vegetal particular puede variar de acuerdo con el origen geográfico y el periodo de cosecha. Por tanto, es posible que la variación en composición entre los lotes de AEs sea suficiente para causar variabilidad en el grado de susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Dentro de las bacterias Gram-negativas, *Pseudomonas*, y en particular *P. aeruginosa*, parece ser menos sensible a la acción de los AEs (Burt, 2004).

Entre los componentes de los AEs, el carvacrol ha demostrado que ejerce una acción antimicrobiana distinta (Veldhuizen y col., 2006). El carvacrol es el principal componente del AE de orégano (60% a 74% carvacrol) y de tomillo (45% carvacrol) (Arrebola y col., 1994). Se sabe que este componente tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Friedman y col., 2002). El carvacrol desintegra la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, produciendo la liberación de lipopolisacáridos y el aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP (Burt 2004). Sobre las bacterias Gram-positivas, el carvacrol es capaz de interactuar con las membranas de las bacterias y alterar la permeabilidad para cationes tales como  $H^+$  y  $K^+$  (Tongnuanchan y Benjakul, 2014; Veldhuizen y col., 2006).

El AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) exhibió actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y Gram-positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) (Okoh y col., 2010). Los componentes principales del AE de romero son monoterpenos tales como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno 1,8-cineol, borneol, alcanfor y verbenona (Okoh y col., 2010), cuya fuerte actividad antimicrobiana se debe a la ruptura de la membrana bacteriana (Knobloch y col., 1989). Aguirre y col. (2013), Burt, (2004) y Pelissari y col. (2009) también han informado de que el AE de orégano tiene mayor actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) que las Gram-negativas (*E. coli* y *Pseudomonas* spp.). Los principales componentes del AE de orégano son timol, carvacrol,  $\gamma$ -terpineno y  $\rho$ -cimeno (Lambert y col., 2001; Burt, 2004; Aguirre y col., 2013). Sin embargo, *P. putida* es resistente a los AEs de semilla de zanahoria y al de perejil (Teixeira y col., 2013). *E. coli* y *S. typhimurium* también son tolerantes a los AEs de semilla de zanahoria, de pomelo, de limón, de cebolla y de perejil (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

La actividad antimicrobiana del AE de *Callistemon comboynensis* se observó frente a bacterias Gram-positivas (*B. subtilis* y *S. aureus*), Gram-negativas (*Proteus*

*vulgaris* y *P. aeruginosa*), y la levadura patógena *Candida albicans*. Esto puede estar asociado con el alto contenido de compuestos oxigenados (Abdelhady y Aly, 2012). El AE de *C. comboyensis* contenía 1,8-cineol (53,03%), eugenol (12,1%), metil eugenol (8,3%),  $\alpha$ -terpineol (4,3%), y carveol (3,4%) (Abdelhady y Aly, 2012). Teixeira y col. (2013) encontraron que la mayor reducción microbiana (log 8,0 ufc/mL) se obtuvo cuando los AEs de cilantro, de orégano y de romero se utilizaron a un nivel de 20  $\mu$ L para inhibir *L. innocua*. El AE de tomillo (20  $\mu$ L) fue capaz de inhibir tanto *L. monocytogenes* como *L. innocua*. Sin embargo, el AE de romero exhibe la CMI más alta (90,8 mg/mL) contra *Brochothrix thermosphacta* y *S. typhimurium*. Por lo tanto, los AEs de las plantas se pueden usar como agentes antimicrobianos para aplicaciones en alimentos, así como otros fines; sin embargo, su actividad es muy variable dependiendo del tipo de AE utilizado (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

### **3.5. Los AEs como conservantes. Factores que afectan al efecto antibacteriano de los AEs o de sus componentes en los alimentos.**

La capacidad de los AEs de plantas para proteger los alimentos contra los microorganismos patógenos y alterantes ha sido señalada por numerosos autores (Espina y col., 2013; Friedman, 2006; Lis-Balchin y col., 1998; Rojas-Graü y col., 2007; Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

Varios estudios han estudiado el efecto de los componentes de los alimentos en la resistencia microbiana a los AEs, pero ninguno parece haber cuantificado o haber explicado el mecanismo, aunque sí se han sugerido posibles causas. Se postula que la mayor disponibilidad de nutrientes en los alimentos en comparación con los medios de laboratorio puede permitir que las bacterias reparen las células dañadas más rápidamente (Burt, 2004). En general, se ha establecido que en los alimentos son necesarias concentraciones más altas de AEs, en comparación con los ensayos *in vitro*, para lograr el mismo efecto. Se ha determinado que la relación debe ser aproximadamente dos veces en la leche semi-desnatada, 10 veces en la salchicha de hígado de cerdo, 50 veces en la sopa y 25 a 100 veces en el queso fresco. Sin embargo, para *Aeromonas hydrophila* no hubo diferencia entre experimentos “*in vitro*” y en carne de cerdo cocida y lechuga (Burt, 2004; Tajkarimi y col., 2010).

Las especias y las hierbas se utilizan sobre todo en el rango de 500-1000 mg/L en los sistemas alimentarios. Algunas especias tienen actividad antimicrobiana más fuerte que otras y para ser eficaces algunas necesitan concentraciones de 1000 mg/L o superiores (Ceylan y Fung, 2004; Tajkarimi y col., 2010).

La eficacia antimicrobiana de los antimicrobianos de origen vegetal depende de factores tales como los métodos de exposición (en fase de vapor en comparación con el método de contacto directo), las características de los microorganismos (volumen de inóculo, fase de crecimiento, el medio de cultivo usado) y propiedades intrínsecas (contenido de grasa/proteínas/agua, antioxidantes, conservantes, pH, sal, otros aditivos) o propiedades extrínsecas de los alimentos (tiempo de incubación/temperatura, el envasado en vacío/gas/aire, la estructura física de los alimentos) (Burt, 2004; Tajkarimi y col., 2010).

Generalmente, la susceptibilidad de las bacterias al efecto antimicrobiano de los AEs parece aumentar con una disminución en el pH del alimento, la temperatura de almacenamiento y la cantidad de oxígeno dentro del embalaje. A pH bajo la hidrofobicidad de los AEs aumenta, permitiendo que se disuelvan más fácilmente en los lípidos de membrana de las bacterias diana (Burt, 2004).

El menor contenido en agua de los alimentos, en comparación con los caldos de cultivo del laboratorio, parece obstaculizar/dificultar el progreso de los AEs hasta el sitio diana de la célula microbiana (Burt, 2004).

En general, se supone que los altos niveles de grasa y/o proteína en los alimentos protegen a las bacterias de la acción del AE. Por ejemplo, si el AE se disuelve en la fase lipídica de los alimentos, estará menos disponible para que pueda actuar sobre las bacterias presentes en la fase acuosa (Burt, 2004; Cava-Roda y col., 2012a, 2012b). El contenido en proteínas también se ha propuesto como un factor que inhibe la acción del AE de clavo en *S. enteritidis* en queso líquido bajo en grasa (Burt, 2004). El porcentaje de grasa podría ejercer una mayor influencia que el pH sobre el efecto antibacteriano de los AEs (Burt, 2004). Sin embargo, los hidratos de carbono de los alimentos no parecen proteger a las bacterias de la acción de los AEs tanto como lo hacen las grasas y las proteínas (Burt, 2004).

La actividad antimicrobiana de los AEs también está influenciada por la disponibilidad del oxígeno. Esto podría ser debido al hecho de que cuando hay poco

oxígeno presente, menos cambios oxidativos pueden tener lugar en los AEs y/o a que las células que obtienen energía a través del metabolismo anaeróbico son más sensibles a la acción tóxica de los AEs (Burt, 2004).

En general, los AEs han demostrado que poseen una fuerte actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y alterantes, siendo mayor en productos de frutas de pH bajo y almacenados a temperaturas superiores a las de refrigeración. Por otro lado, un mayor valor del coeficiente de partición del compuesto activo principal del AE favorecería su difusión a través de la membrana celular, y, por consiguiente, su acción antimicrobiana (Raybaudi-Massilia y col., 2009).

Cuando se añadieron concentraciones más altas de AEs en zumos de fruta y frutas recién cortadas, se observó una mayor actividad antimicrobiana sobre los microorganismos, pero los atributos sensoriales fueron seriamente alterados (Raybaudi-Massilia y col., 2006, 2008a, 2008b; 2009).

La temperatura de almacenamiento es otro factor importante que puede influir en la actividad antimicrobiana de los AEs en productos a base de frutas (Raybaudi-Massilia y col., 2009). En tal sentido, Friedman y col., (2004) observaron que la actividad bactericida de diferentes AEs o de sus componentes activos contra *E. coli* O157: H7 y *Salmonella hadar* en zumo de manzana fue superior a 37°C que a 4 y 21°C. Una mayor fluidez de la membrana celular microbiana a altas temperaturas podría explicar una mayor difusión celular de los AEs (Raybaudi-Massilia y col., 2009). Aronsson y Rönner (2001) indicaron que la temperatura del medio en el que están suspendidas las células tiene una influencia significativa en la determinación de las propiedades de fluidez de la membrana. A bajas temperaturas, los fosfolípidos están estrechamente empaquetados en una estructura de gel rígido, mientras que a altas temperaturas, están menos ordenados y la membrana tiene una estructura líquida cristalina.





## JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

En los últimos años, se ha incrementado el consumo de zumos de frutas mínimamente procesadas, debido por una lado, a la creciente demanda de productos cuyas características sensoriales y nutricionales sean lo más parecidas posible a las de los zumos naturales; y por otro, a las evidencias científicas que demuestran que el consumo de frutas y verduras ayuda a prevenir muchas enfermedades degenerativas, como son las enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Sin embargo, las condiciones inadecuadas de manipulación y de almacenamiento, favorecen que los microorganismos patógenos y/o alterantes puedan contaminar el producto, aumentando el riesgo de contraer enfermedades así como el deterioro del producto. En los últimos años, se ha incrementado el número de brotes de enfermedades causadas por el consumo de zumos no pasteurizados. La pérdida de calidad en los zumos no pasteurizados puede ser por causas microbiológicas, enzimáticas, químicas y/o físicas. Las pérdidas de seguridad y calidad por causas microbiológicas suponen por una parte un peligro para los consumidores por la presencia de toxinas microbianas y/o microorganismos patógenos y por otra parte importantes pérdidas económicas por la alteración de los productos (Raybaudi-Massilia y col. 2009).

El procesamiento térmico es la tecnología más utilizada para pasteurizar zumos de frutas y bebidas, para lo cual se pueden emplear diferentes combinaciones de tiempo y temperatura. Sin embargo, como el tratamiento térmico tiende a reducir tanto la calidad nutricional del producto como su frescura sensorial, y la demanda de alimentos naturales y saludables está creciendo rápidamente, se está trabajando en la innovación y el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación de alimentos. Estas nuevas tecnologías se pueden dividir en métodos físicos (principalmente métodos no térmicos) y métodos químicos (antimicrobianos sintéticos/naturales). Algunos de los nuevos métodos no térmicos de pasteurización desarrollados durante el último par de décadas, incluyen la alta presión hidrostática (APH), la homogeneización a alta presión (HPH), los impulsos de campo eléctrico (PEF), y el ultrasonido (US). Estas técnicas emergentes parecen tener el potencial de proporcionar zumos de frutas seguros con características similares a los naturales y con prolongación de la vida útil (Rupasinghe y Yu, 2012).

Tradicionalmente se han empleado conservantes sintéticos para conservar los alimentos y para prevenir el crecimiento de patógenos. Sin embargo, en los últimos

años, las preferencias de los consumidores por alimentos sanos y seguros microbiológicamente, con niveles más bajos o ausencia de conservantes químicos, con características más naturales y similares a los productos frescos se han incrementado, por lo que el interés por el uso de sustancias antimicrobianas naturales que eviten el deterioro microbiológico de los zumos no pasteurizados y que garanticen tanto su seguridad como su calidad ha aumentado significativamente (Raybaudi-Massilia y col. 2009; Reyes-Jurado y col. 2015).

Los agentes antimicrobianos sintéticos se consideran aditivos alimentarios, por lo que su uso en los alimentos se rige tanto por regulaciones internacionales como nacionales (Raybaudi-Massilia y col. 2009). De acuerdo con estas normativas, la mayoría de los antimicrobianos naturales están generalmente reconocidos como seguros (GRAS); y los límites se establecen en función de su origen, la ausencia de toxicidad, la ingesta diaria admisible (IDA) y los efectos sobre los atributos sensoriales (Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col. 2009; Zinoviadou y col., 2015).

Los aceites esenciales (AEs) obtenidos a partir de plantas aromáticas son una fuente diversa y única de productos naturales, que son utilizados como bactericidas y fungicidas en la industria y pueden ser considerados ingredientes. Debido al creciente interés de los consumidores por ingredientes de origen natural y su preocupación por los aditivos sintéticos potencialmente dañinos, hoy en día la demanda mundial de AEs es cada vez mayor (Reyes-Jurado y col. 2015). Sin embargo, el uso de altas concentraciones de AEs o sus compuestos activos como agentes antimicrobianos en frutas y zumos frescos estaría limitado debido a sus efectos adversos sobre las propiedades sensoriales. Por lo tanto, se requieren combinaciones con otros métodos de conservación para disminuir su impacto sensorial adverso manteniendo el efecto antimicrobiano (Raybaudi-Massilia y col. 2009).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del tratamiento combinado de temperatura moderada, ultrasonidos (US) y aceites esenciales (AEs) sobre la calidad microbiológica y físico-química de zumos naturales (ZNs).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar y modelar matemáticamente el efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela (AEC) sobre la inactivación de *S. cerevisiae*. Optimizar los parámetros del tratamiento en caldo de cultivo TSB y comparación en zumo natural de naranja (ZnN).

Determinar la máxima concentración de aceite esencial de hoja de canela (AEC) aceptada por los consumidores en zumos naturales (ZNs).

Determinar el efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela (AEC) sobre la inactivación de *S. cerevisiae* en zumo natural de naranja (ZnN) y en zumo natural de granada (ZnG).

Determinar el efecto de la sonicación sobre los parámetros físico-químicos, los compuestos bioactivos, la calidad microbiológica y la vida útil del zumo natural de naranja (ZnN).

Determinar el efecto de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela (AEC) sobre los parámetros físico-químicos, compuestos bioactivos y su estabilidad en el zumo natural de naranja (ZnN) y en el zumo natural de granada (ZnG) empleando la metodología de superficie de respuesta (MSR).

Determinar el efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela (AEC) sobre la inactivación de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82 en zumo natural de manzana (ZnM).



## RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de la sonicación combinada con temperaturas moderadas y con antimicrobianos naturales sobre la inactivación de un microorganismo alterante, *Saccharomyces cerevisiae*, y dos microorganismos patógenos, *Escherichia coli* O157:H7 5297 y *Listeria monocytogenes* LM82, en zumos naturales (ZNs) de naranja, de granada y de manzana (ZnN, ZnG y ZnM, respectivamente) y su posterior supervivencia en condiciones de refrigeración. Se ha estudiado el efecto de estos tratamientos sobre las propiedades físico-químicas, el contenido en compuestos bioactivos, la actividad antioxidante y la microflora natural de ZNs y la posterior estabilidad de algunos parámetros de calidad y compuestos bioactivos en condiciones de refrigeración.

Se ha determinado la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *S. cerevisiae* frente al aceite esencial de hoja de canela (AEC) mediante el seguimiento en el tiempo de la densidad óptica (DO) del cultivo en placa de microtitulación (microtiter). Se ha estudiado la inactivación de *S. cerevisiae* en caldo de Tristona-Soja (TSB) tratado por termosonicación (24 kHz; 105  $\mu$ m; 33,31 W/mL; 30 minutos; 30°, 40°, 50°C) combinado con AEC para optimizar los parámetros y se ha comparado con la supervivencia de *S. cerevisiae* en ZnN. Se ha modelado matemáticamente la supervivencia de *S. cerevisiae* en TSB y en ZnN ajustando los datos experimentales usando los modelos "Shoulder+log-linear" y "Weibull" (GInaFiT). Se ha determinado por análisis sensorial la concentración máxima de AEC aceptada por los consumidores en ZnN y ZnG. Se ha estudiado la inactivación de *S. cerevisiae* en los ZNs con termosonicación (24 KHz; 33,31 W/mL; 30 minutos; 50°C) y la concentración de AEC aceptada por los panelistas así como su supervivencia bajo condiciones de refrigeración (5°C, 28 días). Se sometió a sonicación (24 kHz; 105  $\mu$ m; 33,31 W/mL; 1, 10, 20 y 30 minutos; <46°C) ZnN recién exprimido para evaluar su impacto sobre las propiedades físico-químicas, los compuestos bioactivos, la actividad antioxidante y la microflora natural, así como sobre los atributos sensoriales y la vida útil. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR), en base a un diseño experimental de Box-Behnken de tres factores y tres niveles, para estudiar el efecto de la termosonicación y el AEC sobre los parámetros de calidad del ZnN y del ZnG. Se midieron los parámetros de color, pH, °Brix, se determinó el contenido en fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides

totales y antocianinas monoméricas totales (FT, FvT, CT, AMT, respectivamente), además de la actividad antioxidante después de los tratamientos. También se determinaron los parámetros de color de ambos zumos, los FT de ambos zumos, los CT del ZnN y las AMT del ZnG de las muestras conservadas a 5°C durante 30 días. Se determinó la CMI de varios antimicrobianos naturales contra *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82 mediante el seguimiento en el tiempo de la DO del cultivo en placa de microtitulación (microtiter). Se estudió la inactivación de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82 en ZnM tratado por termosonicación (24 KHz; 33,31 W/mL; 5 minutos; 40°C) y AEC (20 mg/L), y su posterior supervivencia bajo condiciones de refrigeración (8°C, 28 días).

La CMI del AEC para *S. cerevisiae* fue de 650 mg/L. El uso combinado de la termosonicación y del AEC a 50°C mejoró significativamente la inactivación de *S. cerevisiae* en TSB y ZnN, obteniéndose los valores más altos de inactivación en TSB. En general, el ajuste de los datos experimentales a los modelos "Shoulder+log-linear" y "Weibull" fue bueno, con unos valores de  $R^2 \geq 0,90$ . La concentración de AEC aceptada por los panelistas en los ZNs fue de 20 mg/L. El tratamiento más eficaz para inactivar *S. cerevisiae* fue la combinación de US y de AEC (20 mg/L) durante 30 minutos a 50°C, pues, de una población inicial de 5,13 log ufc/mL, se lograron reducciones logarítmicas significativas de  $2,81 \pm 0,19$  en ZnG y de  $2,52 \pm 0,26$  en ZnN. Durante el almacenamiento en refrigeración (5°C; 28 días), la población de *S. cerevisiae* en ZnN y ZnG, tratados con AEC y US a 50°C durante 30 minutos, disminuyó  $1,55 \pm 0,19$  y  $0,68 \pm 0,16$  log, respectivamente. La sonicación del ZnN durante 10, 20 y 30 minutos, tiempo durante el cual la temperatura se elevó a 43-45°C, mostró una mejora en la mayoría de los compuestos bioactivos en comparación con las muestras tratadas durante 1 minuto y las muestras sin tratar. También se registraron diferentes reducciones microbianas significativas en función de los tiempos de sonicación. En las condiciones de proceso utilizadas en el estudio en el que se empleó la MSR, los ajustes de los modelos simplificados desarrollados a los datos experimentales obtenidos de los parámetros de color, pH, °Brix y el contenido en FT, FvT, CT, AMT y la actividad antioxidante se correlacionaron estrechamente ( $R^2_{aj} > 0,92$ ); pero alguno de los parámetros de calidad determinados ( $^{\circ}\text{BRIX}_{zgra}$ ;  $\text{IC}_{znar}$ ;  $\text{pH}_{znar}$ ;  $\% \text{Inh}_{znar}$ ;  $\text{FT}_{t30zgra}$ ;  $\% \text{Inh}_{zgra}$ ) tuvieron un menor grado de ajuste ( $R^2_{aj}$  entre 0,84 y 0,89). Durante el estudio de estabilidad bajo condiciones de refrigeración, los  $\text{CT}_{t30}$  y los parámetros de color ( $t_{30}$ ) de ambos zumos

fueron los parámetros de calidad con menor grado de ajuste a los modelos simplificados ( $R^2_{aj} < 0,30$ ). En TSB, el AEC fue el antimicrobiano más efectivo inhibiendo el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 y de *L. monocytogenes* LM82. *L. monocytogenes* LM82 fue la bacteria más sensible, excepto para el componente limoneno del que se necesitó una menor concentración para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297. En el ZnM, se obtuvo una reducción significativa de la población microbiana en comparación con los controles para *E. coli* O157:H7 5297. El tratamiento más efectivo para inactivar las células bacterianas fue la combinación de US y AEC durante 5 minutos a 40°C, obteniéndose una reducción logarítmica significativa de  $0,87 \pm 0,07$  y  $5,39 \pm 0,17$  para *L. monocytogenes* LM82 y *E. coli* O157:H7 5297 respectivamente. Al final del periodo de refrigeración (8°C, 28 días), se obtuvieron valores 0 en los recuentos de células viables de *E. coli* O157:H7 5297 en ZnM tratado con US y AEC a 40°C durante 5 minutos.

Los resultados del presente estudio indican que la sonicación combinada con temperatura moderada y AEC puede emplearse como una técnica adecuada para el procesamiento de ZNs, y se pueden aplicar para mejorar su seguridad y calidad nutricional. El diseño Box-Behnken y la MSR han demostrado ser una técnica eficaz para modelar el efecto de la termosonicación en la calidad de los zumos naturales de fruta y en reducir al mínimo el número de experimentos requeridos.





## ABSTRACT

Minimal inhibitory concentration of cinnamon leaf essential oil against *S. cerevisiae* was determined using absorbance measurements based on the microtiter plate assay. It has been evaluated and modelled the survival of *S. cerevisiae* in Trypticase Soy Broth and natural orange juice processed by combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil. The resistance of *S. cerevisiae* cells to the combined action of thermal treatment and ultrasound was analyzed in Trypticase Soy Broth with different concentrations of cinnamon leaf essential oil at 30, 40 and 50°C. It were selected the best conditions of inactivation in TSB to study the inactivation of *S. cerevisiae* in natural orange juice. Experimental data were fitted by using the “Shoulder+log-linear” and “Weibull” models (GInaFiT). The maximum concentration of cinnamon leaf essential oil accepted by consumers in natural orange and pomegranate juices was determined by sensory analysis. The inactivation of *S. cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices untreated (control) and treated with mild temperature (50°C), cinnamon leaf essential oil, thermo-ultrasound (24 KHz; 33.31 W/mL; 30 minutes; 50°C), or thermo-ultrasound plus cinnamon leaf essential oil and its survival under refrigerated conditions (5°C, 28 days) were studied. Freshly squeezed orange juice was sonicated (for 1, 10, 20 and 30 minutes at 24 kHz frequency) to evaluate its impact on selected physico-chemical characteristics and bioactive compounds, such as total phenols, flavonoids, DPPH radical scavenging activity, total carotenoids, ascorbic acid, pH, °Brix and color parameters. Additionally, the effects of sonication treatments on the microbial load were also evaluated. It has been used response surface methodology to study the effect of thermosonication and essential oil on orange and pomegranate juice quality parameters. Natural fresh orange and pomegranate juice samples were continuously sonicated at a constant frequency of 24 kHz for a range of processing temperatures (50–60°C), amplitude levels (0–100%) and CLEO (0–320 mg/L). Color parameters (CI, TINT, %YE, %BLUE, %RED), pH, °Brix, total phenols, flavonoids, carotenoides, anthocyanins content were measured. Response surface methodology (RSM) based upon a three-factor, three-level Box–Behnken experimental design was used to determine the effect of independent variables. Minimal inhibitory concentration of essential oils against *L. monocytogenes* LM82 and *E. coli* O157:H7 5297 was determined using absorbance measurements based on the microtiter plate

assay. It has been evaluated the survival of *L. monocytogenes* LM82 and *E. coli* O157:H7 5297 in natural apple juice processed by combined use of thermo-ultrasound and essential oils. The resistance of *L. monocytogenes* LM82 and *E. coli* O157:H7 5297 cells to the combined action of thermal treatment and ultrasound, was analyzed in natural apple juice with cinnamon leaf essential oil at 40°C.

The combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil enhanced the inactivation of *S. cerevisiae* in TSB and natural orange juice, obtaining the best results in TSB. The most effective treatment to inactive yeast cells was the combination of ultrasound and cinnamon leaf essential oil during 30 minutes at 50°C, which, from an initial population of 5.13 log cfu/mL, achieved significant 2.81±0.19 and 2.52±0.26 log reductions in natural pomegranate and orange juices respectively. During refrigerated storage (5°C, 28 days), the *S. cerevisiae* population in orange and pomegranate juices, treated with ultrasound and cinnamon leaf essential oil at 50°C for 30 minutes as previously described, decreased 1.55±0.19 and 0.68±0.16 log respectively. Sonication of natural orange juice samples for 10, 20 and 30 minutes, times which the temperature rose to 43-45°C, showed enhancement in most of the bioactive compounds compared to samples treated for 1 minute and control samples (untreated). Significant reductions in the microbial load corresponding to sonication time were also recorded. Under process conditions used in this study, the most of the model predictions developed for colour values and bioactive compounds were closely correlated ( $R^2 > 0.92$ ) to experimental data. The combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil enhanced the inactivation of *L. monocytogenes* LM82 and *E. coli* O157:H7 5297 in natural apple juice.

Results of the present study indicate that sonication coupled with mild temperatures and natural antimicrobial may be employed as a suitable technique for fruit juice processing, and may be applied to improve their safety and nutritional quality. Box–Behnken design and RSM was demonstrated to be an effective technique to model the effect of sonication on juice quality while minimising the number of experiments required.

# **CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL EFECTO COMBINADO DE LA TERMOSONICACIÓN Y EL ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA SOBRE LA INACTIVACIÓN DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN CALDO DE CULTIVO Y EN ZUMO NATURAL DE NARANJA**

## **1.1. Justificación del estudio**

Las levaduras son un grupo de microorganismos responsables del deterioro de los alimentos, en algunos casos son un serio problema para la industria alimentaria, ya que hace a los productos no aceptables para el consumo humano y produce graves pérdidas económicas. Las levaduras son alterantes de gran importancia en los alimentos con pH bajo, alto contenido en azúcar, alto contenido en sal y en aquellos que contienen los conservantes sorbato o benzoato (Loureiro, 2000; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003; Marx y col., 2011; Praphailong y Fleet, 1997). El deterioro es causado por la fermentación alcohólica con la producción de CO<sub>2</sub>, sulfuro de hidrógeno y otros gases que provocan malos olores (Basak y col., 2002), alterando así las propiedades sensoriales de los alimentos como resultado de la actividad metabólica de las levaduras (Loureiro y Querol, 1999).

*S. cerevisiae* es una importante levadura responsable del deterioro de alimentos en la industria alimentaria (Marx y col., 2011; Patrignani y col., 2009; Tournas y col., 2006; Tudor y Board, 1993) incluso en condiciones de refrigeración (Goh y col., 2007). Hoy en día, la pasteurización a alta temperatura durante un corto periodo de tiempo (95-98°C, 20-30s) es el método más común para el procesamiento de los alimentos ácidos con el fin de inactivar microorganismos y enzimas. Sin embargo, los tratamientos térmicos intensos pueden alterar las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos (Ashokkumar y col., 2008; Soria y Villamiel, 2010).

Hoy en día, debido a la creciente demanda de alimentos frescos y de mayor calidad, se ha incrementado el interés por las tecnologías de procesamiento no térmico destinadas a la inactivación de microorganismos pero con cambios insignificantes en el valor nutricional y organoléptico de las materias primas. Por ello, la industria

alimentaria está interesada en el desarrollo de tecnologías emergentes de procesamiento moderado como la luz ultravioleta, los campos eléctricos y magnéticos pulsados, alta presión hidrostática, US, etc., no sólo para obtener alimentos de alta calidad con características similares a las de los productos frescos, sino también alimentos con propiedades mejoradas y/o nuevas (Patrignani y col., 2009). Entre estas tecnologías emergentes, se ha prestado durante los últimos años especial atención al US (Piyasena y col., 2003) como una posible tecnología emergente de conservación en combinación con otras barreras para alcanzar el efecto de inactivación deseado.

Después de varias décadas utilizando conservantes sintéticos, y debido a la creciente demanda por parte de los consumidores de sustituirlos por aditivos alimentarios naturales, se están proponiendo a los AEs como una buena alternativa para la conservación de alimentos (Chanthaphon y col., 2008; Kloucek y col., 2012; Nanasombat y Wimuttigosol, 2011; Tserennadmid y col., 2011; Viuda-Martos y col., 2008), ya que los AEs tienen un amplio espectro antimicrobiano de acción contra bacterias, mohos y levaduras, y además, la mayoría de ellos son considerados como sustancias GRAS (Prakash y col., 2012; Singh y col., 2010) y son aceptados por los consumidores a ciertas concentraciones en los alimentos (Fisher y Phillips, 2008). Sin embargo, el uso de estos compuestos a nivel comercial es aún limitada debido a varios factores como el impacto en los atributos sensoriales o, en algunos casos, cuestiones reglamentarias relativas a su uso. Por ello, para mejorar la actividad antimicrobiana, los AEs y/o sus componentes se han utilizado en combinación con otros agentes antimicrobianos naturales y tratamientos moderados emergentes (Raybaudi-Massilia y col., 2009).

El objetivo específico del estudio fue determinar la letalidad del efecto combinado del US, el AEC y el tratamiento térmico moderado sobre *S. cerevisiae* en caldo de cultivo y en zumo natural de naranja.

## **1.2. Diseño experimental y metodología**

### **1.2.1. Preparación de los inóculos**

La cepa de *S. cerevisiae* fue aislada e identificada por Valverde y col. (2010) y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en viales Microbank™ (Pro-labo Diagnostics, Neston, Wirral, UK). Cada dos meses se abrió uno de los viales, se cultivó el cultivo madre en TSB (Cultimed, Barcelona, Spain) durante 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$  y se sembró en placas de PCA (Cultimed, Panreac Barcelona, Spain) con cloranfenicol (Cf) a  $0,1\text{ g/L}$  (Tournas y col., 1998). Los inóculos de *S. cerevisiae* se prepararon mediante la transferencia de una colonia obtenida en placa de PCA-Cf a TSB, que se incubó durante 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$  antes de ser almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  en una solución de TSB:Glicerol (40:60%). Los cultivos frescos para los experimentos se realizaron con un asa de siembra estéril por incubación en TSB de una colonia de un cultivo puro durante 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ . Los inóculos se estandarizaron por dilución en TSB hasta una densidad óptica (DO) de 0,1 a 600 nm (Nicolet Evolution 300, Thermo Electron Corporation) que equivale a una concentración de levadura de  $10^7\text{ ufc/mL}$ . Las poblaciones de levadura se estimaron mediante la difusión de alícuotas diluidas adecuadas sobre placas PCA-Cf, seguido de incubación a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.

### **1.2.2. Preparación de las soluciones madre de aceite esencial de hoja de canela (AEC)**

El AEC ( $\rho= 1,0524\text{ g/mL}$ ; GC-FID: 74,32% eugenol, 2,98% bencil benzoato, valores nominales) fue donado por Destilerías Muñoz Gálvez, SA (Murcia, España). Las soluciones madre se prepararon siguiendo la metodología de Souza y col. (2005), utilizándose Tween 20 (0,8%). Las concentraciones ensayadas fueron 5.200, 2.600, 1.300, 650, 320, 160, 80, 40, 20, 10 y 0 mg/L (control).

### **1.2.3. Actividad antimicrobiana del AEC. Determinación de la CMI, de las CPIs y del %IC**

Se determinó la CMI del AEC contra *S. cerevisiae* mediante el seguimiento en el tiempo de la DO del cultivo en placas de microtitulación (microtiter) de 96 pocillos

(Sarstedt Ltd.). El ensayo se basó en trabajos anteriores (Gutierrez y col., 2009) con algunas modificaciones. A cada uno de los pocillos se añadió 150 µL de TSB. Alícuotas (150 µL) de las soluciones madre de AEC se añadieron al primer pocillo de la primera columna de una placa de microtitulación y se diluyeron 1/2 a lo largo de cada fila. Por último, se añadió 150 µL de TSB con una concentración de *S. cerevisiae* de  $\sim 10^5$  ufc/mL a los pocillos. Para los controles positivos, se añadió al pocillo 150 µL de TSB estéril y 150 µL de TSB con una concentración de  $\sim 10^5$  ufc/mL de inóculo. Para los controles negativos, se añadió al pocillo 150 µL de concentraciones de AEC y 150 µL de TSB estéril. Las microplacas se colocaron en el espectrofotómetro de microplacas Multiskan Ascent® (Thermo Electron Corporation) ajustado a 25°C. La DO se registró a 595 nm cada hora durante un período de incubación de 24 h. Para determinar la actividad antimicrobiana de cada concentración ensayada, se comparó el área debajo de la curva DO/tiempo del control con las áreas de las pruebas y se expresó como %IC. La CMI se consideró como la concentración más baja de AEC que causó el 100 %IC. Se consideró como CPI a cualquier concentración de AEC inferior a la MIC<sub>100</sub> que produjo una inhibición del crecimiento de entre el 0% y el 100% (Cava-Roda y col., 2012b). Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en mg/L.

#### **1.2.4. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre *S. cerevisiae***

Los tratamientos termosonicación se llevaron a cabo en un vaso cilíndrico de doble pared (diámetro interior de 4 cm; altura de 6,5 cm), por la que se hizo circular agua refrigerada con un baño (modelo Digit-Cool JP Selecta®) para alcanzar y fijar la temperatura de 30, 40 ò 50°C. La temperatura del baño de refrigeración se fijó adecuadamente para cada uno de los tratamientos de termosonicación y fue controlada con un termómetro esterilizado para mantener la temperatura deseada en la muestra tratada. El US (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL; 30 minutos) se aplicó continuamente con un procesador ultrasónico UP200H (Hielscher Ultrasound Technology) usando una sonda S3 (Hielscher). El efecto de los tratamientos también se ensayó con concentraciones de AEC de 650, 320,160, 80, 40 y 0 mg/L. Para cada tratamiento, se inoculó TSB estéril, previamente calentado a la temperatura deseada, con una población de *S. cerevisiae* ( $\sim 10^5$  ufc/mL). Durante cada uno de los tratamientos, se tomaron

alícuotas a intervalos fijos y se hicieron diluciones decimales seriadas en agua de peptona. Se realizaron tres réplicas por tratamiento. Los recuentos de células viables se determinaron inmediatamente después de cada intervalo de tiempo hasta el final del tratamiento utilizando el método de vertido en placa con PCA-Cf. Se hicieron dos placas por dilución y se incubaron a 25°C durante 48 h (Ciccolini y col., 1997; Gastélum y col., 2012; Guerrero y col., 2001a; Guerrero y col., 2005; López-Malo y col., 1999; López-Malo y col., 2005b).

Después de los tratamientos en TSB, se seleccionaron las mejores condiciones de tratamiento para estudiar la inactivación de *S. cerevisiae* en ZnN (pH: 3,97±0,01; °Brix: 11,6±0,15). El proceso experimental fue el mismo que el descrito anteriormente. Las naranjas se recogieron en un huerto local (Beniaján, Murcia, España), se mantuvieron a 5°C durante 1 día antes de la elaboración del zumo y los frutos dañados se descartaron. Las frutas se lavaron con agua antes de secarlas. Las naranjas se exprimieron (Citro Nueva 100W, Solac) en condiciones asépticas. El ZnN se pasteurizó y se almacenó en la oscuridad a -20°C hasta los tratamientos de termosonicación. Siguiendo el procedimiento descrito por Ait-Ouazzou y col. (2013), se utilizó un método de agitación vigorosa mediante un agitador (TECH TQ, agitador magnético multipunto, España) para preparar las muestras de ZnN con AEC.

#### **1.2.5. Ajuste de las curvas a los modelos “Shoulder+log-linear” y “Weibull”**

Las curvas de supervivencia se obtuvieron graficando el logaritmo de los supervivientes frente al tiempo. Los valores D (tiempo para inactivar el 90% de la población) se determinaron a partir de la porción lineal de las curvas de supervivencia graficando el logaritmo de los supervivientes frente al tiempo. Los datos que no se ajustaban adecuadamente al modelo lineal habitual de destrucción térmica, se ajustaron por los modelos “Shoulder+log-linear” y “Weibull”. GInaFiT, un programa gratuito para Microsoft Excel, se utilizó para modelar la cinética de inactivación (Geerard y col., 2005). El modelo “Shoulder+log-linear” tomó en cuenta un hombro antes de una disminución en el tamaño de la población y los datos se ajustaron utilizando la ecuación (Ec.1.1) de Geerard y col. (2000):



$$N = N_0 * \exp(-k_{\max} * t) * \left( \frac{\exp(k_{\max} * S1)}{1 + (\exp(k_{\max} * S1) - 1) * \exp(-k_{\max} * t)} \right) \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde;

N es la concentración de células (ufc/mL) después de un tiempo de tratamiento t (minutos),  $N_0$  es la concentración inicial de células (ufc/mL),  $k_{\max}$  es la tasa máxima de inactivación ( $\text{minutos}^{-1}$ ), y S1 es la longitud del hombro (minutos) (i.e., la longitud de la fase de latencia).

El otro modelo de supervivencia probado era la forma acumulativa de la distribución de Weibull (Ec. 1.2). Los datos de supervivencia se ajustaron utilizando la ecuación descrita por Mafart y col. (2002):

$$\text{Log}_{10}(N_{(t)}) = \text{Log}_{10}(N_0) - \left( \left( \frac{t}{\delta} \right)^{\rho} \right) \quad (\text{Ec. 1.2})$$

donde:

t (minutos) es el tiempo,  $N_{(t)}$  (ufc/mL) es la concentración de células como una función del tiempo,  $N_0$  (ufc/mL) es la concentración inicial de células,  $\delta$  o parámetro de escala es el tiempo que lleva a la primera reducción de 10 veces de la población superviviente y  $\rho$  es el parámetro de forma. Cuando  $\rho > 1$ , la curva de supervivencia muestra una forma convexa,  $\rho < 1$  significa una forma cóncava y  $\rho = 1$  corresponde a la forma log-lineal.

### 1.2.6. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza del efecto del tratamiento sobre la reducción logarítmica de *S. cerevisiae* y los valores  $D_{50}$ . Estos análisis se realizaron con el programa Statgraphic Plus para Windows 3.0®, versión 5.0 (StatPoint, Inc., Herndon, Va.). Los resultados se consideraron significativos a valores de  $p < 0,05$ .

### 1.3. Resultados y discusión

#### 1.3.1. Actividad antimicrobiana del AEC. Determinación de la CMI, de las CPIs y del %IC

Las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en TSB suplementado con diferentes concentraciones de AEC e incubadas durante 24 horas a 25°C en el microtiter se muestran en la Figura 1.1. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue 650 mg/L, pues inhibió completamente el crecimiento; mientras que las concentraciones de 320, 160 y 80 mg/L lo inhibieron parcialmente, y son consideradas como concentraciones parcialmente inhibitorias (CPIs). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) que produjeron estuvo en función de la concentración empleada. Estas CPIs son importantes en Tecnología de Alimentos, pues podrían ser combinadas con tecnologías no térmicas para conseguir la inactivación microbiana en los alimentos, sin afectar negativamente a su calidad sensorial, que es una de las principales limitaciones que tiene el empleo de los AEs en la industria alimentaria.

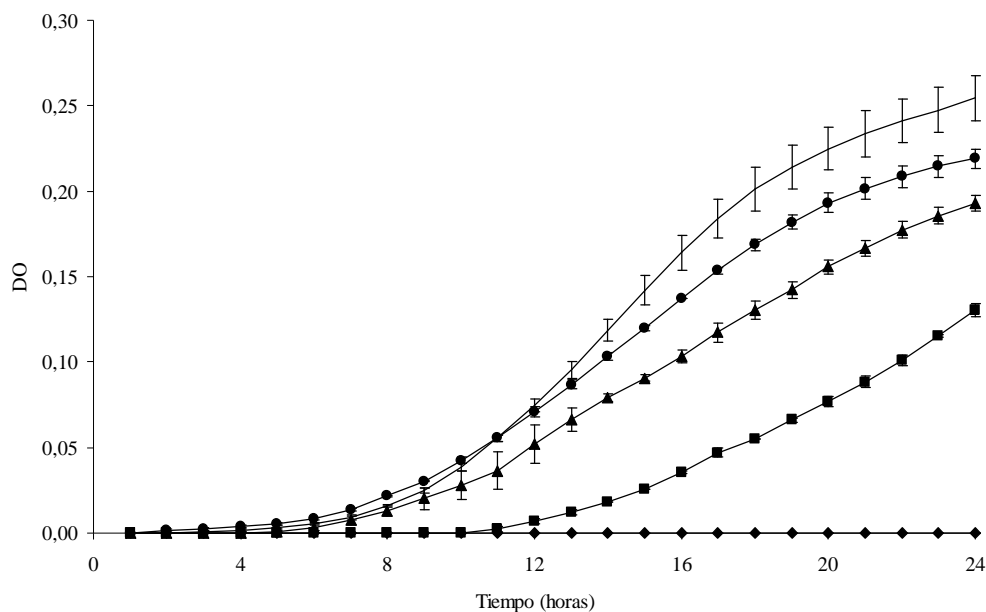


Figura 1.1. Crecimiento de *S. cerevisiae* en TSB con diferentes concentraciones de aceite esencial de hoja de canela (◆ 650 mg/L, ■ 320 mg/L, ▲ 160 mg/L, ● 80 mg/L, — control).

La Tabla 1.1 muestra la CMI, las CPIs y los %IC de *S. cerevisiae* en TSB a 25°C/24h. Las concentraciones de 40, 20 y 10 mg/L no produjeron inhibición del crecimiento.

**Tabla 1.1. Concentración mínima inhibitoria, concentraciones parcialmente inhibitorias y porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* en TSB a 25°C/24h.**

	AEC (mg/L)	%IC
CMI	650	100,00
	320	69,36
CPIs	160	30,59
	80	11,97

Nuestros resultados concuerdan con la bibliografía consultada. Los principales constituyentes del AEC utilizado en este ensayo son eugenol (74,32%) y benzoato de bencilo (2,98%), porcentajes similares a los encontrados por otros autores (Ranasinghe y col., 2002; Suhr y Nielsen, 2003). Darvishi y col. (2013) determinaron la CMI del eugenol (Sigma-Aldrich; Oakville, ON, Canada) sobre *S. cerevisiae* (cepa S288C) por el ensayo de microdilución en caldo de cultivo y obtuvieron una CMI para el eugenol en el intervalo de 270–320 mg/L. El mecanismo de acción de los fenilpropanoides, tales como el eugenol, el metil-eugenol, y el metil-chavicol, debe ser similar a los terpenos y compuestos fenólicos e implicaría la disrupción de la membrana citoplasmática y la coagulación del contenido celular (Bakkali y col., 2008; Pauli, 2001; Sukatta y col., 2008). Específicamente, la actividad antimicrobiana del eugenol se atribuye a su núcleo aromático y al grupo -OH fenólico, los cuales se sabe que son reactivos y pueden formar enlaces de hidrógeno con grupos -SH en los sitios activos de los enzimas diana, inactivando algunos enzimas esenciales en hongos (Sukatta y col., 2008). Estructuralmente, la pared celular de levadura es una red compleja de proteínas y polícarbohidratos cuya composición varía dependiendo de la especie de levadura y al interrumpir esta matriz se obtiene una pared celular defectuosa, que se vuelve sensible a la lisis osmótica y a los agentes antimicrobianos (Bowman y Free; 2006; Lipke y Ovalle, 1998; Yen y Chang, 2008). En los últimos años, se han realizado diferentes estudios con el fin de dilucidar el mecanismo de acción de los AEs de plantas y sus

componentes tanto en la membrana como en la pared de las células de bacterias, mohos y levaduras. Bennis y col. (2004) estudiaron la alteración inducida por timol y eugenol en células de *S. cerevisiae*, y llegaron a la conclusión de que la actividad antifúngica de ambos antimicrobianos implica alteraciones tanto de la membrana como de la pared celular de la levadura. Este efecto depende de la etapa de proliferación celular, específicamente el tratamiento con eugenol altera las estructuras de la membrana celular y la pared celular de las células proliferativas de *S. cerevisiae* ocasionando la liberación del contenido celular. Por otro lado, el eugenol, al igual que el cinamaldehído, inhibe el crecimiento de la levadura, ya sea bloqueando la síntesis de la pared celular o alterando la estructura de la misma, lo que resulta en la disfunción de la pared celular y en el aumento de la permeabilidad, causando la muerte de las células de levadura (Bang y col., 2000; Wang y col., 2005; Yen y Chang, 2008). Se ha determinado que el eugenol interfiere con los transportadores responsables de la captación de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada a través de la membrana citoplasmática de *S. cerevisiae* (Darvishi y col., 2013).

### **1.3.2. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre *S. cerevisiae***

La Figura 1.2 muestra las reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* obtenidas en TSB por aplicación de diferentes tratamientos: temperatura (30-40-50°C), US (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL) y AEC (650, 320, 160, 80, 40 y 0 mg/L). Todos los tratamientos duraron 30 minutos. Se obtuvieron reducciones pequeñas pero significativas ( $p < 0,05$ ) en TSB con 0 mg/L de AEC cuando se aplicó la temperatura de 50°C sin US durante 30 minutos. Ningún efecto se observó a temperaturas de 30 y 40 °C en las mismas condiciones. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la reducción logarítmica ( $p < 0,05$ ) cuando las mismas temperaturas se combinaron con diferentes concentraciones de AEC. La aplicación de termosonicación también mejoró el efecto letal de todos los tratamientos y se observaron diferencias significativas para todas las combinaciones probadas. La reducción logarítmica más alta (5,13 ciclos logarítmicos) se obtuvo mediante la aplicación durante 30 minutos de termosonicación a 50°C y concentraciones de 650 ó 320 mg/L de AEC.

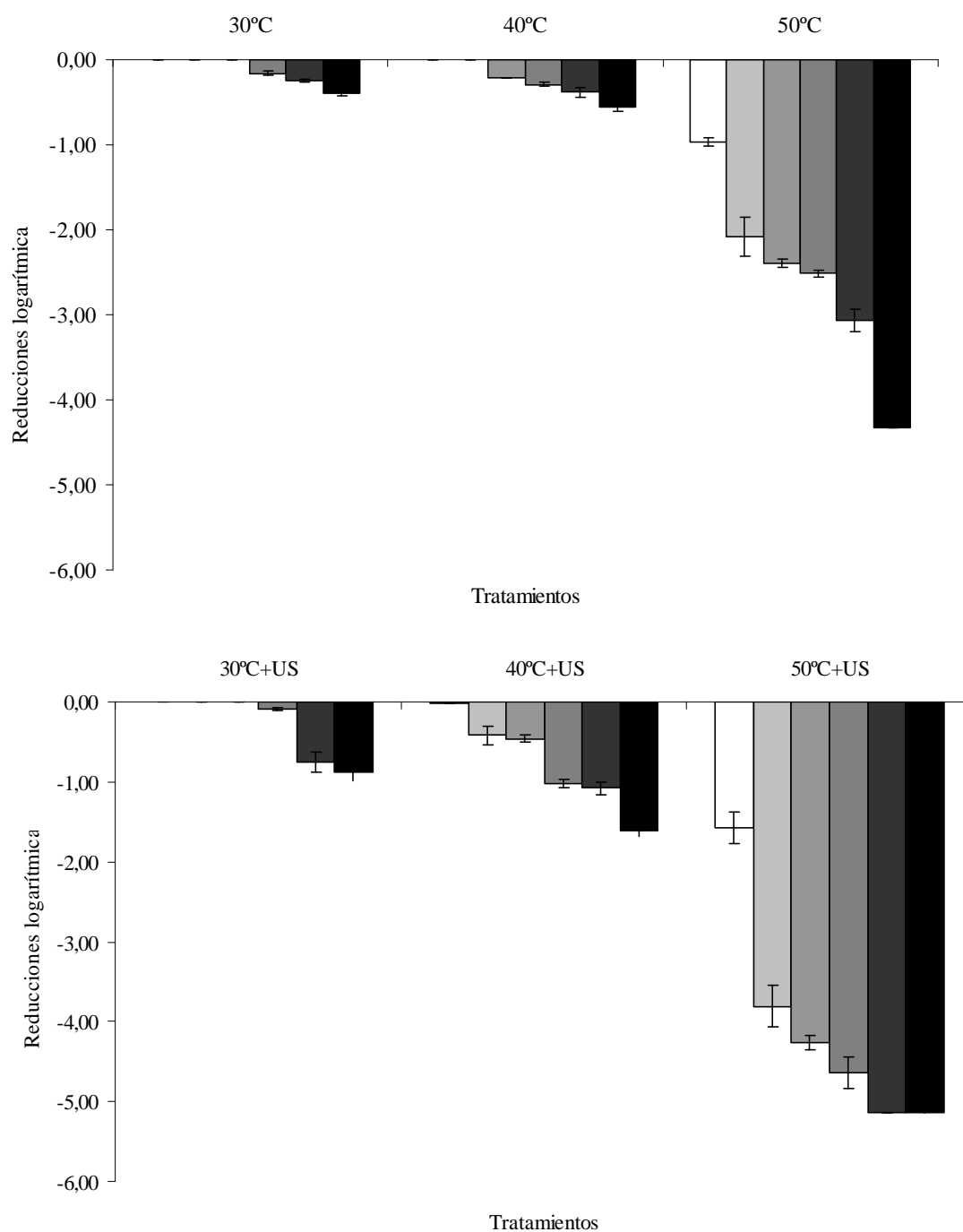
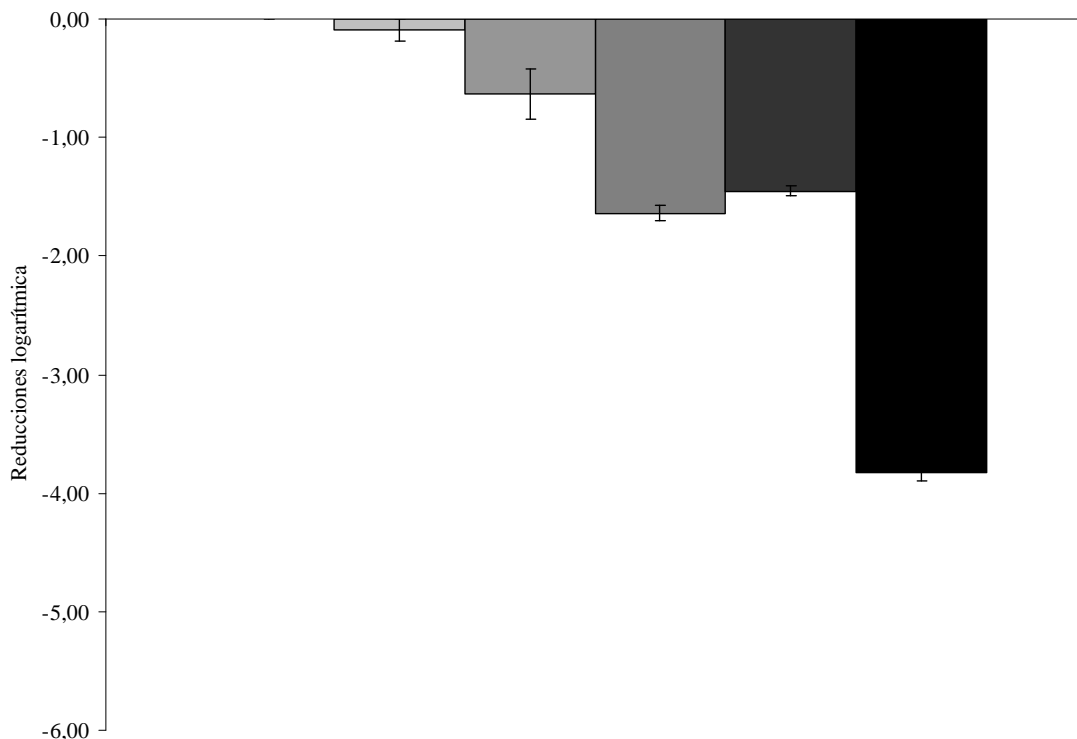


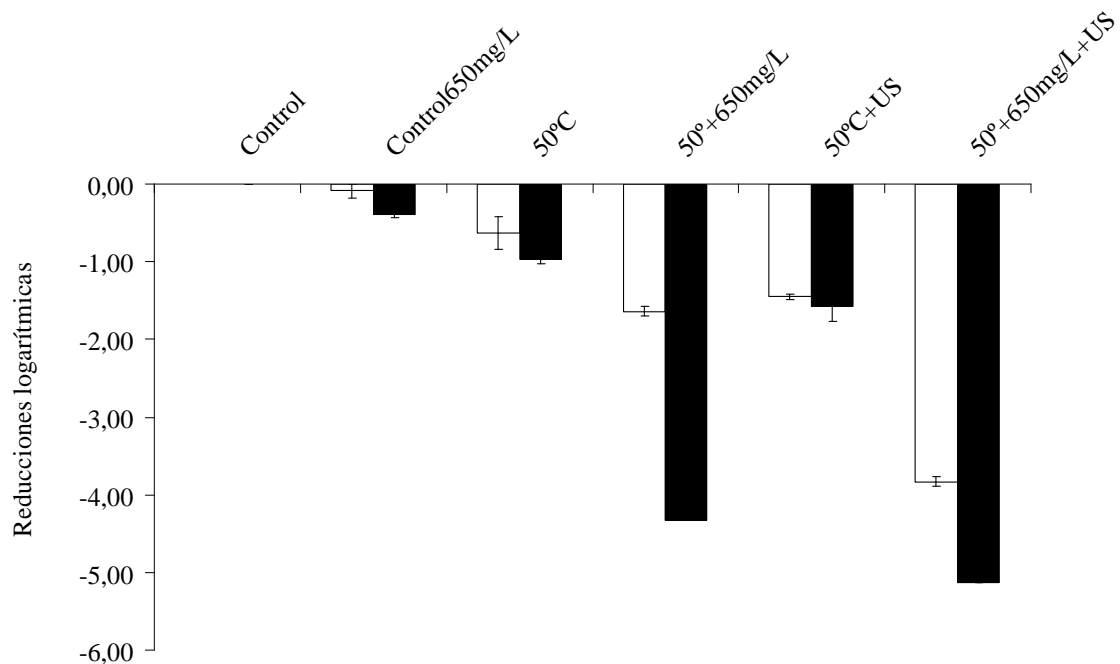
Figura 1.2. Reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* obtenidas por aplicación de tratamientos de termosonicación (24 kHz; 105  $\mu$ m; 33,31 W/mL; 30°, 40° y 50°C; 30 minutos) en TSB con aceite esencial de hoja de canela ( $\square$  0 mg/L;  $\square$  40 mg/L;  $\square$  80 mg/L;  $\square$  160 mg/L;  $\blacksquare$  320 mg/L;  $\blacksquare$  650 mg/L).

La Figura 1.3 muestra las reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* obtenidas en el ZnN tratado mediante la aplicación de temperatura (50°C), US (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL) y AEC (650 ó 0 mg/L). Todos los tratamientos duraron 30 minutos. El valor más alto de inactivación fue de ~ 3,8 unidades logarítmicas y se obtuvo con el tratamiento combinado de 50°C+650 mg/L+US.



**Figura 1.3.** Efecto de la sonicación (24 kHz, 105 µm, 33,31 W/mL), la temperatura (50°C) y el aceite esencial de hoja de canela en la supervivencia de *S. cerevisiae* en zumo natural de naranja (pH: 3,97; °Brix: 11,6) (□control; □control+650mg/L; ■50°C; ■50°C+650mg/L; ■50°C+US; ■50°C+650mg/L+US).

Comparando el efecto de los tratamientos en TSB y ZnN, se puede observar que los valores más altos de inactivación fueron de 5,13 unidades logarítmicas y se obtuvieron en TSB con 650 mg/L de AEC y tratado por termosonicación a 50°C durante 30 minutos (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* obtenidas mediante tratamientos de sonicación (24 kHz; 105  $\mu$ m; 33,31 W/mL), temperatura (50°C) y aceite esencial de hoja de canela (0 y 650 mg/L) en TSB (■) y en zumo natural de naranja (□).**

La eficacia del US en la inactivación de diversas cepas de *S. cerevisiae* a temperaturas bajas (23-35°C) y moderadas (35-55°C), a diferentes amplitudes de onda (71-124  $\mu$ m) y W/m/L (0,252 a 822,24) y tiempo de tratamiento (5-200 minutos) ha sido estudiada por varios autores, los cuales obtuvieron reducciones logarítmicas que oscilaron entre 0,5 y ~ 4 (Ciccolini y col., 1997; Guerrero y col., 2001a; López-Malo y col., 1999; López-Malo y col., 2005b; Raso y col., 1998a; 1998b). Nuestros resultados concuerdan con los datos anteriores, pues se obtuvo en TSB una reducción log significativa de 1,32 log a 50°C y una reducción significativa de 2,52 log a 50°C en combinación con el US. Se puede concluir que la combinación de temperaturas moderadas y US mejora la eficacia del US.

La bibliografía consultada informa que se ha estudiado el efecto combinado de temperatura moderada (40-60°C), el US (de 60 a 105  $\mu$ m; de 33,31 a 167,72 W/mL) y antimicrobianos (EDTA, benzoato de sodio, sorbato de potasio, extractos de cítricos,

vainillina, quitosano, AE de canela de china y de Ceylan) en diferentes cepas de bacterias, hongos y levaduras (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Fusarium oxysporum*, esporas de *Aspergillus flavus* y de *Penicillium digitatum*, levaduras alterantes, *S. cerevisiae*) (Alzamora y col., 2011; Bevilacqua y col., 2013; Bevilacqua y col., 2014; Gastélum y col., 2012; Ferrante y col., 2007; Guerrero y col., 2005; López-Malo y col., 2005a, 2005b). Estos estudios reportan que la combinación de US, antimicrobianos y temperaturas moderadas aumentaba la inactivación de las bacterias, los mohos y las levaduras estudiadas. Los resultados reportan reducciones logarítmicas que oscilaron entre ~1,15 y ~5. Concretamente, Guerrero y col. (2001b) y Alzamora y col. (2011) encontraron que la acción combinada del US (95,2  $\mu\text{m}$ ; 167,72 W/mL), la temperatura moderada (45°C) y el AE de canela china (50 mg/L) daba lugar a 2,74 reducciones logarítmicas de la población inicial de *S. cerevisiae* en 20 minutos; mientras que cuando el US se aplicaba a 45°C, solamente se obtenían 0,70 reducciones logarítmicas en 20 minutos de tratamiento. Nuestros resultados están de acuerdo con los estudios previos, pues hemos obtenido que la combinación de AEC y termosonicación causa mayor reducción logarítmica de la población de levadura, especialmente a 50°C (5,13 reducciones log) (Figura 1.2). Estos resultados sugieren que probablemente existe un efecto sinérgico en la inactivación de *S. cerevisiae* entre la temperatura moderada, el US y el AEC.

La comparación de la inactivación obtenida en TSB y ZnN (Figura 1.4 ) muestra resultados similares a los obtenidos por Char y col. (2010), quienes estudiaron la inactivación de *E. coli* en AP (0,1%; w/w) y ZN (pH: 3,4; °Brix: 10) tratado por combinación de temperatura (40°C $\pm$ 1°C) y US (20 kHz, 95.2  $\mu\text{m}$ , 20 minutos) y obtuvieron la mayor reducción logarítmica en AP. Salleh-Mack y Roberts, (2007) determinaron que las muestras con mayores concentraciones de sólidos solubles requieren más tiempo de sonicación para lograr la reducción de 5-log y que el pH es otro factor tiene un efecto significativo en la inactivación microbiana con US en aquellas soluciones con una concentración de sólidos solubles de 12 g/100 mL. Guerrouj y col. (2016) estudiaron el efecto del tratamiento con US (24 kHz) en la calidad microbiana del ZnN y obtuvieron la mayor reducción logarítmica cuando el US se aplicó durante 30 minutos y la temperatura se elevó hasta los 45,6°C.



Se sabe que los factores que influyen en la letalidad de los tratamientos de US son diversos, pudiéndose destacar la influencia de la cepa microbiana, el caldo de cultivo, la aw, el pH, la amplitud de onda, la intensidad, la potencia, la temperatura, el agente antimicrobiano y su concentración, el tiempo de preincubación y la duración del tratamiento (Alzamora y col., 2011; Bevilacqua y col., 2013; Bevilacqua y col., 2014; Ferrante y col., 2007; Gastélum y col., 2011; Guerrero y col., 2001a, 2001b, 2005; López-Malo y col., 2005a; 2005b; Raso y col., 1998a; 1998b), especialmente cuando se utilizan temperaturas bajas (López-Malo y col., 2005b; Luo y col., 2012; Wordon y col., 2012). Además, se sabe que la eficiencia de la cavitación se ve afectada por la reología del fluido, en particular, por la viscosidad, la presión de vapor y la tensión de superficie del caldo de cultivo (Luo y col., 2012). La letalidad de los tratamientos con US también está muy influenciada por la amplitud de las ondas de US (López-Malo y col., 1999); con grandes amplitudes, las burbujas pueden crecer tanto durante la rarefacción que el tiempo disponible para el colapso es insuficiente. Por lo tanto, dependiendo de las propiedades de líquido (presión de vapor, la tensión superficial y viscosidad), el efecto de cavitación puede verse disminuida con las grandes amplitudes (Ciccolini y col., 1997; López-Malo y col., 1999). Sin embargo, la eficiencia de tratamiento con US para inactivar las bacterias por los efectos de la cavitación se puede reducir con un aumento de temperatura (Pagán y col., 1999; Raso y col., 1998b). Por ejemplo, López-Malo y col. (1999) encontraron que, a temperaturas superiores a 50°C, se reducen los beneficios de la aplicación del US, probablemente como resultado del aumento del efecto térmico y de la reducción de la intensidad (potencia) de la cavitación. Esta tendencia podría ser el resultado de un efecto térmico incrementado que, o bien impide el efecto del US o bien disminuye la violencia de la implosión/explosión de las burbujas debido a la mayor presión de vapor a temperaturas más altas (Guerrero y col., 2001a; Sala y col., 1995).

### **1.3.3. Ajuste de las curvas a los modelos “Shoulder+log-linear” y “Weibull”**

Los valores  $D_{50/US}$  (tiempo de reducción decimal a 50°C en combinación con ultrasonido) fueron calculados a partir de las pendientes de las curvas de supervivencia en TSB con 0, 40, 80, 160, 320 y 650 mg/L de AEC. Los valores  $D_{50/US}$  para *S. cerevisiae* variaron desde 4,74 a 17,26 minutos. Los valores  $D_{50/US}$  fueron

significativamente menores cuando las concentraciones de AEC aumentaron (Tabla 1.2). El porcentaje de reducción de  $D_{50/US}$  fue del 73% con la combinación de los tres factores (50°C, US, AEC).

La bibliografía muestra que la combinación de US con temperatura moderada (35-60°C) a diferentes amplitudes de onda (71-107,1  $\mu\text{m}$ ), valores de W/mL (0,33-167,72) y el tiempo (10-200 minutos) mejora la inactivación de *S. cerevisiae* y de esporas de hongos (*Aspergillus flavus* y *Penicillium digitatum*) obteniendo valores D menores (78,7-2,0 minutos). La inactivación de las esporas de hongos es aún mayor en presencia de antimicrobianos naturales durante la termosonicación, como 500 mg/L de vainillina (López-Malo y col., 2005b), resultando en valores D más bajos (78,7-<0,5) (Ciccolini y col., 1997; Guerrero y col., 2001b; López-Malo y col., 1999; López-Malo y col., 2005a). Por otra parte, se ha determinado que la inactivación de *S. cerevisiae* en caldo de cultivo por termosonicación a altas temperaturas generalmente sigue una cinética de primer orden durante la mayor parte del proceso (Guerrero y col., 2001a; Guerrero y col., 2005; López-Malo y col., 1999; López-Malo y col., 2005b), mientras que la combinación de antimicrobianos (AE de canela, vainillina, quitosano) y termosonicación a bajas temperaturas genera curvas de supervivencia no lineales (Guerrero y col., 2005; López-Malo y col., 2005b). López-Malo y col. (2005a) estudiaron la inactivación de las esporas de *Aspergillus flavus* cepa ATCC 16872 y de las esporas de *Penicillium digitatum* cepa LMUDLA-2 por el efecto combinado de la termosonicación (20 kHz; 90  $\mu\text{m}$ ; 167,72 W/mL; 45°C; 9 minutos) y antimicrobianos (vainillina, sorbato potásico), así como la inactivación térmica y también encontraron una cinética de reacción de primer orden en todos los casos.

**Tabla 1.2. Tiempos de reducción decimal a 50°C para la inactivación de *S. cerevisiae* durante los tratamientos de termosonicación ( $D_{50/US}$ ) en TSB con y sin aceite esencial de hoja de canela.**

<b>AEC (mg/L)</b>	<b><math>D_{50/US}</math> (minutos)</b>
<b>650</b>	4,74±0,12 <sup>a</sup>
<b>320</b>	5,50±0,10 <sup>ab</sup>
<b>160</b>	5,96±0,21 <sup>ab</sup>
<b>80</b>	6,53±0,23 <sup>bc</sup>
<b>40</b>	7,44±0,36 <sup>c</sup>
<b>0</b>	17,26±1,39 <sup>f</sup>

Los datos están expresados como media±ds. Todos los valores están expresados como la media de tres réplicas. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los datos.

Para los datos obtenidos en TSB, el ajuste de los modelos no fue bueno para alguna de las condiciones estudiadas (ver Tabla 1.3), con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) inferior a 0,97. Probablemente, se debió al bajo grado de inactivación (menos de 1 ciclo logarítmico) por lo que los errores en los datos experimentales son grandes y el ajuste de los datos no es muy preciso. Sin embargo, ambos modelos, "Shoulder+log-linear" y "Weibull", ajustan con precisión las curvas de supervivencia de la mayoría de los tratamientos (ver Tabla 1.3), con un coeficiente de correlación que va desde 0,97 hasta 0,99 (Tabla 1.3).

Capítulo 1. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo de cultivo y en zumo natural de naranja

Tabla 1.3. Parámetros para las curvas de supervivencia de *S. cerevisiae* en TSB, a diferentes temperaturas, suplementado con aceite esencial de hoja de canela y sometido a sonicación.

Tratamientos	modelo "Shoulder+log-linear"				Modelo Weibull		
	AEC(mg/L)	$k_{max}$ (minutos <sup>-1</sup> )	SI (minutos)	R <sup>2</sup>	$\delta$	$\rho$	R <sup>2</sup>
30°C	650	0,09±0,02	22,05±5.66	0,93	55,52±7,41	1,37±0,29	0,93
	320	0,07±0,04	28,84±4.86	0,90	64,17±12,29	1,90±0,57	0,92
40°C	650	0,21±0,02	23,84±0.97	0,97	35,37±1,16	3,34±0,41	0,97
	320	0,19±0,04	27,40±0.82	0,93	37,35±2,00	4,06±0,79	0,93
50°C	650	0,43±0,03	6,43±1.79	0,97	10,76±1,52	1,48±0,19	0,97
	320	0,38±0,04	11,93±1.72	0,96	17,13±1,33	2,04±0,27	0,97
	160	0,35±0,04	12,65±1.67	0,96	18,22±1,57	2,03±0,33	0,96
	80	0,34±0,03	13,94±1.21	0,98	20,86±0,74	2,32±0,21	0,99
	40	0,30±0,04	16,78±1.38	0,96	23,86±0,73	2,94±0,36	0,97
	0	0,17±0,03	13,44±2.93	0,93	26,60±1,39	1,85±0,39	0,93
	30°C/US	650	0,21±0,03	9,56±5,20	0,92	30,10±1,95	1,41±0,31
	320	0,11±0,03	22,92±1,14	0,95	33,27±0,99	3,42±0,55	0,95
40°C/US	650	0,21±0,02	11,68±1,25	0,99	22,04±0,85	1,80±0,18	0,98
	320	0,15±0,02	11,71±2,05	0,98	27,86±0,92	1,08±0,14	0,98
	160	0,13±0,01	13,01±1,70	0,98	28,69±0,75	1,74±0,18	0,98
	80	0,09±0,03	17,46±6,98	0,91	52,46±8,13	1,11±0,29	0,90
	40	0,07±0,02	20,87±3,73	0,94	47,26±4,51	1,79±0,32	0,95
50°C/US	650	0,51±0,06	1,81±3,60	0,93	4,21±2,01	0,94±0,21	0,92
	320	0,45±0,02	2,75±1,41	0,99	6,65±1,10	1,12±0,11	0,98
	160	0,41±0,02	2,47±1,76	0,98	6,79±1,32	1,08±0,13	0,98
	80	0,38±0,02	2,80±1,68	0,98	7,81±1,30	1,13±0,13	0,98
	40	0,35±0,03	4,47±2,23	0,97	9,86±1,85	1,24±0,19	0,96
	0	0,14±0,03	2,23±6,01	0,91	18,21±3,08	1,09±0,26	0,91

Los valores para las diferentes constantes fueron calculadas con GInaFiT (Geeraerd y col., 2005).

Todos los valores están expresados como la media de tres réplicas±ds.

Los parámetros obtenidos por el primer modelo permitieron concluir que la presencia de AEC aumenta la tasa de mortalidad ( $k_{max}$ ) y reduce la longitud del hombro

(S1) de *S. cerevisiae* en la mayoría de los tratamientos ensayados. Este efecto dependía considerablemente de la concentración de AEC presente en el medio tratado con termosonicación. Los valores de  $K_{max}$  fueron más bajos para la muestra de TSB control que las muestras de TSB con AEC a todas las temperaturas probadas, pero el efecto fue más pronunciado a la temperatura más alta (50°C). La presencia de AEC también redujo la longitud del hombro de *S. cerevisiae* en TSB, pero este efecto fue más variable. Cava-Roda y col. (2012a) estudiaron la cinética de destrucción de *L. monocytogenes* Scott A en leche semi-desnatada con vainillina (0, 900, 1400, 1800 mg/L) y tratada con temperatura moderada (55, 58, 60, 62°C) y encontraron que la presencia de vainillina incrementaba la tasa de mortalidad ( $K_{max}$ ) y reducía la longitud del hombro (S1) de *L. monocytogenes* Scott A a cualquier temperatura testada, especialmente a bajas temperaturas (55, 58°C) y a mayores cantidades de vainillina (1400, 1900 mg/L).

El efecto de los tratamientos combinados también se analizó por medio del modelo de resistencia de distribución de Weibull. Este modelo considera que toda la población microbiana no es igualmente resistente al tratamiento propuesto por lo que cada célula no se destruye al mismo tiempo durante el procesamiento (Cava-Roda y col., 2012a; Peleg y Cole., 1998). Como resultado, la curva de supervivencia es la forma acumulativa de una distribución temporal de los acontecimientos letales donde cada microorganismo individual se inactiva en un momento específico, generando un espectro de resistencias al tratamiento (Peleg y Cole., 1998). La Tabla 1.3 muestra los parámetros  $\delta$  (delta) y  $\rho$  (rho) obtenidos del ajuste del modelo de distribución de Weibull a las curvas de supervivencia así como el coeficiente de correlación ajustado. Los parámetros de la distribución de Weibull,  $\delta$  y  $\rho$ , variaron de acuerdo con la severidad de las condiciones de estrés y los valores de  $R^2$  obtenidos variaron entre 0,90 y 0,99. Nuestros resultados mostraron que los tratamientos con temperatura moderada (30, 40, 50°C) y aplicación de US a *S. cerevisiae* en TSB con y sin AEC produjeron valores de  $\rho$  mayores de 1, lo cual se relaciona con una concavidad hacia debajo de la curva de supervivencia, que en general fue menor con las temperaturas más altas, mayores concentraciones de AEC y aplicación de US. Se ha argumentado (Peleg, 2000) que una posible explicación a las formas de estas curvas podría ser que las células más sensibles se debilitan dejando una gran fracción de células más resistentes que son afectadas en mucha menor medida. Algunas de las curvas de supervivencia predichas de

*S. cerevisiae* correspondientes a los tratamientos con US a 50°C en TSB con AEC muestran valores  $\rho$  próximos a 1, indicando una cinética de inactivación de primer orden. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores que ajustaron los datos de supervivencia de *S. cerevisiae* con el modelo de Weibull. López-Malo y col. (2005b) reportaron que las curvas de supervivencia de *S. cerevisiae* KE162 tratada con US (20 kHz; 95.2  $\mu\text{m}$ ; 822,24 W/mL; 35°C; 25 minutos) en solución tampón estaban caracterizadas por un valor de  $n$  mayor de 1. Cuando Guerrero y col. (2005) trataron a *S. cerevisiae* KE162 en caldo Sabouraud con US (20 kHz; 95,2  $\mu\text{m}$ ; 167,72 W/mL; 45°C; 35 minutos) obtuvieron curvas de supervivencia con valores de  $n$  próximos a 1, y cuando estudiaron el efecto combinado del US (mismas condiciones) en caldo Sabouraud con 1000 mg/L de chitosan obtuvieron valores de  $n$  mayores de 1. En nuestro estudio, el parámetro de escala ( $\delta$ ) decrecía a medida que se incrementaban las concentraciones de AEC y la temperatura de calentamiento o cuando el US era aplicado. La mayor inactivación se observó a temperaturas de 50°C combinada con US y AEC. Este efecto dependió principalmente de la concentración de AEC: a mayor concentración, mayor inactivación se obtuvo. En este caso, las curvas de supervivencia siguieron una cinética de reacción de primer orden. Por ejemplo, en TSB con 650 mg/L de AEC al que se le aplicó termosonicación a 50°C se obtuvo una inactivación de *S. cerevisiae* de 5,13 ciclos logarítmicos a los 24 minutos y la misma inactivación se obtuvo en TSB con 320 mg/L de AEC tratado con termosonicación a 50°C a los 30 minutos de tratamiento (Figura 1.5).

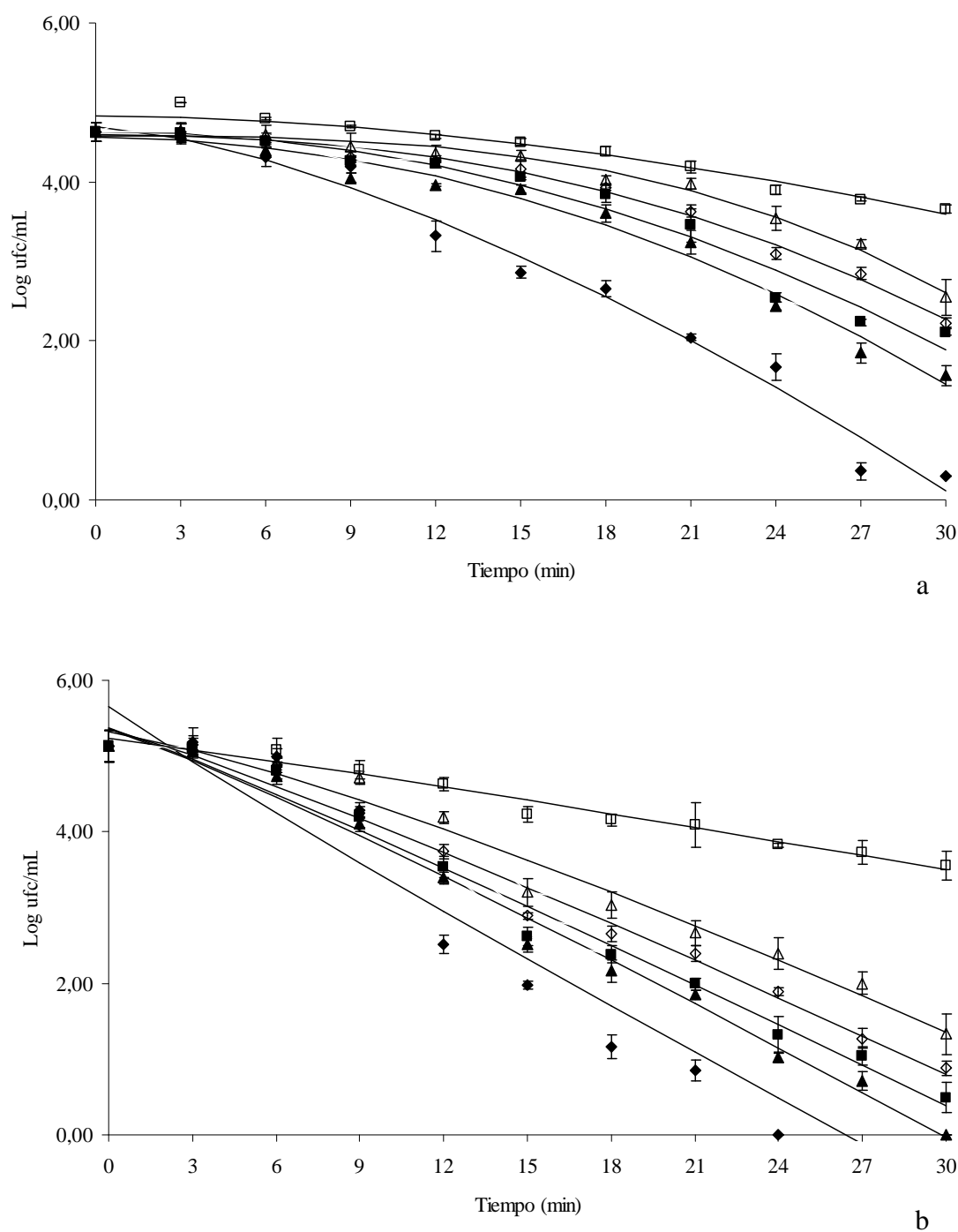


Figura 1.5. Ajuste del modelo Weibull al conjunto de datos de supervivencia de *S. cerevisiae* suspendida en TSB suplementado con aceite esencial de hoja de canela (◆ 650 mg/L, ▲ 320 mg/L, ■ 160 mg/L, ◇ 80 mg/L, △ 40 mg/L, □ control) durante los tratamientos (a: 50°C 30 minutos. b: US+50°C 30 minutos).

En el ZnN (Figura 1.6.), ambos modelos, “Shoulder+log-linear” y “Weibull”, ajustaron con precisión las curvas de supervivencia de algunos de los tratamientos, con valores del coeficiente de correlación entre 0,97 y 0,99 (Tabla 1.4). Sin embargo, cuando se modelaron los datos obtenidos en la muestra tratada con 50°C+650 mg/L+US, se obtuvo un valor negativo para el parámetro longitud del hombro (SI), lo cual es físicamente imposible. Así, el modelo “Shoulder+log-linear” es poco adecuado para explicar estos datos. López-Malo y col. (2005a) evaluaron y modelaron con “Weibull” la supervivencia de *S. cerevisiae* y *L. monocytogenes* en ZM (pH: 3,5; °Brix: 12) y en tampón fosfato (pH: 3,5) tratados con radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) y con US de alta intensidad (20 kHz; 95,2 μm; 35±1°C; sonda de 25 mm). La inactivación de ambos microorganismos dependió fundamentalmente del medio (ZM o tampón fosfato). En general, los tratamientos en tampón fosfato fueron más eficaces en comparación con los aplicados en el ZM, lo que podría ser debido a la presencia de compuestos orgánicos que redujeron la eficiencia de los tratamientos.

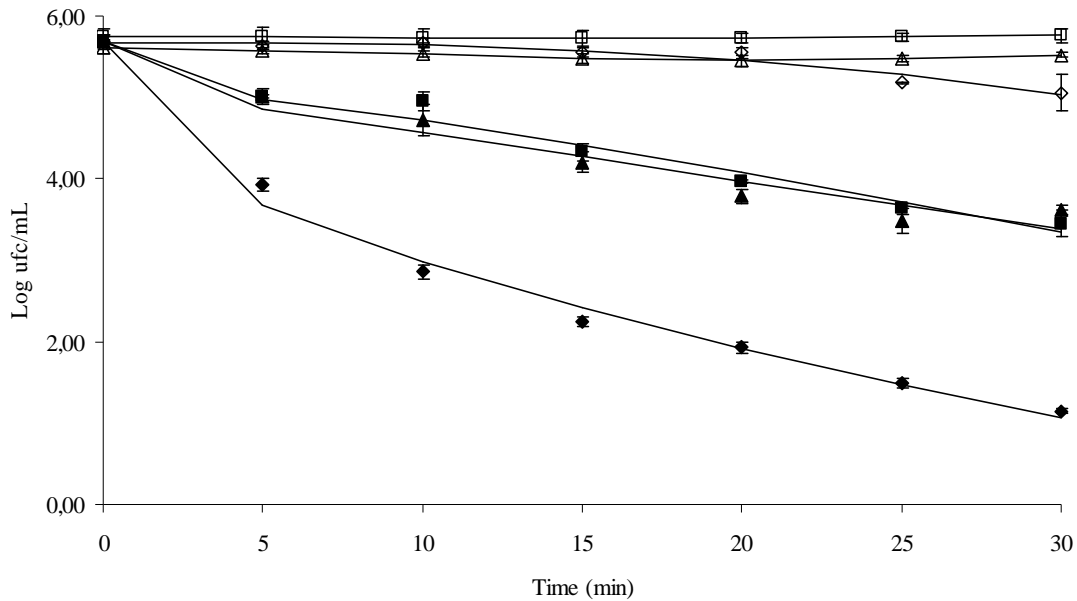
**Tabla 1.4. Parámetros para las curvas de supervivencia de *S. cerevisiae* en zumo natural de naranja, a diferentes temperaturas, suplementado con aceite esencial de hoja de canela y sometido a tratamiento con US.**

Tratamientos	Modelo “Shoulder+log-linear”			Modelo Weibull		
	$k_{max}$ (minutos <sup>-1</sup> )	SI (minutos)	R <sup>2</sup>	δ	ρ	R <sup>2</sup>
50°C	0,17±0,04	22,25±2,30	0,95	35,15±2,27	2,69±0,78	0,95
50°C+650mg/L	0,18±0,03	6,41±4,18	0,97	18,86±2,69	1,29±0,30	0,96
50°C+US	0,14±0,04	0,54±8,43	0,93	16,67±4,27	0,99±0,32	0,93
#50°C+650mg/L+US	–	–	–	3,12± 0,90	0,61±0,07	0,99

Los valores para las diferentes constantes fueron calculadas con GInaFiT (Geeraerd y col., 2005). Todos los valores se expresan como la media de tres repeticiones ± ds.

(#50°C+650mg/L+US: Se obtuvo un valor negativo para el parámetro longitud de hombro, SI, que físicamente no es posible. Así, el modelo con hombro es poco adecuado para estos datos).





**Figura 1.6.** Ajuste del modelo Weibull al conjunto de datos de supervivencia de *S. cerevisiae* suspendida en zumo natural de naranja tratado con US y suplementado con aceite esencial de hoja de canela. (□control, Δ control 650mg/L, ◇50°C, ■50°C+650 mg/L, ▲50°C+US, ◆50°C+650 mg/L +US).

De acuerdo a la bibliografía consultada y a nuestros resultados, la combinación de US, temperatura moderada y antimicrobianos tendría un efecto sinérgico sobre la inactivación de bacterias, mohos y levaduras, y que la eficacia del tratamiento dependería de la amplitud de la onda del US, los W/mL, la temperatura, la duración del tratamiento, la concentración y el tipo de los antimicrobianos. La termosonicación y los compuestos fenólicos de los AEs dañan la estructura y la funcionalidad de las proteínas de membrana, explicando así el efecto simultáneo mejorado de estos agentes activos contra la membrana. El mecanismo de acción también explica la variabilidad del efecto teniendo en cuenta la diferente configuración de la pared celular bacteriana. Lo mismo podría ser propuesto para la levadura, en donde la composición de la pared celular difiere significativamente entre las especies (Luo y col., 2012). Se ha demostrado que la cavitación, extra e intracelular, altera tanto la pared celular como componentes estructurales y funcionales hasta provocar la lisis celular (Butz y Tauscher, 2002;

Ferrante y col., 2007; Guerrero y col., 2005; Wordon y col., 2012). Las alteraciones de las células microbianas descritas en la bibliografía durante el tratamiento con US, implican la disrupción de partículas subcelulares, fragmentación fina de la membrana, cavitación interna, así como microcorrientes internas, con la modificación de la estructura celular y alteración de la densidad celular (López-Malo y col., 2005a). Micrograffias obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión de células de *S. cerevisiae* mostraron los efectos estructurales que la termosonicación provoca con perforación de las paredes celulares y la rotura de la membrana plasmática con fuga del contenido celular, rotura o fragmentación de la pared, y alteración citológica de orgánulos (Guerrero y col., 2001a; Guerrero y col., 2005; Wordon y col., 2012). Muchos informes señalan a la membrana celular como el objetivo principal de los compuestos aromáticos bioactivos de las plantas (Lanciotti y col., 2004). Los compuestos fenólicos tienen una naturaleza lipofílica y podrían acumularse en la bicapa lipídica de la célula, alterando y sensibilizando la membrana a la acción del US (Brul y Coote, 1999). Además, las ondas ultrasónicas mejorarían la acción antimicrobiana debilitando la pared celular (Ferrante y col., 2007).

En conclusión, el uso combinado de temperatura moderada, US y AEC fue muy eficaz en la inactivación de *S. cerevisiae* en TSB y en ZnN, especialmente en TSB, mejorándose los resultados de inactivación con las temperaturas y concentraciones de AEC más altas. La termosonicación combinada con AEC podría actuar sinérgicamente en la inactivación de *S. cerevisiae* tanto en TSB como en ZnN. Los valores D más bajos se obtuvieron cuando las muestras en TSB fueron tratadas con US en presencia de AEC a 50°C. Ambos modelos utilizados, “Shoulder+log-linear” y “Weibull”, ajustaron con precisión las curvas de inactivación para algunas condiciones ensayadas. El último modelo ha demostrado ser una herramienta útil para seleccionar la concentración necesaria de AEC combinada con US+50°C para lograr la inactivación de la población de levaduras.



## **CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN ZUMOS NATURALES DE NARANJA Y DE GRANADA POR COMBINACIÓN DE TERMOSONICACIÓN Y ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA**

### **2.1. Justificación del estudio**

Los zumos naturales recién exprimidos son una fuente importante de compuestos bioactivos beneficiosos para la nutrición y la salud humana (Gattuso y col, 2007; Gardner y col, 2000; Kelebek y col, 2009; Li y col, 2015; Stinco y col, 2015; Viuda-Martos y col, 2010). Hoy en día, la pasteurización térmica es el método más comúnmente empleado para prolongar la vida útil de los zumos, pues consigue la inactivación de los microorganismos y enzimas responsables del deterioro. Las levaduras como *S. cerevisiae*, son los principales microorganismos responsables del deterioro de los zumos en la industria, provocando graves pérdidas económicas (Marx y col., 2011; Patrignani y col., 2009). Sin embargo, los tratamientos térmicos pueden alterar las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos (Soria y Villamiel, 2010).

El deseo de los consumidores por mantener una dieta que promueva una mejor salud ha aumentado la demanda de zumos que conserven su valor nutricional natural, por lo tanto la industria de zumos está buscando tecnologías de procesamiento que causen el mínimo daño a sus propiedades nutricionales y sensoriales. Entre estas tecnologías emergentes, se ha prestado especial atención durante las últimas décadas a los AEs de plantas (Cava y col, 2012a; Cava y col, 2012b; Jin y col, 2012; Lanciotti y col, 2004; Prakash y col., 2012; Raybaudi-Massilia y col, 2009; Tserennadmid y col, 2011; Wang y col, 2007) y al US (Ashokkumar y col, 2008; Chemat y col, 2011; Piyasena y col., 2003; Valero y col, 2007; Velázquez-Estrada y col., 2013) usados juntos o en combinación con otras barreras, no sólo para obtener alimento de alta calidad con características similares al del producto fresco, sino también los alimentos con mayores o incluso nuevas funcionalidades (Patrignani y col., 2009). La energía liberada por la cavitación depende de la tensión superficial; por lo tanto, los alimentos

con alta tensión superficial como los zumos de frutas, son excelentes candidatos para ser procesados por la tecnología del US (Chandrapala y col., 2012; Chemat y col., 2011; Soria y Villamiel, 2010).

Se ha sugerido que el US podría ser más eficaz en la inactivación de microorganismos si se utilizara en combinación con otros factores de estrés en un enfoque multifactorial tales como calentamiento, presión, extremos de pH, cloración o adición de conservantes (sintéticos y/o naturales) (Bevilacqua y col., 2013; Bevilacqua y col., 2014; Gastélum y col., 2012; Guerrero y col., 2001a; Lee y col., 2009; López-Malo y col., 2005b). Los aceites esenciales (AEs) han sido propuestos para la conservación de alimentos, debido a la creciente demanda de los consumidores por aditivos alimentarios naturales (Chanthaphon y col., 2008; Kloucek y col., 2012; Nanasombat y Wimuttigosol, 2011; Tserennadmid y col., 2011; Unlu y col., 2010; Viuda-Martos y col., 2008). Sin embargo, su uso a nivel comercial es aún limitado debido a su impacto en los atributos sensoriales y a cuestiones reglamentarias relativas a su uso (Raybaudi-Massilia y col., 2009), pero son aceptados por los consumidores en los alimentos a determinadas concentraciones (Fisher y Phillips, 2008).

El objetivo específico del estudio fue determinar el efecto de la aplicación combinada del US, el AEC y el tratamiento térmico moderado sobre la inactivación de *S. cerevisiae* en ZnN y en ZnG y su posterior supervivencia en los ZNs tratados durante 28 días de almacenamiento a 5°C.

## **2.2. Diseño experimental y metodología**

### **2.2.1. Preparación de los zumos naturales de naranja (ZnN) y de granada (ZnG)**

Las naranjas se recogieron en un huerto local (Beniaján, Murcia, España). Las granadas se compraron en un supermercado local de Murcia (España). Las frutas se mantuvieron a 5°C durante 1 día antes de la extracción del zumo, las frutas dañadas se descartaron y las seleccionadas se lavaron con agua fría del grifo y se secaron.

El ZnN se obtuvo exprimido las frutas (Citro Nueva 100W, solar) en condiciones asépticas.

Para obtener el ZnG, la parte superior e inferior de las cáscaras de la granada se eliminaron con un cuchillo afilado de acero inoxidable desinfectado para evitar la contaminación microbiana. Después, las granadas fueron cortadas por la mitad y los arilos se separaron de la médula a mano. El zumo se obtuvo inmediatamente de los arilos con una batidora (Ariete Centrika metálica 173) en condiciones asépticas.

Los ZnN y ZnG fueron pasterizados y se almacenaron a -20°C en la oscuridad hasta los tratamientos de termosonicación.

### **2.2.2. Determinación del pH y de los °BRIX**

El pH de los zumos naturales se midió utilizando un medidor digital de pH (medidor de pH 507, Crison) y los °Brix se midieron usando un refractómetro de bolsillo (PAL-1, Atago, Japón). Las mediciones se realizaron a 25±0,5 °C. Todas las medidas se hicieron por triplicado.

### **2.2.3. Preparación de los zumos con AEC**

Las características del AEC están descritas en el apartado 1.2.2 del capítulo 1. Se utilizó la metodología descrita en el apartado 1.2.4 del capítulo 1 para preparar los zumos naturales con AEC. Las concentraciones de AEC estaban en el rango de 0 a 650 mg/L.

### **2.2.4. Evaluación sensorial**

Con el fin de seleccionar la concentración máxima de AEC aceptada por los consumidores, se evaluaron sensorialmente muestras de ZnN y de ZnG con diferentes concentraciones de AEC. Las pruebas se realizaron en dos días diferentes. Antes de la evaluación sensorial, las muestras de zumo fueron refrigeradas (5°C), y posteriormente, fueron codificados de forma aleatoria y se sirvieron (30 mL) a los panelistas junto con agua sin gas (Lanjarón, España). Las muestras de zumo con diferentes concentraciones de AEC (0-650 mg/L) fueron presentadas a los panelistas (n=22) a los que se les

preguntó las diferencias entre las muestras utilizando una escala hedónica de 10 puntos, donde 1 significaba que no les gustaba mucho y 10 que les gustaba mucho. Una puntuación de 5 fue el umbral mínimo para la aceptación de las muestras (Walkling-Ribeiro y col., 2009).

#### **2.2.5. Preparación de los inóculos de *S. cerevisiae***

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada en este estudio fue aislada e identificada por Valverde y col. (2010) y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en viales Microbank™ (Pro-labo Diagnostics, Neston, Wirral, UK). Los inóculos se prepararon siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2.1 del capítulo 1.

#### **2.2.6. Tratamientos de termosonicación con AEC en ZnN y en ZnG**

Los tratamientos (Tabla ) de termosonicación se llevaron a cabo por separado y en combinación en un vaso cilíndrico de doble pared en la que se hizo circular agua con un baño termostático (Digiterm 100, PSelecta®) para lograr y fijar  $50^{\circ}\text{C}$ . Se estableció la temperatura del baño termostático necesaria para cada tratamiento y se controló con un termómetro esterilizado para mantener la temperatura deseada en las muestras. El US (24 kHz; 105  $\mu\text{m}$ ; 33,31 W/mL; 30 minutos) fue aplicado continuamente con un procesador ultrasónico UP200H (Hielscher Ultrasound Technology) usando una sonda S3 (Hielscher). El efecto del tratamiento de ultrasonidos a  $50^{\circ}\text{C}$  (30 minutos) también se ensayó con la máxima concentración de AEC aceptada por los panelistas. Para cada tratamiento, una población de levaduras ( $\sim 10^5$  ufc/mL) se inoculó en las muestras de ZnN y de ZnG previamente calentadas a la temperatura deseada (Gastélum y col., 2012). Los recuentos de células viables se determinaron inmediatamente a intervalos fijos de tiempo durante los 30 minutos de tratamiento utilizando el método de las diluciones decimales seriadas y de vertido en placa (PCA-Cf). Dos placas se utilizaron para cada dilución decimal y se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Los valores D (tiempo de reducción decimal) de *S. cerevisiae* se calcularon a partir de las pendientes de las curvas de supervivencia obtenidas por la representación gráfica de la reducción logarítmica  $\log N_0/N$  (donde  $N_0$  es la concentración inicial de

microorganismos y N es la de microorganismos supervivientes) en función de tiempo. El valor D es el tiempo de tratamiento requerido para inactivar el 90% de la población microbiana.

**Tabla 2.1. Diseño experimental de los tratamientos en los zumos naturales.**

Muestras	Duración tratamiento	Temperatura (50°C)	AEC (20 mg/L)	US (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL)
Control 1	–	–	–	–
Control 2	–	–	+	–
S1	30 minutos	+	–	–
S2	30 minutos	+	+	–
S3	30 minutos	+	–	+
S4	30 minutos	+	+	+

### **2.2.7. Supervivencia de *S. cerevisiae* en ZnN y ZnG tratados durante su almacenamiento a 5°C**

Este estudio se basó en trabajos anteriores (Ferrario y col, 2015; Valero y col, 2007), pero con algunas modificaciones. Tras finalizar los tratamiento, las réplicas de las muestras control y las tratadas por termosonicación de los ZnN y de ZnG con AEC fueron envasadas asépticamente en frascos de polipropileno de 50 mL con tapa de rosca y se conservaron en un frigorífico a 5°C. Se analizaron las muestras después de 4, 7, 11, 18, 21, 25 y 28 días de almacenamiento a 5°C. Para ello de las muestras, previamente agitadas, se cogieron alícuotas de 1 mL en cada período de incubación, se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembraron en profundidad las alícuotas en placas con



PCA-Cf, tal como se ha descrito previamente. Dos placas se utilizaron para cada dilución y se incubaron a 25°C durante 48 h.

### **2.2.8. Análisis estadístico**

Se hizo el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y la prueba de Duncan para la comparación de los efectos de los tratamientos en *S. cerevisiae*. Para la evaluación sensorial, se utilizó el análisis de varianza de una vía. La significancia se estableció en  $p < 0,05$ . Los análisis se realizaron con el programa Statgraphic Plus para Windows 3.0®, versión 5.0 (StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA).

## **2.3. Resultados y discusión**

### **2.3.1. Evaluación sensorial**

El análisis sensorial del ZnN (pH:  $3,61 \pm 0,01$ ; °Brix:  $13,3 \pm 0,15$ ) y del ZnG (pH:  $4,31 \pm 0,09$ ; °Brix:  $15,72 \pm 0,08$ ) se muestra en la Figura 2.1 y en la Tabla 2.2.

La concentración máxima aceptada positivamente por todos los panelistas (20 mg/L) se utilizó para estudiar la inactivación por termosonicación de *S. cerevisiae* en ambos zumos naturales. Las muestras con concentraciones superiores a 20 mg/L de AEC fueron rechazadas por todos los panelistas. Este rechazo se debió principalmente a los cambios significativos no aceptables detectados por los panelistas en los atributos aroma y sabor de ambos zumos.

Durante la preparación del ZnG, cuyo color rojo brillante se debe a las antocianinas (Türkyılmaz y Özkan, 2014), se observó un cambio de color desde rojo a marrón claro, que podría ser causado por la oxidación de las antocianinas y del ácido ascórbico. La oxidación del ácido ascórbico, a través de una reacción en cadena de radicales libres, produce peróxido de hidrógeno que, a su vez puede reaccionar con las antocianinas formando productos de degradación indeseables (Sondheimer y Kertesz, 1953; Starr y Francis, 1968; García-Viguera y Bridle, 1999). Se sabe que las antocianinas y el ácido ascórbico son mutuamente destructivos en presencia de oxígeno (Sondheimer y Kertesz, 1953), y que el oxígeno es un requisito esencial en la

decoloración de las antocianidinas por el ácido ascórbico (García-Viguera y col., 1999; King y col., 1980; Timberlake, 1960a, 1960b). Sin embargo durante el análisis sensorial, se detectó un cambio de color (de marrón claro a rojo) en el ZnG con las concentraciones de AEC más altas, lo cual fue valorado positivamente por los panelistas (Figura 2.1b).

Este cambio significativo del color fue evaluado positivamente por los panelistas (Tabla 2.2). Este cambio de color pudo ser debido a la capacidad antioxidante de los AEs y de sus componentes (Jin y col, 2012; Nuncio-Jáuregui y col, 2015; Wang y col, 2007), específicamente, la actividad antioxidante de AEC es debida a la capacidad donadora de hidrógeno de sus componentes fenólicos, como el eugenol (Brewer, 2011; Schmidt y col., 2006).

Capítulo 2. Estudio de la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* en zumos naturales de naranja y de granada por combinación de termosonicación y aceite esencial de hoja de canela

**Tabla 2.2. Evaluación sensorial del zumo natural de naranja (ZnN) y del zumo natural de granada (ZnG) con aceite esencial de hoja de canela (n=22).**

		AEC (mg/L)					
		0	20	40	80	160	650
Color	ZnN	7,95±1,21 <sup>a</sup>	7,91±1,11 <sup>a</sup>	8,05±0,84 <sup>a</sup>	7,86±1,04 <sup>a</sup>	7,73±1,08 <sup>a</sup>	7,77±1,07 <sup>a</sup>
	ZnG	4,00±1,66 <sup>a</sup>	3,86±2,10 <sup>ab</sup>	4,68±1,52 <sup>b</sup>	5,95±2,80 <sup>c</sup>	6,59±1,94 <sup>c</sup>	7,23±1,60 <sup>c</sup>
Aroma	ZnN	8,05±1,43 <sup>a</sup>	5,82±1,47 <sup>b</sup>	3,68±2,40 <sup>c</sup>	3,00±2,00 <sup>c</sup>	1,68±1,99 <sup>d</sup>	0,90±1,79 <sup>d</sup>
	ZnG	6,82±1,89 <sup>a</sup>	5,18±2,02 <sup>b</sup>	3,14±2,10 <sup>c</sup>	2,68±2,28 <sup>c</sup>	2,05±2,10 <sup>cd</sup>	1,10±1,30 <sup>d</sup>
Sabor	ZnN	8,09±1,19 <sup>a</sup>	5,55±1,14 <sup>b</sup>	3,09±2,29 <sup>c</sup>	2,55±2,15 <sup>c</sup>	1,45±2,18 <sup>d</sup>	0,64±0,85 <sup>d</sup>
	ZnG	7,64±1,29 <sup>a</sup>	5,23±1,88 <sup>b</sup>	1,68±1,09 <sup>c</sup>	1,18±1,10 <sup>c</sup>	1,82±2,38 <sup>cd</sup>	0,41±0,59 <sup>d</sup>
Textura	ZnN	7,55±1,18 <sup>a</sup>	7,32±1,55 <sup>ab</sup>	7,05±1,56 <sup>abc</sup>	6,64±1,50 <sup>abc</sup>	6,23±1,97 <sup>cd</sup>	6,09±2,16 <sup>d</sup>
	ZnG	6,23±1,51 <sup>a</sup>	5,86±1,49 <sup>a</sup>	6,23±0,87 <sup>a</sup>	5,41±1,68 <sup>a</sup>	6,23±1,48 <sup>a</sup>	5,91±1,02 <sup>a</sup>
Global	ZnN	8,14±1,25 <sup>a</sup>	5,64±1,05 <sup>b</sup>	3,82±2,36 <sup>c</sup>	2,77±2,11 <sup>d</sup>	1,77±2,00 <sup>d</sup>	0,68±0,99 <sup>e</sup>
	ZnG	7,50±1,60 <sup>a</sup>	5,14±1,32 <sup>b</sup>	2,59±1,37 <sup>c</sup>	2,45±1,99 <sup>c</sup>	1,73±1,91 <sup>c</sup>	0,36±0,49 <sup>d</sup>

En cada fila, letras diferentes significan valores significativamente diferentes (p < 0,05)

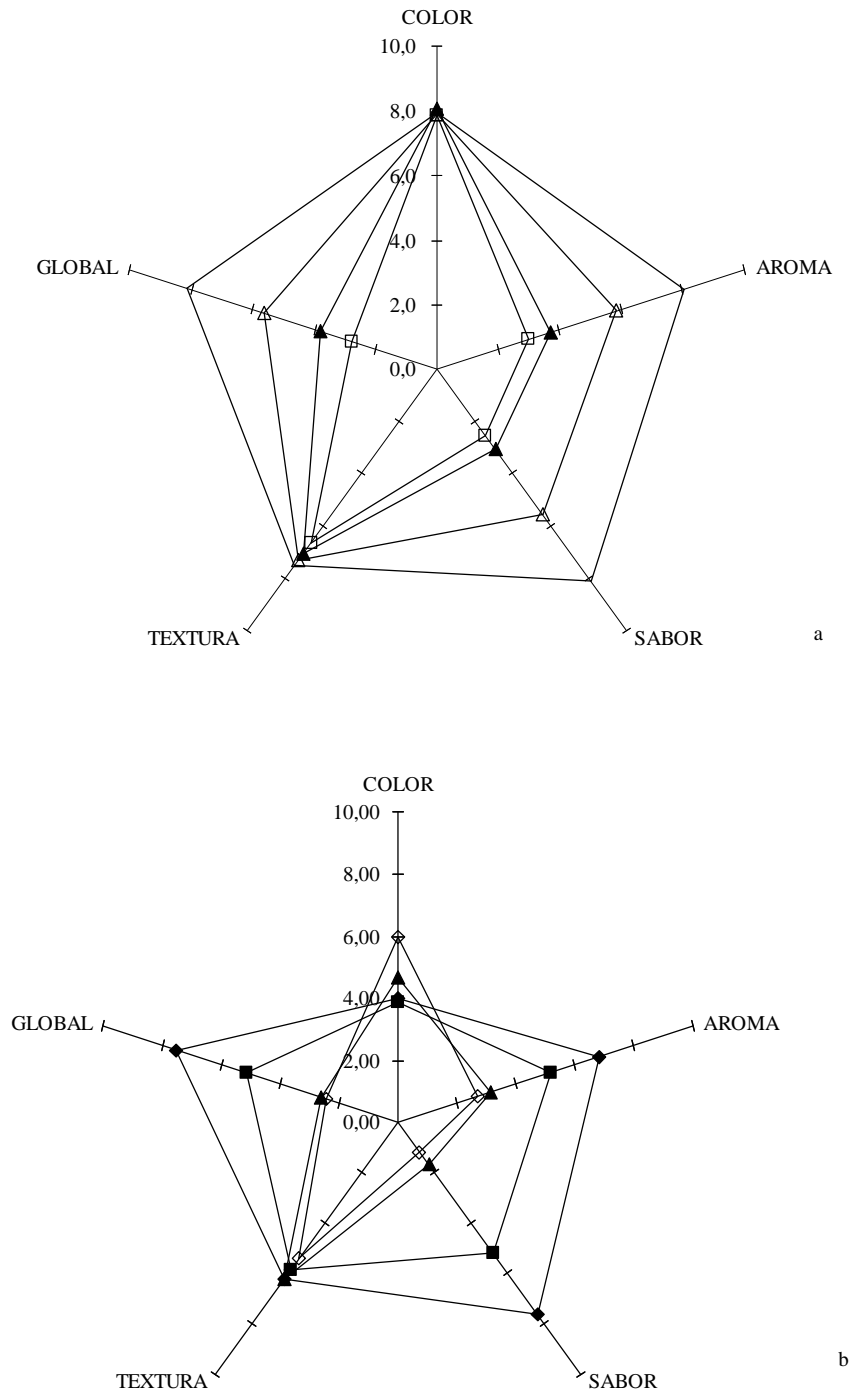


Figura 2.1. Evaluación sensorial del zumo natural de naranja (a) y del zumo natural de granada (b) con aceite esencial de hoja de canela (♦0 mg/L; ■20 mg/L; ▲40 mg/L; ◇80 mg/L).

### 2.3.2. Tratamientos de termosonicación con AEC en ZnN y en ZnG

La Figura 2.2 muestra la inactivación de *S. cerevisiae* en el ZnN (Figura 2.2a) y en el ZnG (Figura 2.2b) con la aplicación de temperatura moderada (S1: 50°C), temperatura moderada con AEC (S2: 50°C+20 mg/L), termosonicación (S3: 50°C+US) y termosonicación con AEC (S4: 50°C+20 mg/L+US). Todos los tratamientos duraron 30 minutos. No se obtuvieron diferencias entre el Control 1 (0 mg/L) y el Control 2 (20 mg/L) en ninguno de los zumos. En ambos zumos, se obtuvo la inactivación más alta en las muestras tratadas por la combinación de US y 20 mg/L de AEC a 50°C. Esta combinación produjo  $2,52 \pm 0,26$  y  $2,81 \pm 0,19$  reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* en el ZnN y el ZnG, respectivamente. Pero mientras que en el ZnN, el US fue el único factor con un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en la inactivación de *S. cerevisiae* a 50°C; en el ZnG, el US, el AEC y su combinación (US+AEC) tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en la inactivación de *S. cerevisiae* a 50°C.

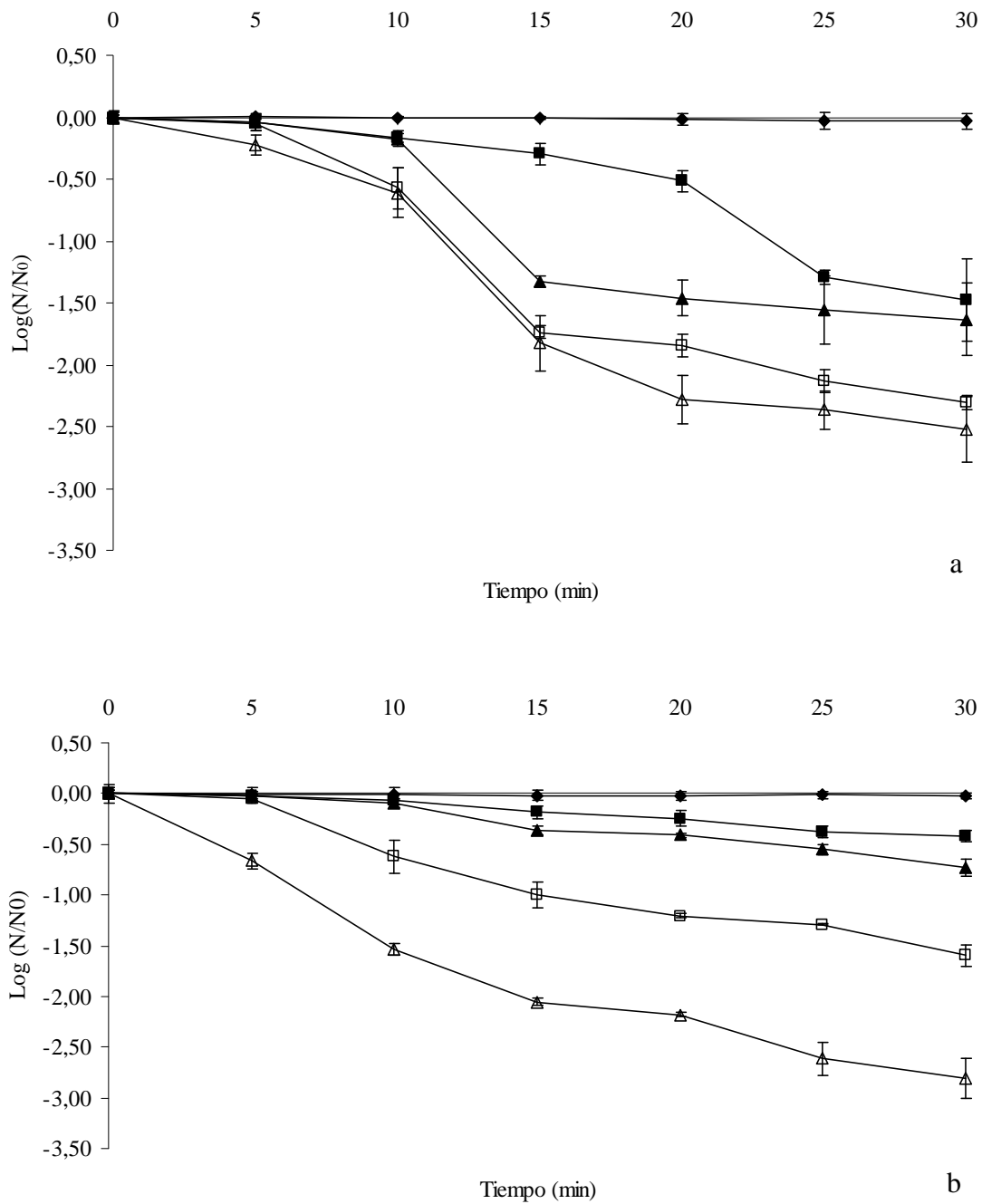


Figura 2.2. Supervivencia de *S. cerevisiae* en zumo natural de naranja (a) y en zumo natural de granada (b) sin y con aceite esencial de hoja de canela y tratados con termosonicación (◆ control; ■ S1: 50°C; ▲ S2: 50°C+20 mg/L; □ S3: 50°C+US; △ S4: 50°C+20 mg/L+US).

La Tabla 2.3 muestra los tiempos de reducción decimal de *S. cerevisiae* a 50°C ( $D_{50}$ ) en ambos zumos naturales. Los valores  $D_{50}$  se calcularon a partir de las pendientes de las curvas de supervivencia obtenidas para el ZnN y el ZnG con 0 y 20 mg/L de AEC, con y sin tratamiento de US. En el ZnN, el US tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en los valores  $D_{50}$  de *S. cerevisiae*, que variaron de  $19,27 \pm 4,02$  a  $10,35 \pm 1,30$  minutos. En el ZnG, el US, el AEC y su combinación (US+AEC) tuvieron un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en los valores  $D_{50}$  de *S. cerevisiae*, que variaron de  $65,36 \pm 7,42$  a  $10,80 \pm 0,77$  minutos. Para el ZnN, los porcentajes de reducción de los valores  $D_{50}$  fueron del 21% con la aplicación de AEC a 50°C, del 54% con la aplicación de US a 50°C y del 75% con la combinación de US y AEC a 50°C. Para el ZnG, los porcentajes de reducción de los valores  $D_{50}$  fueron del 40% con la aplicación de AEC a 50°C, del 84% con la aplicación de US a 50°C y del 97% con la combinación de US y AEC a 50°C.

**Tabla 2.3. Tiempos de reducción decimal ( $D_{50}$ , minutos) de *S. cerevisiae* en ambos zumos.**

	S1	S2	S3	S4
ZnN	$19,27 \pm 4,02^a$	$15,15 \pm 4,17^a$	$11,35 \pm 0,48^b$	$10,35 \pm 1,30^b$
ZnG	$65,36 \pm 7,42^a$	$49,37 \pm 1,93^b$	$17,86 \pm 1,24^c$	$10,80 \pm 0,77^d$

Media de 3 repeticiones. En la misma fila, valores seguidos por una letra diferente son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre ellos; rangos múltiples de contraste (Test de Duncan).

La diferente composición nutricional de los zumos (Gattuso y col., 2007; Gardner y col., 2000; Kelebek y col., 2009; Li y col., 2015; Stinco y col., 2015; Viuda-Martos y col., 2010) podría explicar los diferentes resultados obtenidos en ambos zumos. Se ha determinado que el zumo de granada es rico en antocianinas y taninos (Gil y col. 2000; Gómez-Caravaca y col., 2013; Li y col., 2015; Reddy y col., 2007;

Vázquez-Araújo y col., 2010), que tienen actividad antimicrobiana (Al-Zoreky, 2009; Naz y col., 2007; Opara y col., 2009; Puupponen-Pimiä y col., 2001; Puupponen-Pimiä y col., 2005; Tehranifar y col., 2011; Türkyilmaz y col., 2013). Cowan (1999) sugiere que las propiedades antimicrobianas de los taninos podrían estar relacionadas con su capacidad para inactivar las adhesinas bacterianas, las enzimas y las proteínas de transporte situadas en la membrana celular y a su capacidad para unirse a polisacáridos, así como a su capacidad para modificar la morfología de los microorganismos. Por otro lado, la actividad antimicrobiana de las antocianinas, cuya fracción activa es la aglicona, es probablemente debida a su capacidad para formar complejos con las proteínas extracelulares y solubles y para formar complejos con las paredes celulares bacterianas (Cowan y col., 1999; Puupponen-Pimiä y col., 2001). Por ello, cuando se combinó la sonicación y el AEC a 50°C, así como la presencia de antocianinas y taninos del ZnG, todos estos factores actuarían sinérgicamente en la inactivación de *S. cerevisiae*, obteniéndose la reducción logarítmica más alta en el ZnG.

La bibliografía muestra que la combinación de US con temperatura moderada (35-60°C) a diferentes amplitudes de onda (71-107,1  $\mu\text{m}$ ), W/mL (0,33-167,72) y tiempos de tratamiento (10-200 minutos), mejora la inactivación de *S. cerevisiae* y de esporas de hongos (*Aspergillus flavus* y *Penicillium digitatum*), obteniéndose valores D más bajos (78,7 a 2,0 minutos). Los valores D para las esporas de hongos son aún menores (78,7 a <0,5 minutos) en presencia de antimicrobianos como la vainillina (500 mg/L) combinados con termosonicación (Ciccolini y col., 1997; Guerrero y col., 2001a; López-Malo y col., 1999; López-Malo y col., 2005b). Alighourchi y col. (2014) determinaron los valores D para *S. cerevisiae* en dos zumos diferentes de granada (pH: 3,56 $\pm$ 0,01, 3,09 $\pm$ 0,02; °Brix: 16,7 $\pm$ 0,2, 17,2 $\pm$ 0,1) tratados con US (20 kHz, 50-70-100% amplitud de onda; 0-15 minutos; 25 $\pm$ 1°C) y los valores obtenidos por estos autores variaron entre 16,94 $\pm$ 0,18 y 8,33 $\pm$ 0,21 minutos. Los resultados de nuestro estudio concuerdan con los autores anteriores, pues se obtuvieron los valores D más bajos en ambos zumos cuando se combinó la sonicación y el AEC a 50°C.

Hay pocos datos sobre la inactivación de *S. cerevisiae* por termosonicación en zumos de frutas, debido a que la mayor parte de las investigaciones se han hecho en caldo de cultivo (Alzamora y col., 2011; Ciccolini y col., 1997; Guerrero y col., 2005;



Guerrero y col., 2001a; Marx y col., 2011; López-Malo y col., 1999; López-Malo y col., 2005b; Luo y col., 2012; Wordon y col., 2012). Diversos autores han estudiado el efecto combinado del US con temperaturas moderadas (20-44°C) a diferentes amplitudes de onda (20-120  $\mu\text{m}$ ), energías acústicas ( $\leq 600$  W) y tiempo de tratamiento (10 a 30 minutos) en zumos de frutas (naranja, manzana, granada) inoculados con diferentes cepas y concentraciones de *S. cerevisiae* ( $10^5$ - $10^6$  log ufc/mL) y se han logrado reducciones logarítmicas que oscilaban entre 1 y 2,5 (López-Malo y col., 2005a; Zinoviadou y col., 2015). Concretamente, Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas. (2012) estudiaron la inactivación de *S. cerevisiae* ( $10^7$  log ufc/mL) por termosonicación (24 kHz, 400 W, 120  $\mu\text{m}$ , 10 minutos) a 40°C, 50°C y 60°C en zumos comerciales pasterizados y obtuvieron ~1,2 reducciones logarítmicas en zumo de piña sonificado continuamente a 50°C. Los resultados obtenidos en este capítulo concuerdan con los autores anteriores, pues cuando se aplicó US a 50°C se obtuvieron 2,30 y 1,59 reducciones logarítmicas en el ZnN y el ZnG respectivamente.

La bibliografía consultada muestra que la eficacia de la termosonicación mejora con la aplicación simultánea de agentes antimicrobianos, tanto en caldos de cultivo como en zumos de frutas. El uso combinado de antimicrobianos naturales (cital, vainillina, extracto de cítricos) ha sido muy eficaz para mejorar el efecto letal del US sobre microorganismos en zumos. Ferrante y col. (2007) estudiaron el uso combinado del US (600 W, 20 kHz, 95,2  $\mu\text{m}$ ) y antimicrobianos naturales (vainillina y/o cital) a 45 °C para inactivar *L. monocytogenes* ( $\sim 10^6$  ufc/mL) en ZN (pH 3,5) y lograron ~2,8 reducciones logarítmicas en ZN tratado solo con US (30 minutos); ~3,4 reducciones logarítmicas cuando fue tratado con US y 1.500 mg/L de vainillina (15 minutos) y ~6 reducciones logarítmicas cuando el US fue aplicado en ZN con 100 mg/L de cital y 1.500 de vainillina (7 minutos). Los resultados obtenidos en este capítulo corroboran las observaciones de los autores anteriores, pues cuando se trataron el ZnN y el ZnG con US a 50°C, se obtuvieron 2,30 y 1,59 reducciones logarítmicas en ZnN y en ZnG, respectivamente, y cuando se aplicó US+20 mg/L de AEC a 50°C, se obtuvieron 2,52 y 2,81 reducciones logarítmicas en ZnN y en ZnG, respectivamente. Además, es importante destacar que la concentración de AEC usada no tenía un efecto sensorial negativo en los zumos.

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la combinación de US, temperatura moderada y AEC tendría un efecto sinérgico sobre la inactivación de *S. cerevisiae* en ambos zumos naturales. El mecanismo de acción de los AEs y el US sobre la membrana y pared microbiana ha sido explicado por diferentes autores. La membrana celular es la diana primaria de los compuestos aromáticos bioactivos de las plantas (Lanciotti y col., 2004), y los compuestos fenólicos, que tienen naturaleza lipofílica, podrían acumularse en la bicapa lipídica de la célula, perturbando y sensibilizando la membrana a la acción del US (Brul y Coote, 1999); al mismo tiempo, las ondas ultrasónicas y la cavitación mejorarían la acción antimicrobiana de los AEs al debilitar las paredes celulares de bacterias y de levaduras (Ferrante y col., 2007; Lanciotti y col., 2004, Wordon y col., 2012). En los últimos años, se han realizado diferentes estudios con el fin de dilucidar el mecanismo de acción antimicrobiano tanto del US como de los AEs y sus componentes.

El principal constituyente del AEC utilizado en este ensayo es el eugenol (74,32%, valor nominal) porcentaje similar al encontrado por otros autores (Ranasinghe y col., 2002; Suhr y Nielsen al., 2003). El mecanismo de acción antimicrobiano de los fenilpropanoides (eugenol) implicaría la disrupción de la membrana citoplasmática y la coagulación del contenido celular (Bakkali y col., 2008; Pauli, 2001; Sukkata y col., 2008). Tanto el núcleo aromático como el grupo -OH fenólico del eugenol pueden formar enlaces con los sitios activos de los enzimas, desactivándolos (Sukkata y col., 2008). Bennis y col. (2004) determinaron que el eugenol producía alteraciones tanto de la membrana como de la pared celular de *S. cerevisiae*. Además, el eugenol, puede bloquear la síntesis de la pared celular o alterar su estructura, provocando la disfunción de la pared celular y el aumento de la permeabilidad, provocando la muerte de las levaduras (Bang y col., 2000; Wang y col., 2005; Yen y Chang, 2008). Además, Darvishi y col. (2013) determinaron que el eugenol interfiere con los transportadores responsables de la absorción de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada situados en la membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*.

El mecanismo de acción antimicrobiana del US se basa en la formación de especies reactivas y de radicales libres, así como en la cavitación (Zinoviadou y col., 2015). Durante el tratamiento con US, se produce la disrupción de estructuras

intracelulares con fragmentación de la membrana; además, la generación de cavitación interna y de microcorrientes, modifica la estructura celular y produce finalmente la fragmentación de las células (López-Malo y col., 2005b). Se ha demostrado que la cavitación extra- e intracelular erosiona la pared celular, interrumpe las funciones de componentes estructurales y funcionales hasta causar la lisis y muerte celular (Butz y Tauscher, 2002; Guerrero y col., 2001a; Guerrero y col., 2005; Marx y col., 2011). Las micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión de los efectos estructurales del US sobre células de *S. cerevisiae* muestran que la termosonicación provoca la perforación de las paredes celulares y la rotura de la membrana plasmática con fuga del contenido, rotura o fragmentación de la pared, y alteración citológica de los orgánulos (Guerrero y col., 2001a; Guerrero y col., 2005; Wordon y col., 2012).

La variación en los resultados obtenidos por los diferentes autores mencionados anteriormente, podría explicarse porque la letalidad de los tratamientos de US dependen de la amplitud, la intensidad, la potencia y la temperatura (Guerrero y col., 2001a; López-Malo y col., 1999; López-Malo y col., 2005b), especialmente cuando se utilizan bajas temperaturas (López-Malo y col., 2005a; Luo y col., 2012; Wordon y col., 2012); y se ha informado que, cuando se aplica el US a grandes amplitudes, las burbujas de cavitación creadas pueden crecer tanto durante la fase de rarefacción que el tiempo disponible para el colapso es insuficiente. Por lo tanto, dependiendo de las propiedades reológicas del líquido (la presión de vapor, la tensión superficial, la viscosidad), el efecto de cavitación puede verse disminuido con las amplitudes más grandes (Ciccolini y col. 1997; López-Malo y col., 1999; Luo y col., 2012). La eficiencia del tratamiento de US para inactivar microorganismos también se ve afectada por un aumento de la temperatura (Ferrante y col., 2007). López-Malo y col. (1999) encontraron que, a temperaturas superiores a 50°C, se reducen los beneficios de la aplicación del US, probablemente como resultado de un aumento del efecto térmico y de la reducción de la intensidad (potencia) de la cavitación. Cuando el tratamiento de US se combina con la adición de agentes antimicrobianos, la inactivación depende del agente antimicrobiano y su concentración, del medio, del pH, de la aw, de la amplitud, de la frecuencia del US y del microorganismo estudiado (Alzamora y col., 2011; Bevilacqua y col., 2013; Bevilacqua y col., 2014; Ferrante y col., 2007; Gastélum y col., 2012; Guerrero y col., 2005; Guerrero y col., 2001b; López-Malo y col., 2005a; 2005b).

Los resultados obtenidos en este capítulo concuerdan con los autores anteriores, porque cuando se aplicó la temperatura de 50°C, AEC y US se obtuvo la mayor reducción logarítmica en ambos zumos, y se detectó también que la inactivación dependía de la composición y de las propiedades físico-químicas de ambos zumos estudiados.

### **2.3.3. Supervivencia de *S. cerevisiae* en ZnN y ZnG tratados durante su almacenamiento a 5°C**

La Figura 2.3 muestra la evolución de las células supervivientes a lo largo del almacenamiento refrigerado (5°C, 28 días) en el control y en el ZnN y el ZnG tratados. Los dos factores (US, AEC) a 50°C y su combinación (US+AEC) a 50°C tuvieron un efecto significativo sobre la supervivencia de *S. cerevisiae* en ambos zumos. Las muestras control mantuvieron la población de levaduras sin cambios significativos durante el almacenamiento refrigerado (28 días, 5°C). Los recuentos más bajos se obtuvieron en las muestras de ZnN (Figura 2.3a) y el ZnG (Figura 2.3b) tratadas por combinación de US y 20 mg/L de AEC a 50°C y conservadas a 5°C. Durante este periodo, mientras que las muestras S1, S2 y S3 mantuvieron valores similares de población de levadura sin cambios significativos en ambos zumos, el tratamiento de la muestra S4 disminuyó significativamente la población de levadura en el ZnN durante todo el periodo de almacenamiento. Pero para el ZnG, no se observó el mismo efecto para la muestra S4, pues se produjo un incremento en el recuento de *S. cerevisiae* el día 4, seguido de una disminución hasta el final del periodo de refrigeración. Concretamente, la población de *S. cerevisiae* en ZnN y el ZnG tratados por combinación de US y 20 mg/L de AEC a 50°C durante 30 minutos, disminuyó  $1,55 \pm 0,19$  y  $0,68 \pm 0,16$  ciclos logarítmicos respectivamente al final del periodo de refrigeración. La diferencia en la población de *S. cerevisiae* entre los controles y las muestras tratadas S4 fue de 2,54 y 2,57 ciclos logaritmos en el ZnN y el ZnG respectivamente. Bajo las condiciones experimentales de este estudio, la combinación de 20 mg/ de AEC y US a 50°C tuvo un efecto significativo en la inactivación y supervivencia de *S. cerevisiae* en ambos zumos.

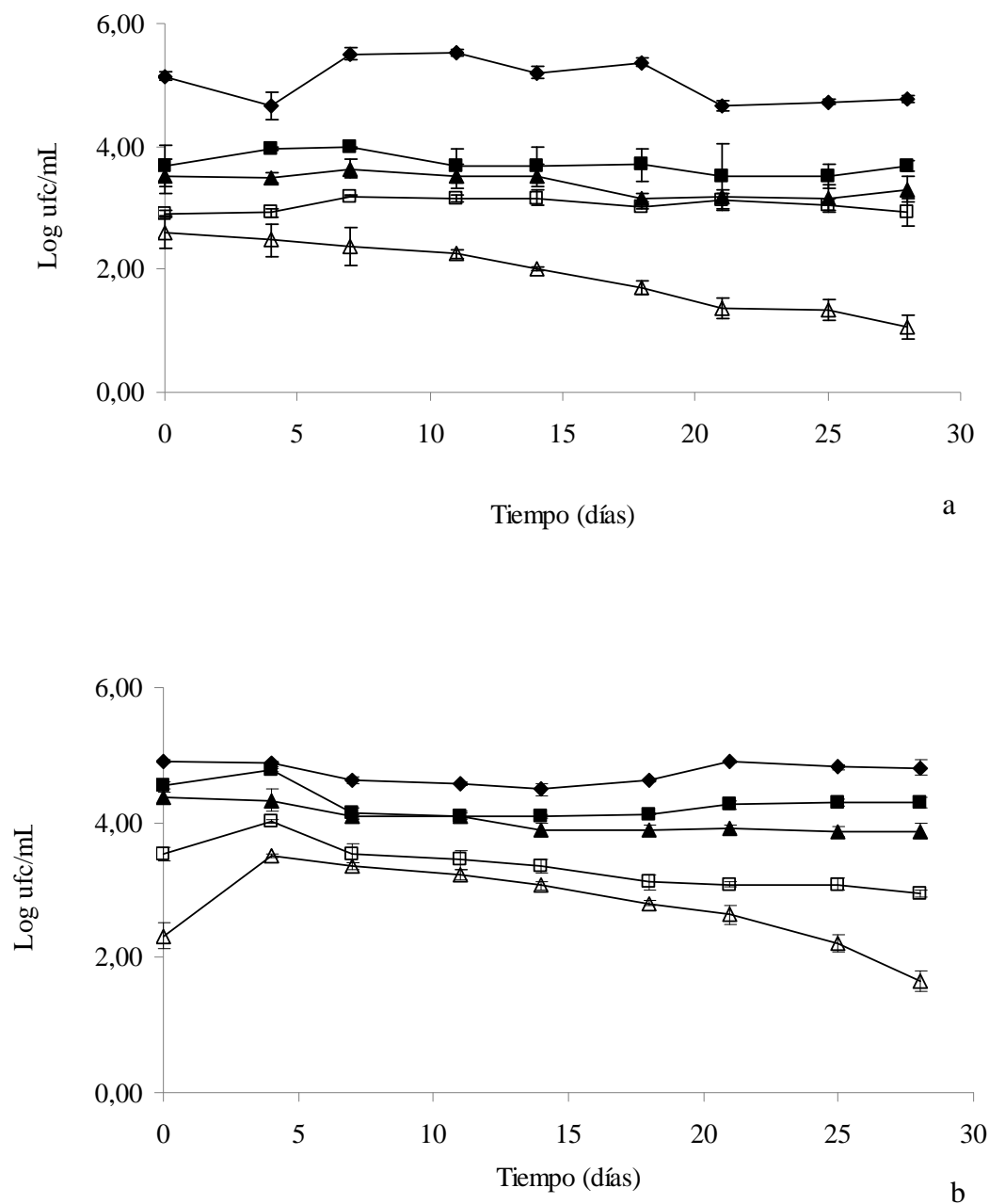


Figura 2.3. Evolución de células de *S. cerevisiae* en zumo natural de naranja (a) y en zumo natural de granada (b) tratados y conservados en refrigeración (28 días, 5°C) (◆control; ■S1: 50°C; ▲S2: 50°C+20 mg/L; □S3: 50°C+US; △S4: 50°C+20 mg/L+US).

Pocos trabajos están disponibles en la literatura acerca de la evolución de *S. cerevisiae* en zumos de frutas tratados por termosonicación y conservados bajo almacenamiento refrigerado. Ferrario y col. (2015) determinaron que la combinación de US+20s de luz pulsada a  $44\pm 1^\circ\text{C}$  (10 minutos) dio lugar a 3,6 reducciones logarítmicas de *S. cerevisiae* inoculada en zumos de manzana, pero después de 15 días de almacenamiento a  $5^\circ\text{C}$ , la población fue capaz de recuperar 1,1 ciclos logarítmicos. Valero y col. (2007) determinaron que el almacenamiento refrigerado a  $5^\circ\text{C}$  no fue eficaz para controlar el crecimiento de aerobios mesófilos (AM) y hongos hasta 42 días de almacenamiento a  $5^\circ\text{C}$  en ZN sometido a US de baja y alta frecuencia.

Bajo las condiciones experimentales estudiadas en este capítulo, la combinación de 20 mg/L de AEC y US a  $50^\circ\text{C}$  tuvo un efecto significativo en la inactivación y la supervivencia de *S. cerevisiae* en el ZnN y el ZnG, siendo el mayor efecto en el ZnG, lo que podría atribuirse a su contenido en taninos y en antocianinas. Además, el AEC tiene un carácter lipófilo y podría acumularse en la bicapa lipídica de las células, perturbando y sensibilizando la membrana a la acción del US. Además, las ondas de US debilitarían la pared celular de *S. cerevisiae* y por lo tanto los componentes activos del AEC podrían penetrar en la célula mejorando la acción antimicrobiana durante el período de refrigeración. Por todo ello, la población de levaduras no sería capaz de recuperarse durante el almacenamiento refrigerado.

La combinación de AEC, termosonicación y la composición de los zumos podría tener un efecto sinérgico sobre la supervivencia de *S. cerevisiae* durante el almacenamiento refrigerado. El AEC y el US debilitan la membrana y la pared celular (Brul y Coote, 1999; Ferrante y col, 2007) y los componentes activos del AEC podrían penetrar en las células y mejorarían su acción antimicrobiana durante el almacenamiento refrigerado. En cuanto a la composición nutricional de los zumos, se sabe que el almacenamiento del zumo comercial de granada durante un periodo largo de tiempo a  $5^\circ\text{C}$  afecta negativamente el contenido en antocianinas, produciéndose una reducción del  $\sim 15\%$  (Nuncio-Jáuregui, y col, 2015) y que el tratamiento de US (20 kHz, 100W, ciclo de trabajo del 50%, 15 minutos,  $<30^\circ\text{C}$ ) y el almacenamiento refrigerado de 10 semanas ( $4^\circ\text{C}$ ) conserva mejor los fenoles totales y la actividad

antioxidante de los zumos durante el almacenamiento respecto de las muestras no tratadas y las muestras control pasteurizadas (Khandpur y Gogate de 2015).

Lo anterior podría explicar por qué al final del almacenamiento refrigerado, la población de *S. cerevisiae* en ZnN y ZnG, tratados con US y AEC a 50°C durante 30 minutos, disminuyó  $1,55 \pm 0,19$  y  $0,68 \pm 0,16$  ciclos logarítmicos, respectivamente; debido a la pérdida en el ZnG de antocianinas por efecto del almacenamiento refrigerado, las cuales tienen actividad antimicrobiana, como ya se ha mencionado anteriormente. Por lo tanto, la combinación de AEC, termosonicación y la composición nutricional de los zumos podría tener un efecto sinérgico sobre la inactivación de *S. cerevisiae* y su supervivencia en el ZnN y el ZnG.

En conclusión, se logró una inactivación efectiva de *S. cerevisiae* con una concentración de AEC en los zumos (20 mg/L) aceptada por los consumidores. La mayor inactivación de *S. cerevisiae* se logró en muestras de ZnN y de ZnG tratadas por combinación de US y 20 mg/L de AEC a 50°C. Comparado con el tratamiento a 50°C, el tratamiento combinado de US y 20 mg/L de AEC a 50°C obtuvo una reducción del valor D del 75% para el ZnN y del 97% para el ZnG. Las células supervivientes de *S. cerevisiae* en las muestras de zumo tratados por combinación de US y 20 mg/L de AEC a 50°C disminuyeron en comparación con los otros tratamientos durante el periodo de almacenamiento refrigerado, los cuales mantuvieron la población superviviente sin cambios significativos durante este periodo. La inactivación de *S. cerevisiae* en los zumos y su posterior supervivencia en refrigeración podrían depender también del pH y de la presencia de compuestos bioactivos, como antocianinas y taninos, de los zumos estudiados.

## **CAPÍTULO 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SONICACIÓN EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL ZUMO NATURAL DE NARANJA**

### **3.1. Justificación del estudio**

El tratamiento térmico del zumo de naranja con pulpa afecta a la calidad del producto final (Cliff y col., 1991) y, especialmente, a la pérdida de ácido ascórbico (Nagy y Smoot, 1977). Kabasakalis y col. (2000) reportaron una pérdida del 60-67% del contenido de ácido ascórbico en zumo de naranja procesado comercialmente y una pérdida de 7-13% en zumo de naranja fresco sin procesar durante un período de almacenamiento refrigerado de 31 días.

La termosonicación se ha empleado como alternativa al tratamiento térmico para procesar zumos de frutas tales como zumo de manzana, zumo de fresa, zumo de mora y zumo de naranja (Cheng y col., 2007; Fu y col., 2014; González-Centeno y col., 2014; Riener y col., 2008; Tiwari y col., 2008a, 2009b). Se sabe que el procesamiento con US de los zumos tiene un efecto mínimo sobre la degradación de los parámetros claves de calidad en zumos de fresa y de zarzamora (Tiwari y col., 2008a). Por otro lado, durante el almacenamiento a 10°C del zumo sonicado, éste tiene una mayor retención del ácido ascórbico en comparación con las muestras control procesadas térmicamente (Tiwari y col., 2009d). Fu y col. (2014) mostraron que el tratamiento con US no afectaba a la capacidad antioxidante, probablemente porque la extracción por ultrasonidos es rápida. Muchos estudios ilustran que el tratamiento de sonicación mejora de forma significativa los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico, la turbidez, y la capacidad antioxidante total, además de reducir significativamente la población microbiana de los zumos de frutas (Abid y col., 2013).

El mayor problema de los zumos de frutas sin procesar, es la contaminación microbiana por bacterias ácido tolerantes, mohos y levaduras y bacterias patógenas, que conduce al deterioro de las propiedades nutricionales y sensoriales afectando principalmente a los ingredientes funcionales, al color, al sabor y al olor; así como a



enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por las bacterias patógenas y los hongos toxigénicos (Tournas y col., 2006). La sonicación es un método no térmico de conservación de alimentos que tiene la capacidad de inactivar microorganismos en los zumos de frutas sin causar los efectos secundarios comunes asociados a los tratamientos térmicos convencionales (Gómez y col., 2011; Knorr y col., 2004; Tiwari y col., 2008a). Se ha informado de que el US de potencia (US de baja frecuencia) es efectivo contra los patógenos transmitidos por los alimentos que se encuentran en el ZN (Valero y col., 2007).

El objetivo específico de este estudio fue investigar el efecto de la sonicación sobre los compuestos bioactivos y la microflora del ZnN.

## **3.2. Diseño experimental y metodología**

### **3.2.1. Preparación del zumo de naranja**

Las naranjas frescas (*Citrus sinensis* variedad Navelina) se compraron en un supermercado local en Murcia, España. El zumo se preparó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.1 del capítulo 2, pero en esta ocasión el zumo no fue pasterizado. El zumo se dividió en la muestra control y en las muestras a tratar con sonicación.

### **3.2.2. Tratamientos de sonicación**

Los tratamientos de sonicación (Salleh-Mack y Roberts, 2007; Jabbar y col., 2014) se llevaron a cabo en un vaso cilíndrico de doble pared en la que se hizo circular agua con un baño termostático (Digiterm 100, PSelecta®). Se controló la temperatura del baño termostático para evitar que la temperatura en la muestra tratada subiera por encima de los 46°C. Las temperaturas se registraron antes y después de cada tratamiento. El US (24 kHz; 105  $\mu$ m; 33,31 W/mL) se aplicó de forma continua con un procesador de ultrasonidos UP200H (Hielscher Ultrasound Technology) utilizando una sonda S3 (Hielscher).

Los tratamientos de sonicación aplicados se describen en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Diseño experimental y parámetros de los tratamientos de sonicación.**

Muestras	Tiempo (minutos)	T <sub>0</sub> muestra (°C)	T <sub>f</sub> muestra (°C)	Energía (KJ)	Disipación de energía calorimétrica (KJ)
Control	-	25,0 ± 0,6	25,0±0,6	-	-
A	1	25,4±0,2	27,1±0,6	60	0,5±0,1 <sup>c</sup>
B	10	25,0±0,3	43,4±0,8	600	2,3±0,1 <sup>b</sup>
C	20	25,1±0,4	43,0±0,6	1.199	2,4±0,1 <sup>b</sup>
D	30	25,1±0,3	45,6±0,6	1.799	2,7±0,1 <sup>a</sup>

Valores en la misma columna seguidos por una letra diferente, son significativamente diferentes (p <0,05)

Las muestras de ZnN (30 mL) fueron colocadas en un vaso cilíndrico de doble pared de 50 mL a través de la cual se hizo circular agua con el baño termostático previamente descrito. La profundidad de la sonda se mantuvo a 25 mm en las muestras de zumo. Se registró el aumento observado en la temperatura de las muestras debido a la sonicación. El sobrecalentamiento de las muestras (temperatura medida con el termopar con una precisión de ± 0,2°C) durante el tratamiento con US se evitó mediante la circulación de agua a través de la cámara de tratamiento. Los resultados se compararon con la muestra control (sin tratar). Cada condición experimental se realizó por triplicado.

Se calculó la disipación de energía calorimetría según la ecuación de Gogate y col. (2011b) modificada:

$$P_{cal} = (mC_p\Delta T_a)_{líquido} + (m_iC_{pi}\Delta T_a)_{pared\ interna\ reactor} + (hA\Delta T_b\Delta t)$$

donde m es la masa del líquido (kg), m<sub>i</sub> es la masa del reactor/transductores (kg), C<sub>p</sub> es el calor específico del líquido a presión constante (J/kgK), C<sub>pi</sub> es el calor específico del material del reactor (J/kgK), ΔT<sub>a</sub> es el cambio de temperatura (K) en el zumo, h es el coeficiente de transferencia de calor por convección (W/m<sup>2</sup>K), A es el área de transferencia de calor (m<sup>2</sup>), ΔT<sub>b</sub> es el cambio de temperatura (K) entre el zumo y

el aire. Se tomó en consideración que a escala de laboratorio, al usar un volumen pequeño de muestra (del rango de pocos mililitros), la transferencia de calor por convección y por conducción tiene poca importancia (Gogate y col., 2011b; Sutkar y Gogate, 2009).

### **3.2.3. Análisis microbiológico**

Inmediatamente después de cada tratamiento, se realizaron los recuentos de aerobios mesófilos (AM), y los de mohos y levaduras (ML) en todas las muestras utilizando el método de vertido en placa. Se prepararon diluciones decimales seriadas en agua de peptona al 0,1% (Merck, Alemania) de las muestras de ZnN y las alícuotas de las muestras se sembraron en profundidad. Para los recuentos de AM se utilizó agar PCA y para ML agar PCA con 0,1 g/L de Cf (Tournas y col., 1998). Dos placas se utilizaron para cada dilución decimal y se incubaron a 37°C/24 h y a 25°C/48 h respectivamente. Los recuentos se expresaron como log ufc/mL.

### **3.2.4. Determinación del contenido en compuestos bioactivos y de la actividad antioxidante**

#### **3.2.4.1. Determinación del contenido en fenoles totales (FT)**

El contenido en FT de las muestras de zumo se determinó usando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con ligeras modificaciones. El control y las muestras se diluyeron 1:10 en metanol:agua (6:4) y se centrifugaron (10 minutos, 3,000 rpm). Se añadieron 125 µL de muestra diluida, 125 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,25 mL de solución saturada de carbonato sódico (7%). Finalmente, se añadió 1,3 mL de agua destilada a la mezcla y se agitó suavemente en un vórtex. Después de 90 minutos de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, la absorbancia se midió por triplicado a 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation). Se preparó una curva de calibración usando una solución estándar de ácido gálico (0-600 µg/mL), y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por 100 mL de zumo.

#### 3.2.4.2. Determinación del contenido en flavonoides totales (FvT)

Para determinar el contenido en FvT, se utilizó el método descrito por Sakanaka y col. (2005) con ligeras modificaciones. Brevemente, 250  $\mu$ L de la muestra centrifugada (10 minutos, 3,000 rpm) se mezcló con 1,25 mL de agua destilada, seguido de la adición de 75  $\mu$ L de una solución de nitrito de sodio al 5% y se mezcló suavemente con un vortex. Después de esperar 6 minutos, se añadió 150  $\mu$ L de una solución de cloruro de aluminio al 10% y se agitó suavemente. La mezcla se dejó en reposo durante 5 minutos antes de añadir 0,5 mL de hidróxido de sodio 1M. Finalmente, se añadió 0,275 mL de agua destilada y se mezcló bien. La absorbancia se midió inmediatamente por triplicado a 510 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de catequina por 100 mL de zumo.

#### 3.2.4.3. Determinación del contenido en carotenoides totales (CT)

El contenido de CT ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno) se determinó por el método de Liao y col. (2007), con algunas modificaciones. Se midió la absorbancia a 445, 450 y 470 nm respectivamente usando un espectrofotómetro UV-VIS (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation) a temperatura ambiente. Se mezclaron 25 mL de muestra de zumo con 80 mL de n-hexano/acetona (1:1, v/v) en un embudo de separación y se agitó bien, sacándose la fase orgánica después de la separación. Una vez más, mediante el uso de 15 mL de n-hexano/acetona (1:1, v/v), la fase acuosa se extrajo varias veces hasta quedar incolora. La fase orgánica se deshidrató con sulfato de sodio anhidro. Los resultados se expresaron como mg de carotenoides por 100 mL de zumo.

#### 3.2.4.4. Determinación del contenido en ácido ascórbico (AA)

El contenido de ácido ascórbico en las muestras se determinó usando el método de titulación 967.21 del 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) (AOAC, 1995), con pequeñas modificaciones. Para la valoración del DCPIP se preparó una solución estándar de ácido ascórbico (1mg/mL). Se transfirió una alícuota de 2 mL a un matraz Erlenmeyer, se agregaron 5 mL de solución de ácido metafosfórico-ácido acético (solución extractora). Se realizó la titulación rápidamente con DCPIP en una bureta de 50 mL hasta que se observó la aparición de un tono rosa ligero. Se realizó la titulación del blanco constituido por 7 mL de la solución extractora más el volumen gastado en la

titulación del estándar en agua, y se realizó la titulación con DCPIP hasta el tono rosa. Al valor obtenido del estándar se le restó el del blanco, y la concentración del DCPIP se expresó como mg de ácido ascórbico equivalentes a 1 mL de indofenol. Para la determinación del contenido en ácido ascórbico en la muestra, se adicionó a la muestra su misma cantidad en solución extractora y se mezcló bien. Se filtró con papel de filtro Whatman (No. 1). Se tomó una alícuota de 2 mL del filtrado más 5 mL del ácido metafosfórico-acético en un matraz Erlenmeyer, y se realizó la titulación con el DCPIP hasta que viró a rosa. Se realizó por triplicado. Al volumen registrado de titulación se le restó el gastado en el blanco. Se determinó la concentración de ácido ascórbico empleando la siguiente ecuación:

$$\text{mg ácido ascórbico} = \text{volumen titulación muestra} / \text{volumen titulación estándar}$$

#### 3.2.4.5. Determinación de la actividad antioxidante.

Uno de los métodos empleados para determinar la actividad antioxidante de un compuesto es el ensayo de DPPH, en el cual se produce la reacción entre un compuesto antioxidante específico con un radical libre estable, como es el DPPH, en el que la reducción de la concentración de DPPH causada por el compuesto antioxidante disminuye los valores de absorbancia.

La actividad antioxidante del ZnN se determinó con el ensayo del DPPH siguiendo el método descrito por Blois (1958) con algunas modificaciones. A una alícuota conocida (2,5 mL) de muestra diluida (metanol) de zumo, se añadió 0,5 mL de solución 1 mM (en metanol) de DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil). La mezcla de reacción se agitó con cuidado con el vortex y se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 30 minutos. La absorbancia se determinó a 517 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Electron Corporation, Nicolet evolution 300). La actividad antioxidante fue calculada con la siguiente ecuación:

$$(\%I) = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$$

donde  $A_0$  es la absorbancia del control a los 30 minutos y  $A_1$  es la de la muestra a los 30 minutos. Las muestras se analizaron por triplicado.

### **3.2.5. Determinación del color, del pH y de los °Brix**

Se determinó el color utilizando el método espectrofotométrico reportado por Kelebek y col. (2008). Se midió directamente la absorbancia de las muestras de ZnN a 420, 520, y 620 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Electron Corporation, Nicolet evolución 300). Se calcularon las siguientes variables: intensidad de color (IC) como la suma de absorbancia a 420 nm, 520 nm, y 620 nm; el tono (Tn) como la división de la absorbancia a 420 nm entre la absorbancia a 520 nm; el porcentaje de color amarillo (%Am), de color rojo (%Rj) y de color azul (%Az), que se calcularon dividiendo la absorbancia a 420, 520 y 620 nm entre la intensidad de color (IC), respectivamente. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

El pH y los °Brix del ZnN se midieron siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.2 del capítulo 2. Todas medidas se realizaron por triplicado.

### **3.2.6. Determinación del índice de pardeamiento no enzimático (IP)**

Se centrifugaron (10 minutos a 7.800 xg) las muestras de ZnN (10 mL) para eliminar las partículas gruesas de la muestra. Se añadieron 5 mL de etanol (95%) a 5 mL del sobrenadante y se repitió la centrifugación. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 420 nm usando un espectrofotómetro UV-Visible (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation) con una cubeta de 1 cm de paso óptico, usando agua destilada como blanco. Las mediciones se realizaron por triplicado (Fustier y col. 2011).

### **3.2.7. Análisis sensorial**

Antes de la evaluación sensorial, las muestras de ZnN fueron refrigeradas (5°C), codificadas de forma aleatoria y se sirvieron (30 mL) a 15°C junto con agua sin gas (Lanjarón, España) a los panelistas (n = 10). El ZnN sin tratar (control) y las muestras tratadas se presentaron a los panelistas a los que se les pidió describir las diferencias entre las muestras utilizando una escala hedónica de 10 puntos, donde 1 significa “me disgusta mucho” y 10 “me gusta mucho”. La puntuación de 5 fue el umbral mínimo de aceptabilidad de las muestras (Walkling-Ribeiro y col. 2009).

### **3.2.8. Estudio de vida útil**

La metodología utilizada en este estudio se basó en trabajos anteriores (Ferrario y col., 2015; Valero y col., 2007), pero con algunas modificaciones. Las réplicas del control y de las muestras tratadas de ZnN envasadas asépticamente en recipientes de polipropileno con tapa de rosca de 50 mL se analizaron después de 0, 15 y 28 días de almacenamiento a 5°C. El zumo se agitó y se determinó el recuento de microorganismos aerobios y el de mohos y levaduras siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior (3.2.7). Se hicieron dos placas por dilución.

También se siguió la evolución de los atributos sensoriales y del índice de pardeamiento no enzimático durante el estudio de vida útil empleando la metodología descrita anteriormente.

### **3.2.9. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se presentaron como media±desviación estándar (ds). Se realizó un ANOVA de un factor con un nivel de significación de  $p < 0,05$ ; y las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante la prueba de comparación de Duncan. El análisis estadístico se determinó usando el STATGRAPHICS plus Versión 5.1 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, USA

## **3.3. Resultados y discusión**

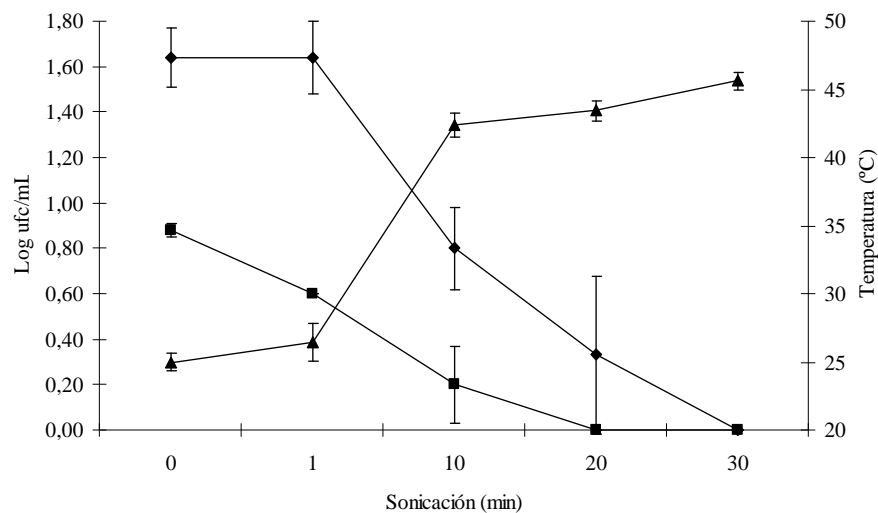
### **3.3.1. Análisis microbiológico**

En nuestro estudio, se observó presencia de microorganismos aerobios, así como de mohos y levaduras en la muestra control de ZnN. Cuando se aplicaron los tratamientos de sonicación, se observó una clara reducción de la carga microbiana (Figura 3.1). De hecho, el recuento de microorganismos aerobios mostró una reducción significativa en las muestras sometidas a US durante 30 minutos, mientras que 20 minutos de sonicación fueron suficientes para eliminar mohos y levaduras.

Anteriormente, se pensaba que los alimentos ácidos, como los zumos de cítricos, eran seguros para el consumo directo porque la supervivencia de los microorganismos o

patógenos era difícil en los niveles más bajos de pH. Sin embargo, los estudios disponibles han reportado la supervivencia de microorganismos patógenos a pH bajo durante largos periodos de tiempo (Wang y col., 2010).

Otros autores han descrito que el tratamiento con US de potencia es eficaz reduciendo la presencia de patógenos transmitidos por los alimentos en zumos de guayaba, de naranja y de tomate (Valero y col, 2007; Cheng y col, 2007; Adekunte y col, 2010). La reducción de la carga microbiana podría atribuirse a los mecanismos combinados físicos y químicos que se producen durante la cavitación (Abid y col. 2014a).



**Figura 3.1. Efecto de la sonicación en la supervivencia de los microorganismos en el zumo natural de naranja (◆ aerobios mesófilos; ■ mohos y levaduras; ▲ temperatura).**

Abid y col. (2014a) estudiaron la inactivación de las células microbianas en ZM tratado con termosonicación (20 kHz; 0,30 W/cm<sup>3</sup>; 5 y 10 min; 20, 40 y 60°C) aplicando la sonda ultrasónica modelo USP 40-10 y observaron que la inactivación más alta se obtenía según aumentaba el tiempo de tratamiento de sonicación. Sin embargo, otros investigadores han reportado que la sonicación por sí sola no es eficaz para conseguir la descontaminación de los alimentos, siendo necesario combinar la sonicación con otros tratamientos tales como la aplicación de presión y/o de temperatura moderada (Chemat y col., 2011).



Se ha informado de que la termosonicación causa la inactivación de patógenos en zumos de arándano, de piña y de uva (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2012). En nuestro estudio, el aumento de la temperatura en las muestras asociado al tratamiento de sonicación, redujo significativamente el recuento de los microorganismos y llevó a la descontaminación total de las muestras a los 30 minutos de tratamiento.

Se ha demostrado que el US aumenta la sensibilidad microbiana a la temperatura, a la alta presión osmótica y al pH bajo debido a los cambios estructurales producidos en la membrana externa de la célula (Wordon y col., 2012). En concreto, se obtienen reducciones microbianas mayores en muestras de zumos tratados con combinación de US y temperaturas moderadas, lo que demuestra que existe sinergismo entre sonicación y tratamiento térmico moderado (Wordon y col., 2012).

Los resultados obtenidos en este estudio, concuerdan con los autores anteriores, pues se obtuvo un aumento de la inactivación microbiana en el ZnN tratado por combinación de US y tratamiento térmico moderado.

### **3.3.2. Determinación del contenido en compuestos bioactivos y de la actividad antioxidante**

#### **3.3.2.1. Determinación del contenido en FT**

Se produjo un aumento significativo en el contenido de FT en las muestras sonicadas de ZnN en comparación con el control (Tabla 3.2). Este aumento fue de 42,74 hasta 69,45 mg Eq Ac Gal/100 mL para un tratamiento de sonicación de 30 minutos.

Estos resultados muestran asimismo una mejora significativa de los compuestos fenólicos (FT) con tratamientos de sonicación a temperaturas más elevadas. De hecho, durante los 10, 20 y 30 minutos de tratamiento, las temperaturas registradas fueron de 43,4°C, 43,0°C y 45,6°C, respectivamente, y las cantidades de FT fueron de 68,44, 68,37 y 69,45 mg Eq Ac Gal/100 mL, respectivamente.

Resultados similares fueron observados por Abid y col. (2014a), que obtuvieron una mejora significativa en el contenido de FT en muestras de ZM sonificado a 60°C. El aumento en los compuestos fenólicos se puede atribuir a la ruptura de las paredes celulares por el tratamiento de termosonicación, que podría haber facilitado la liberación de los compuestos fenólicos combinados. Fu y col. (2014) empleando la microscopía

electrónica de barrido, informaron que el US cambia la estructura superficial del material de la planta por lo que es más fácil extraer los compuestos bioactivos.

**Tabla 3.2. Efecto de los tratamientos de sonicación en el contenido en fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides totales, actividad antioxidante y ácido ascórbico en el zumo natural de naranja.\***

Muestras	FT <sup>1</sup>	FvT <sup>2</sup>	%Inh <sup>3</sup>	CT <sup>4</sup>			AA <sup>5</sup>
				$\alpha$	$\beta$	L	
<b>Control</b>	42,7 ± 0,8 <sup>d</sup>	8,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	21,7±0,8 <sup>d</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>d</sup>	28,9 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>1 min</b>	60,2 ± 0,9 <sup>c</sup>	13,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	37,5±0,3 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,005 <sup>c</sup>	29,4 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>10 min</b>	68,4 ± 0,05 <sup>b</sup>	14,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	35,7±0,3 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,001 <sup>b</sup>	36,8 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>20 min</b>	68,3 ± 0,02 <sup>b</sup>	13,9 ± 0,03 <sup>a</sup>	34,7±0,4 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,005 <sup>a</sup>	37,6 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>30 min</b>	69,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	14,3 ± 0,02 <sup>a</sup>	35,2±0,4 <sup>bc</sup>	0,6 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,005 <sup>a</sup>	37,6 ± 0,02 <sup>a</sup>

Valores con letras diferentes en la misma columna (a-d) son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí.

\* Los valores se expresan como las medias de tres repeticiones±desviación estándar (ds).

1: mg de equivalentes de ácido gálico/100 mL.

2 mg de equivalentes de catequina/100 mL.

3: porcentaje de inhibición [ácido ascórbico (0,01 mg/mL): 38,3; catequina (0,01 mg/mL): 68,5]

4: mg/100 mL.

5: mg equivalentes ácido ascórbico/100 mL.

### 3.3.2.2. Determinación del contenido en FvT

En nuestro estudio, el tratamiento con US del ZnN mejoró el contenido en FvT (Tabla 3.2). De hecho, en comparación con el control (8,78 mg Eq Cat/100 mL) se encontró un aumento significativo en todos los tratamientos de sonicación; de 11,58 a 14,32 mg Eq Cat/100 mL de zumo.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos naturales presentes en plantas (y productos vegetales) que poseen un amplio espectro de actividades químicas y biológicas. Varios estudios han demostrado una correlación positiva entre el consumo aumentado de flavonoides con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hertog y col., 1992).

Con la cavitación, se generan radicales libres hidroxilo e hidrógeno a partir de la disociación de las moléculas de agua en soluciones acuosas, debido a la alta temperatura y la alta presión generadas por el colapso de las burbujas de gas formadas (Awad y col.,

2012; Riesz y Kondo, 1992). Los radicales hidroxilos generados durante la cavitación mejoran la capacidad antioxidante de los flavonoides debido a la introducción de un segundo grupo hidroxilo en las posiciones orto- o para- del anillo B de los flavonoides (Ashokkumar y col., 2008).

#### 3.3.2.3. Determinación del contenido en CT

La Tabla 3.2 muestra el efecto de los tratamientos de sonicación sobre los CT del ZnN. Se observaron aumentos significativos en el contenido de CT ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno) en las muestras de zumo sonicadas por 1, 10, 20 y 30 minutos en comparación con la muestra control, observándose los valores más altos en las muestras tratadas con US durante 10 minutos (0,65; 0,69 y 0,47 mg/100 mL de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno respectivamente) momento en el que la temperatura era de 43,4°C.

Estudios recientes mostraron un aumento en el contenido de CT en ZN, en ZN con leche y ZM tratados con US con alta presión (Abid y col., 2014b). Este aumento de los CT por sonicación podría ser atribuido a la rotura mecánica de las paredes celulares, lo que podría aumentar el contenido en carotenoides libres en el zumo.

Se cree que los carotenoides están asociados con un riesgo reducido de varios trastornos crónicos de salud y también actuarían como reguladores de la proliferación y de la diferenciación celular, así como de estimuladores de la comunicación de célula a célula. Varios estudios muestran que los carotenoides mejoran el sistema inmune y reducen el riesgo de muchas enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas y degeneración macular (Cooper, 2004).

#### 3.3.2.4. Determinación del contenido en AA

En nuestro estudio, se observó un aumento significativo en el contenido de AA después de los tratamientos de sonicación del ZnN (Tabla 3.2). En concreto, a los 10, 20 y 30 minutos (temperatura superior a 43,0°C), las cantidades de AA eran significativamente más altas (36,76; 37,59 y 36,23 mg AA/100 mL respectivamente) en comparación con el control (28,9 mg AA/100 mL) y con la muestra tratada 1 minuto (29,4 mg AA/100 mL), mostrando el impacto beneficioso de la sonicación combinada con temperaturas moderadas para la liberación de AA.

La calidad nutricional de ZN se relaciona principalmente con el contenido en ácido ascórbico (Zerdin y col., 2003). El AA presenta actividad antioxidante potencial y protege a las células de los daños inducidos por los radicales libres. El AA contribuye sustancialmente a la prevención de la aparición de enfermedades cardiovasculares y del cáncer (Marín y col., 2002). El AA es termolábil y altamente sensible a diferentes condiciones de procesamiento. El mecanismo de la degradación de la vitamina C sigue vías aeróbicas y/o anaeróbicas y depende de las variables del procesamiento (Vieira y col., 2000).

Varios estudios reflejan la sensibilidad del AA a la sonicación. Adekunte y col. (2010) encontraron una elevada degradación del AA en zumo de tomate sonicado. Sin embargo, otros autores han reportado resultados similares a los nuestros, con un incremento del contenido de AA después de la sonicación del zumo de guayaba (Cheng y col., 2007) y del zumo de lima kasturi (Bhat y col., 2011). Se ha propuesto que la sonicación aumenta el contenido de AA debido a la eliminación del oxígeno disuelto en los zumos, el cual es esencial para la degradación del AA, a través del fenómeno de cavitación generado por la sonicación (Cheng y col., 2007).

#### 3.3.2.5. Determinación de la actividad antioxidante

La Tabla 3.2 contiene los resultados de la actividad antioxidante del ZnN determinada mediante el ensayo DPPH y expresada como porcentaje de inhibición (%Inh). Las muestras sonicadas mostraron un aumento significativo en el %Inh del DPPH en comparación con el control lo que indica un mayor concentración de antioxidantes. El %Inh del DPPH fue 37,48%, 35,70%, 34,70% y 35,21% en las muestras sonicadas 1, 10, 20 y 30 minutos respectivamente, en comparación con las muestras control (21,67%). Resultados similares se encontraron en zumo de lima kasturi sonicado (Bhat y col., 2011).

Estos resultados indican que el tratamiento de sonicación mejora significativamente la capacidad de liberación de compuestos antioxidantes. Además, los radicales hidroxilos generados durante la cavitación mejoran la capacidad antioxidante de compuestos bioactivos como los flavonoides (Ashokkumar y col., 2008).

### 3.3.3. Determinación del pH, de los °Brix y del color

El efecto de los tratamientos de sonicación sobre el pH y los °Brix del ZnN se muestra en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3. Efecto de la sonicación sobre el pH y los °BRIX en ZnN (n=3±ds).**

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>
<b>Control</b>	4,00 ± 0,03 <sup>a</sup>	10,3±0,3 <sup>a</sup>
<b>1 min</b>	3,83 ± 0,01 <sup>b</sup>	10,3±0,2 <sup>a</sup>
<b>10 min</b>	3,79± 0,01 <sup>c</sup>	10,4±0,2 <sup>a</sup>
<b>20 min</b>	3,79 ± 0,01 <sup>c</sup>	10,4±0,2 <sup>a</sup>
<b>30 min</b>	3,78 ± 0,01 <sup>c</sup>	10,5±0,3 <sup>a</sup>

Valores con letras diferentes en la misma columna (a–c) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) uno de otro

El pH del ZnN tratado mostró una disminución significativa hasta 3,83 después de 1 minuto sonicación ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, se registró la estabilización del pH a 3,7 dentro de las muestras tratadas durante 10, 20 y 30 minutos. La sonicación no indujo cambios significativos en los °Brix, incluso después de 30 minutos de tratamiento. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones en zumos sonicados de tomate y de naranja (Tiwari y col., 2008a).

El efecto de los tratamientos de sonicación sobre los atributos de color del ZnN se muestra en la Tabla 3.4. El color es un parámetro clave de la calidad de los zumos de frutas que influye directamente en los criterios de consumo para su aceptación o rechazo. En el presente estudio, se registraron diferencias significativas en todos los atributos de color entre el control y las muestras sonicadas. Las muestras de zumo sometidas a US durante 10, 20 y 30 minutos mostraron una reducción en la IC y el %Az en comparación con el control y las muestras sometidas a US durante 1 minuto. Esta reducción fue más significativa con la prolongación del tiempo de tratamiento. El mismo resultado se observó para el % Am, pero fue inversamente proporcional al tiempo. Nuestros resultados están de acuerdo con los que observaron Bhat y col. (2011) en zumo de lima kasturi sonicado.

**Tabla 3.4. Efecto de la sonicación sobre los atributos de color en ZnN (n=3±ds).**

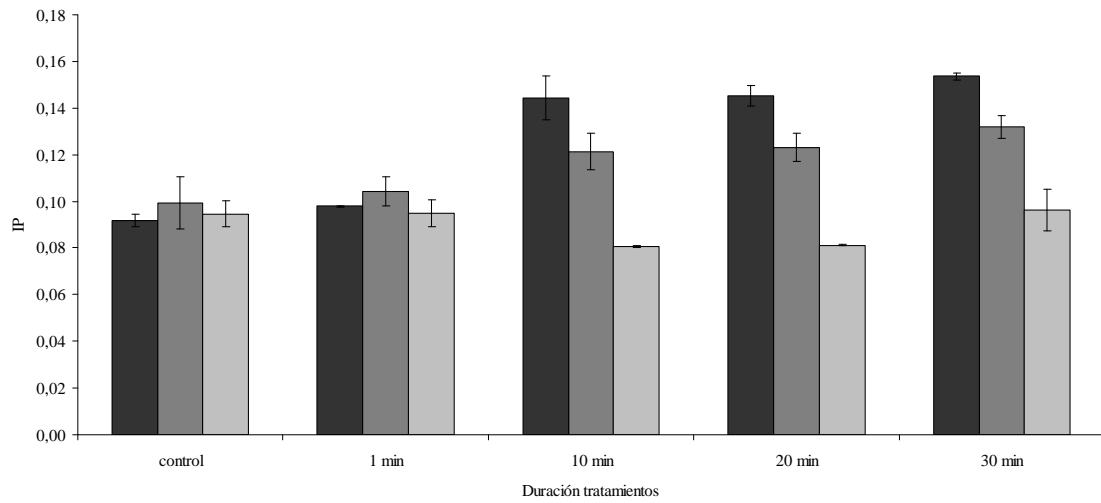
Muestra	IC	Tn	Color		
			% Am	% Rj	% Az
<b>Control</b>	2,787 ± 0,119 <sup>b</sup>	1,278±0,003	41,376±0,172 <sup>c</sup>	32,364±0,069 <sup>a</sup>	26,305±0,251 <sup>a</sup>
<b>1 min</b>	3,057 ± 0,005 <sup>a</sup>	1,334±0,001	43,224±0,045 <sup>c</sup>	32,421±0,004 <sup>a</sup>	24,337±0,044 <sup>a</sup>
<b>10 min</b>	2,512 ± 0,003 <sup>c</sup>	1,447±0,001	45,888±0,026 <sup>a</sup>	31,714±0,016 <sup>a</sup>	22,410±0,010 <sup>b</sup>
<b>20 min</b>	2,496 ± 0,003 <sup>c</sup>	1,460±0,003	46,035±0,037 <sup>a</sup>	31,555±0,040 <sup>a</sup>	22,426±0,037 <sup>b</sup>
<b>30 min</b>	2,506 ± 0,005 <sup>c</sup>	1,479±0,003 <sup>a</sup>	46,403±0,156 <sup>a</sup>	31,271±0,088 <sup>a</sup>	22,368±0,003 <sup>b</sup>

Valores con diferentes letras en la misma columna (a–c) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) uno de otro

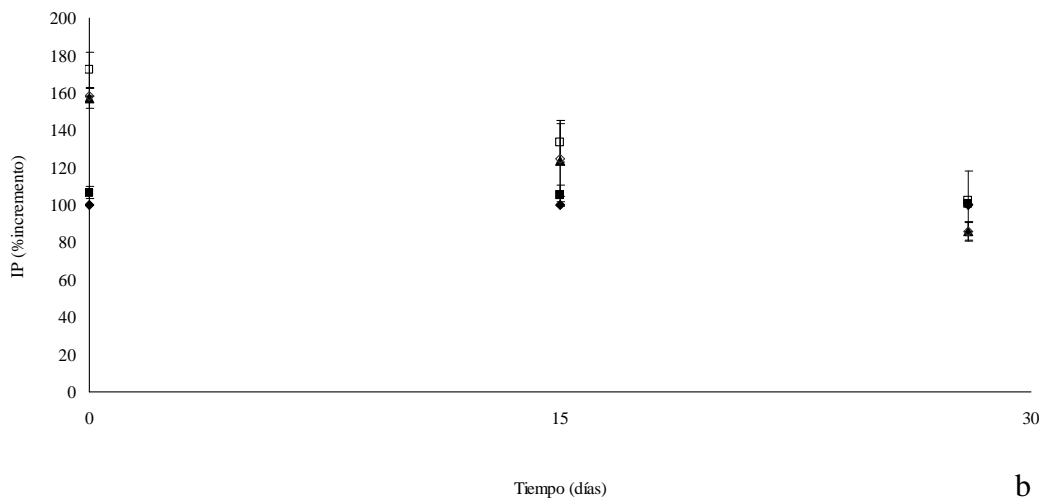
La degradación del color en las muestras de zumo sonicadas se puede atribuir a las reacciones de oxidación que se producen como resultado de la interacción con los radicales libres generados durante los tratamientos de sonicación (Mason, 1991). En concreto, la cavitación inducida durante la sonicación sería la responsable de los cambios de color en los zumos de frutas (Tiwari, y col., 2008a; Cheng y col., 2007). Durante el análisis sensorial (Figura 3.3), se detectaron estos cambios de color en las muestras sonicadas de ZnN.

### 3.3.4. Determinación del IP

El IP es uno de los parámetros que indica el pardeamiento no enzimático de ZN. En el presente estudio, el IP (Figura 3.2) aumentó significativamente en función del tiempo de tratamiento (Figura 3.2a). En el tiempo de tratamiento más bajo (1 minuto), el IP aumentó a un 107%. A los 10 minutos de tratamiento, IP aumentó a un 157%, en 20 minutos a un 158% y a los 30 minutos a un 172% (Figura 3.2b). Los estudios de cinética de reacciones de IP basados en la medida de absorbancia en zumos a 420 nm ( $A_{420}$  nm) informaron de una cinética de reacción de orden cero ( $C=C_0+K_0T$ ; siendo  $K_0$  la constante de velocidad de reacción de un modelo de cinética de orden cero), en que los valores de  $K_0 > 1$  indican que el pardeamiento no enzimático predomina sobre la destrucción del pigmento debido a la sonicación; mientras que los valores de  $K_0 < 1$  indican que la destrucción del pigmento (carotenoides) predomina sobre el pardeamiento no enzimático (Tiwari y col., 2008b).



a



b

Figura 3.2. (a): Índice de pardeamiento del zumo natural de naranja durante los tratamientos de sonicación y evolución del IP de las muestras almacenadas a 5°C durante 28 días (■ T0; ■ T15; □ T28 días) (b): Porcentaje de incremento del IP (◆control; ■ 1min; ▲ 10 min; ◇ 20 min; □ 30 min)

### 3.3.5. Análisis sensorial

La Figura 3.3 muestra los resultados del análisis sensorial a tiempo cero. Las muestras tratadas durante 0, 1 minuto y 10 minutos no presentaban diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros sensoriales analizados

(color, aroma, sabor, textura, global). Las muestras tratadas durante 20 minutos y 30 minutos presentaban una disminución de la puntuación estadísticamente significativa para todos los parámetros sensoriales analizados (aroma, sabor, global), excepto para el color y la textura, obteniéndose puntuaciones por debajo del límite de rechazo (menores de 5 puntos). Resultados similares fueron obtenidos por Gómez-López y col. (2010).

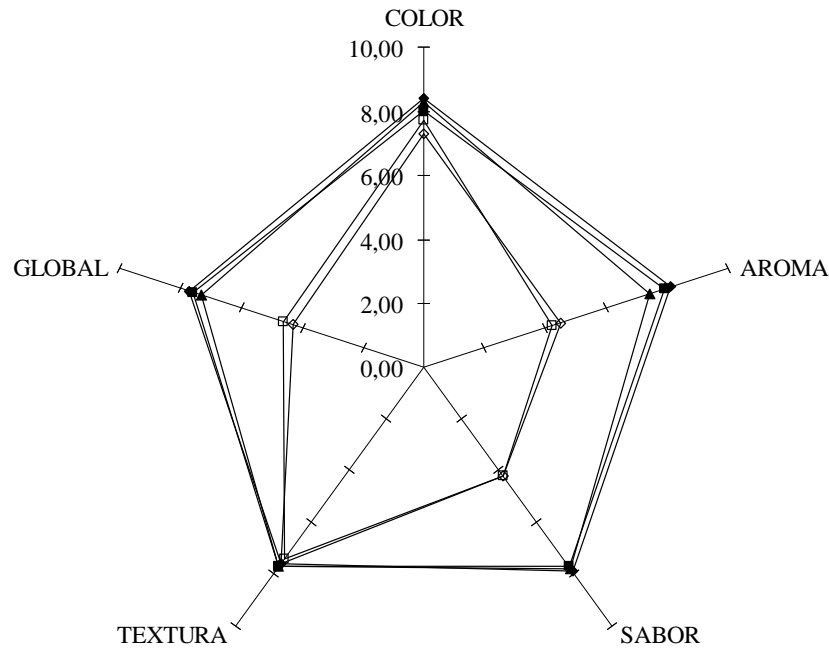


Figura 3.3. Evaluación sensorial del zumo natural de naranja tratado por sonicación (◆ control, ■1 minutos, ▲ 10 minutos, ◇20 minutos, □30 minutos).

### 3.3.6. Estudio de vida útil

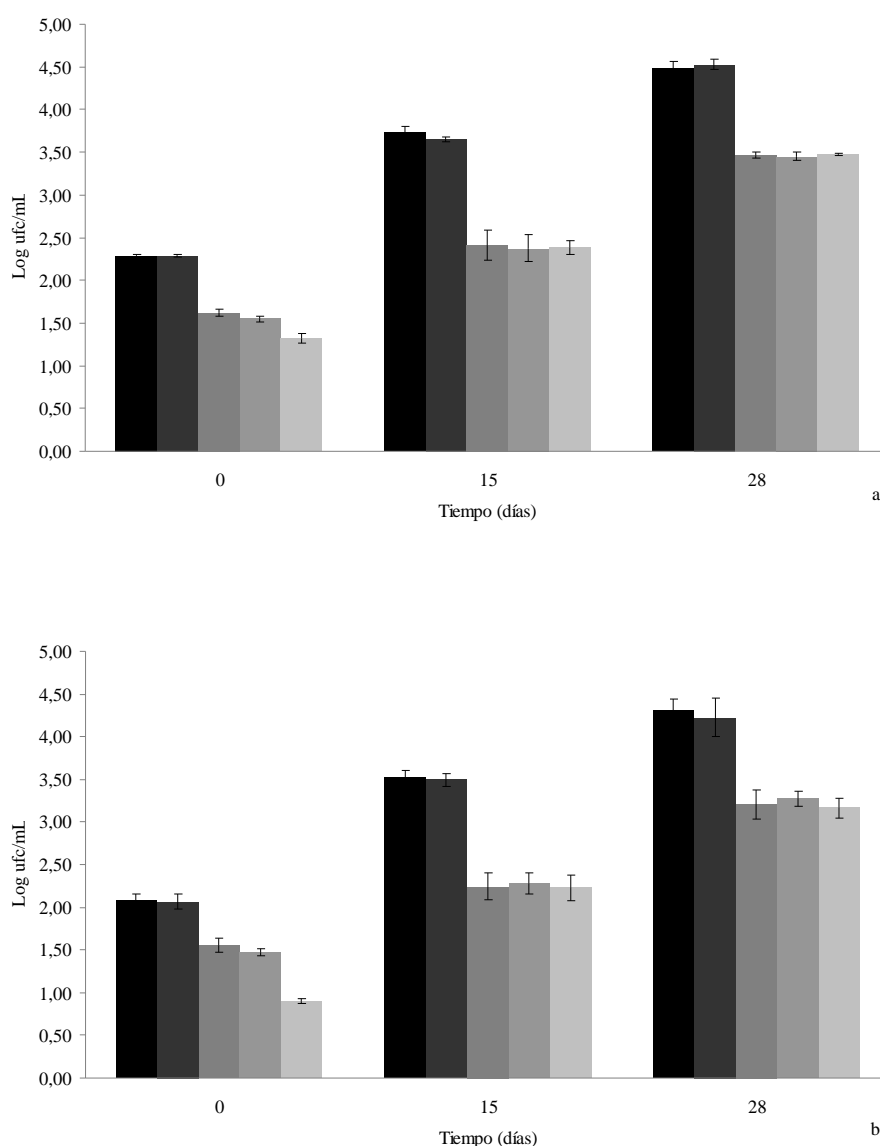
El comportamiento de los microorganismos AM y el de ML en los ZnN conservados a 5°C durante 28 días se muestra en la Figura 3.4. Para AM (Figura 3.4a), los mejores resultados a tiempo 0 se obtuvieron en ZnN con 10 minutos de sonicación pues se obtuvo una reducción microbiana significativa e importante, sin embargo con 20 y 30 minutos las reducciones adicionales fueron poco significativas. Para ML (Figura 3.4b), los mejores resultados a tiempo 0 se obtuvieron en ZnN con 30 minutos de sonicación pues se obtuvo una reducción microbiana significativa e importante; sin embargo, con los tratamientos de 10 y 20 minutos de sonicación las reducciones fueron significativas respecto al control pero no entre ellos.



Las muestras de ZnN sonicadas almacenadas a 5°C durante 15 y 28 días no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de sonicación de 10, 20 y 30 minutos. El almacenamiento refrigerado a 5°C no fue eficaz para controlar el crecimiento microbiano durante el periodo de 28 días de almacenamiento a 5°C de todas las muestras de ZnN. Durante este periodo, se observaron diferencias significativas en el crecimiento microbiano de la muestra sin tratar (control), la muestra tratada 1 minuto y las muestras tratadas 10, 20 y 30 minutos con US. Resultados similares fueron obtenidos por Valero y col. (2007), que informaron de que el almacenamiento refrigerado a 5°C no fue eficaz para controlar el crecimiento microbiano hasta 42 días de almacenamiento en ZN tratado con US de alta y de baja frecuencia.

La evolución del grado de pardeamiento no enzimático en el ZnN durante el almacenamiento en refrigeración a 5°C se muestra en la Figura 3.2. El grado de pardeamiento mostró poca fluctuación durante el período de 28 días, y se observó que el IP disminuyó significativamente para todas las muestras. Estas observaciones están de acuerdo con los estudios que informaron de cambios pequeños en el grado de pardeamiento de ZN clarificado almacenado 19 semanas a 4°C. El pardeamiento en bebidas cítricas implica un grupo complejo de reacciones que producen una variedad de pigmentos de características altamente inestables (Fustier y col., 2011).

Durante la evolución de los atributos sensoriales de los zumos refrigerados a 5°C, las muestras fueron rechazadas después de 15 y 28 días debido al mal olor (puntuación sensorial inferior a 5). La microflora natural alcanzó ~ 3 log ufc/mL en este periodo, lo que sugiere una posible relación entre el crecimiento microbiano y el deterioro sensorial. Basándose en la percepción del mal olor y en el cálculo de la evolución de la microflora en el ZnN se puede estimar una extensión de vida útil de 10 días para las muestras sonicadas durante 10 minutos. A los 10 días de almacenamiento a 5°C, se puede calcular que el control alcanzó una población de AM de 2,5 log ufc/mL mientras que las muestras tratadas 10 minutos con US alcanzaron una población de AM de solamente 1,6 log ufc/mL.



**Figura 3.4. Supervivencia de aerobios mesófilos totales (a) y de mohos y levaduras (b) durante el almacenamiento refrigerado (5°C) (■control; ■1 min; ■10 min; ■20 min; ■30 min)**

En conclusión, los resultados obtenidos indican claramente que los tratamientos de sonicación tienen un buen potencial para mejorar la calidad nutricional y microbiológica del ZnN. La sonicación mejoró los compuestos bioactivos (FT, FvT, CT y AA) con reducciones significativas en los recuentos microbianos. Por lo tanto, la mejora de FT y de FvT en ZnN sonicado será beneficioso para los consumidores y, por tanto, ventajoso para la posible explotación comercial de los zumos sonicados. Nuestros

resultados mostraron que el US por sí solo no tiene el poder para inactivar los microorganismos de forma fiable con fines de conservación de los alimentos. Sin embargo, el US podría ser utilizado en combinación con otros métodos de conservación tales como compuestos antimicrobianos, alta presión hidrostática, tratamiento térmico moderado o tratamiento térmico moderado combinado con presión estática moderada para permitir la inactivación microbiana y enzimática en alimentos líquidos.

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TERMOSONICACIÓN Y EL ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DE ZUMOS NATURALES DE NARANJA Y DE GRANADA UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.**

### **4.1. Justificación del estudio**

Los efectos protectores de las frutas y verduras y el valor nutricional de los zumos de frutas están principalmente relacionados con el contenido en fitonutrientes antioxidantes y otros compuestos bioactivos tales como el ácido ascórbico, los carotenoides y compuestos fenólicos (Tiwari y col., 2009a). La granada (*Punica granatum*) crece en Afganistán, China, India, Irán, Japón, países mediterráneos, Rusia y EE.UU.; se vende fresca o procesada en zumo y salsa. El contenido en fenoles totales en zumo de granada varía desde 1.808 a 2.566 mg/L (Gil y col., 2000). La granada es una fuente rica de taninos hidrolizables y antocianinas. El contenido total en antocianinas y taninos hidrolizables en zumo de granada varía de 161,9 a 387,4 mg/L y de 417,3 a 556,6 mg/g, respectivamente (Gil y col., 2000). La naranja (*Citrus sinensis*) es también una fruta saludable debido a su contenido en vitamina C y compuestos antioxidantes (Polydera y col., 2003, 2005).

Los tratamientos térmicos tradicionales empleados para asegurar la calidad microbiológica de los zumos de frutas tienen un efecto negativo sobre estos compuestos bioactivos. Por ello, se están desarrollando nuevas tecnologías con el objetivo de obtener zumos de frutas seguros microbiológicamente pero que al mismo tiempo conserven mejor durante toda su vida útil sus compuestos bioactivos y por consiguiente sus propiedades beneficiosas para la salud. Una de estas nuevas tecnologías es el US de potencia, que mediante mecanismos físicos y químicos tiene la capacidad de inactivar tanto los microorganismos como las enzimas responsables del deterioro de los zumos de fruta (Tiwari y Mason, 2012). Por tanto, conocer el efecto que el US tiene sobre estos compuestos bioactivos es de gran importancia. Se sabe que las propiedades de

cavitación y de alteración de las ondas de US se han utilizado para mejorar la extracción y la solubilidad de las antocianinas y otros polifenoles en diferentes medios (Galanakis, 2013). Pero es necesario caracterizar mejor los parámetros implicados en los tratamientos de termosonicación de los zumos de frutas para poder obtener un producto final seguro microbiológicamente y que conserve sus propiedades nutricionales así como sus compuestos bioactivos.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una estrategia que permite conocer el funcionamiento de un sistema o proceso y encontrar las condiciones óptimas de funcionamiento, permitiendo mejorar los resultados en cuanto a costo, tiempo, eficiencia, productividad y/o calidad. Uno de estos sistemas es el Diseño Box-Behnken que se caracteriza por tener tres factores con tres niveles (Bevilacqua y col., 2013; Gastélum y col., 2012; Tiwari y col., 2009c; Tiwari y col., 2010).

El objetivo específico de este estudio fue optimizar el tratamiento combinado de la termosonicación y el AEC sobre la calidad microbiológica y nutricional del ZnN y del ZnG empleando la MSR.

## **4.2. Diseño experimental y metodología**

### **4.2.1. Preparación del ZnN y del ZnG. Preparación de las muestras con AEC**

Las naranjas se recolectaron en un huerto local (Beniaján, Murcia, España). Las granadas fueron compradas en un supermercado local en Murcia (España). Los zumos se prepararon en condiciones asépticas siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.1 del capítulo 2 pero no se pasterizaron.

Las muestras de zumos con AEC se prepararon siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2.4 del capítulo 1.

#### 4.2.2. Diseño experimental. Modelo matemático simplificado

Se estudió el efecto de los tres parámetros independientes [amplitud ultrasónica ( $X_1$ , %), concentración AEC ( $X_2$ , mg/L), temperatura ( $X_3$ , °C)] sobre las variables dependientes empleando la MSR. Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

El diseño Box-Behnken empleado fue un diseño experimental de tres factores con tres niveles. Se utilizó el software Statistix 8.0 (Analytical Software, Tallase, FL, USA) para el diseño experimental, el análisis de datos y el modelo de regresión.

Los factores experimentales fueron:  $X_1$  (0-100%),  $X_2$  (0-320 mg/L) y  $X_3$  (50-60°C). El orden experimental fue aleatorizado.

**Tabla 4.1. Diseño aleatorizado de 15 ejecuciones.**

Factores	Pequeño	Grande	Unidades	Continuo
US	0	100	%	Sí
AEC	0	320	mg/L	Sí
Tª	50	60	°C	Sí

El software Statistix 8.0 creó un Diseño Box-Behnken para estudiar los efectos de 3 factores en 15 ejecuciones (Tabla 4.1). El diseño fue ejecutado en un solo bloque. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorio para evitar los efectos de variables ocultas. Los datos experimentales del diseño Box-Behnken fueron analizados y ajustados a una ecuación polinómica cuadrática (Ec. 4.1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

(Ec. 4.1)

donde Y es la variable respuesta,  $\beta_0$  es la constante;  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son las variables independientes;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  son los coeficientes lineales;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  y  $\beta_{23}$  son los coeficientes de productos cuadrados y  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  y  $\beta_{33}$  son los coeficientes cuadráticos. Se utilizó la regresión por pasos hacia atrás para desarrollar un modelo matemático simplificado capaz de predecir las variables dependientes. Para el desarrollo del modelo simplificado, el valor de  $p < 0,05$  fue utilizado como criterio de exclusión (Bevilacqua y col., 2013; Gastélum y col., 2012; Tiwari y col., 2009c; Tiwari y col., 2010).

### **4.2.3. Tratamientos de termosonicación con AEC. Efecto sobre la microflora natural del ZnN y del ZnG**

El efecto de los tratamientos térmicos y ultrasónicos se llevaron a cabo por separado y en combinación en un recipiente cilíndrico de doble pared en la que se hizo circular agua con un baño termostático (Digiterm 100, PSelecta®) para alcanzar y fijar las temperaturas 50, 55 y 60°C en cada caso (Gastélum y col., 2012). La temperatura del baño termostático se ajustó para cada tratamiento y la temperatura de las muestras fue controlada con un termómetro estéril. El US (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL; 10 minutos) se aplicó de forma continua con un procesador ultrasónico UP200H (Hielscher Ultrasound Technology) utilizando una sonda S3 (Hielscher). El efecto de los tratamientos de termosonicación también fue probado con 0, 160 y 320 mg/L de AEC. Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

Inmediatamente después de cada tratamiento, se realizaron los recuentos de AM y de ML utilizando el método de vertido en placa. Para los recuentos de AM se utilizó agar PCA y para ML el agar PCA+Cf. Se utilizaron dos placas para cada dilución decimal y se incubaron a 37°C/24h y a 25°C/48h respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **4.2.4. Determinación de los compuestos bioactivos y de la actividad antioxidante**

#### **4.2.4.1. Determinación del contenido en FT**

El contenido en FT se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3 del capítulo 3. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por 100 mL de zumo. Las muestras se analizaron por triplicado.

#### **4.2.4.2. Determinación del contenido en FvT**

El contenido de FvT se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3 del capítulo 3. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de catequina por 100 mL de zumo. Las muestras se analizaron por triplicado.

#### 4.2.4.3. Determinación del contenido en CT en ZnN

El contenido en CT en ZnN se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.3 del capítulo 3. Los resultados se expresaron como mg de carotenoides por 100 mL de zumo. Las muestras se analizaron por triplicado.

#### 4.2.4.4. Determinación del contenido en antocianinas monoméricas totales (AMT) en ZnG. Método del pH diferencial

El contenido de AMT se determinó utilizando el método del pH diferencial descrito por Giusti y Wrolstad (2005) y por Türkyılmaz y Özkan (2014). Previamente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. El pH de las muestras de zumo fue llevado a 1,0 y a 4,5 con tampones de cloruro de potasio y de acetato de sodio respectivamente. Las muestras se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente (~25°C). La absorbancia de las muestras se midió a 512 nm ( $k_{max}$ ) para el contenido de AMT y a 700 nm para la corrección de turbidez usando un espectrofotómetro UV-VIS (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation) con cubetas de 10 mm de longitud de trayecto. Todas las medidas de absorbancia se llevaron a cabo a temperatura ambiente frente a agua desionizada como blanco. La concentración del pigmento se expresa como mg de equivalentes de cianidina-3-O-glucósido [peso molecular: 449,2; coeficiente de extinción: 26.900 L/(cm mol)] por 100 mL de zumo. La diferencia entre los valores de absorbancia a pH 1,0 y a pH 4,5 es directamente proporcional a la concentración de AMT. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

#### 4.2.4.5. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.4 del capítulo 3. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición. Las muestras se analizaron por triplicado.

#### **4.2.5. Determinación del pH, de los °Brix y del color**

El pH y los °Brix se midieron siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.2 del capítulo 2. Todas medidas se realizaron por triplicado.



El color se determinó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.5 del capítulo 3. Las muestras se analizaron por triplicado.

#### **4.2.6. Estudio de estabilidad de los ZnN y ZnG conservados a 5°C**

Este estudio se basó en trabajos anteriores, pero con algunas modificaciones (Ferrario y col, 2015; Tiwari y col., 2009d; Valero y col, 2007). Réplicas de muestras control y tratadas por termosonicación de ZnN y ZnG con AEC envasadas asépticamente en recipientes con tapa de rosca de polipropileno de 50 mL se analizaron después de 30 días de almacenamiento a 5°C. Del zumo previamente agitado, se tomaron alícuotas y se determinaron los parámetros de color y FT para ambos zumos, AMT para el ZnG y CT para el ZnN.

### **4.3. Resultados y discusión**

#### **4.3.1. Parámetros de calidad de los zumos naturales sin tratar**

Las Tablas 4.2 y 4.3 muestran los parámetros de calidad de los ZNs sin tratar. Nuestros resultados son similares a los encontrados por otros autores, tanto para el ZnN (Nuncio-Jáuregui y col., 2015; Polydera y col., 2003, 2005; Varela-Santos y col., 2012) como para el ZnG (Gil y col., 2000; Hernández y col., 1999; Jaiswal y col., 2009; López-Rubira y col., 2005; Mousavinejad y col., 2009; Poyrazoglu y col., 2002).

**Tabla 4.2. Parámetros de calidad de los zumos naturales sin tratar.**

	ZnN	ZnG
pH	3,78±0,01	4,28±0,01
°Brix	15,00±0,09	15,72±0,04
Intensidad de color (IC)	3,43±0,27	3,41±1,12
Tono (Tn)	1,29±0,02	1,41±0,04
% Amarillo (%Am)	41,81±0,53	44,76±0,71
% Rojo (%Rj)	32,39±0,11	31,72±0,33
% Azul (%Az)	25,80±0,42	23,51±0,42
Act. Antx (%Inh)	45,29±13,03	34,31±8,27
FT (mg Eq ác gálico/100mL)	63,34±3,06	111,10±43,77
FvT (mg Eq catequina/100 mL)	4,87±0,10	16,72±7,90
CT (β-caroteno) (mg/100 mL)	0,73±0,12	–
AMT (mg cianidina-3-glucósido/100 mL)	–	5,65±1,73

La Tabla 4.3 muestra la calidad microbiológica de los ZNs sin tratar. El ZnG presentó una mayor población microbiana, lo cual podría atribuirse a las diferencias morfológicas de las frutas y a que se necesita una mayor manipulación de la granada para obtener el zumo.

**Tabla 4.3. Población microbiana de los zumos sin tratar.**

	AM	ML
ZnN	1,50±1,13	1,13±0,18
ZnG	3,35±0,33	2,97±0,27

Unidades: log ufc/mL

#### 4.3.2. Ajuste al modelo matemático simplificado

Las variables independientes US ( $X_1$ ), AEC ( $X_2$ ) y temperatura ( $X_3$ ) junto con sus variables respuestas para el diseño Box-Behnken se muestran en las Tablas 4.10 a 4.17. A partir de estos resultados experimentales y la Ecuación 4.1, se predijeron los coeficientes de regresión de las ecuaciones polinómicas cuadráticas simplificadas que se

muestran en las Tablas 4.4 a 4.8. Los valores predichos están estrechamente correlacionados con los datos experimentales, como reflejan los valores de los coeficientes de regresión ajustados ( $R^2_{aj}$ ) que están comprendidos entre 0,84 y 0,99, para los variables experimentales estudiadas en ambos zumos. El análisis de varianza muestra que las ecuaciones polinómicas de segundo grado obtenidas ajustan adecuadamente los datos experimentales de los parámetros de calidad de los zumos estudiados. El coeficiente de determinación múltiple ajustado ( $R^2_{aj}$ ) para la mayoría de los valores de respuesta fue  $\geq 0,92$ , excepto para las variables %Inh ( $R^2_{aj}=0,89$ ) en ambos zumos, pH ( $R^2_{aj}=0,88$ ) en ZnN, °Brix ( $R^2_{aj}=0,84$ ) en ZnG y el parámetro IC ( $R^2_{aj}=0,87$ ) en ZnN.

Respecto al estudio de vida útil, las variables respuesta que se ajustaron bien al modelo simplificado fueron los  $FT_{t30}$  del ZnN y del ZnG ( $R^2_{aj}=0,92$  y  $R^2_{aj}=0,87$ , respectivamente) y las AMT ( $R^2_{aj}=0,96$ ). Las variables respuesta que no se ajustaron bien al modelo ( $R^2_{aj} \leq 0,33$ ) fueron  $CT_{t30}$  en ZnN y los parámetros de color a  $t_{30}$  días para ambos zumos.

**Tabla 4.4. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los parámetros de color del zumo natural de granada.**

<b>Coefficientes</b>	<b>IC</b>	<b>Tn</b>	<b>%Am</b>	<b>%Az</b>	<b>%Rj</b>
$\beta_0$	-150,707****	9,32111****	215,436****	-92,2028****	-23,7299**
<b>Líneales</b>					
$\beta_1$	0,03409**	0,00242****	0,04802****	-0,03607****	ns
$\beta_2$	0,01288***	-0,00613****	-0,12665****	0,08271****	0,04386****
$\beta_3$	5,80875****	-0,28014****	-6,11508****	4,20914****	1,91304****
<b>Cuadráticos</b>					
$\beta_{11}$	-0,000105****	-0,000009556*	-0,0002147**	0,0001662**	0,00004746*
$\beta_{22}$	-0,00000944****	0,000003396****	0,00007074****	-0,00004461****	-0,00002592****
$\beta_{33}$	-0,05437****	0,00248****	0,05477****	-0,03821****	-0,01651****
<b>Productos cruzados</b>					
$\beta_{12}$	ns	ns	0,00004906*	-0,00004385**	ns
$\beta_{13}$	-0,0003867*	ns	ns	ns	-0,000231****
$\beta_{23}$	-0,0001635**	0,00008542****	0,00171****	-0,00111****	-0,0006083****
$R^2$	0,9814	0,9261	0,9434	0,9527	0,9191
$R^2_{aj}$	0,9773	0,9121	0,9308	0,9422	0,9038
<b>p</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

\*Significante a  $p \leq 0,05$ , \*\*Significante a  $p \leq 0,01$ , \*\*\*Significante a  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*Significante a  $p \leq 0,0001$ ; ns No significativo

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

**Tabla 4.5. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los parámetros de color del zumo natural de naranja.**

<b>Coefficientes</b>	<b>IC</b>	<b>Tn</b>	<b>%Am</b>	<b>%Az</b>	<b>%Rj</b>
$\beta_0$	18,6667****	3,4366****	84,4717****	-2,31593 <sup>ns</sup>	18,6603****
<b>Lineales</b>					
$\beta_1$	-0,01529****	0,00494****	0,11991****	-0,09397****	-0,01922****
$\beta_2$	ns	ns	ns	1,01865****	0,00251*
$\beta_3$	-0,54071***	-0,07904****	-1,55703****	ns	0,49328****
<b>Cuadráticos</b>					
$\beta_{11}$	0,0000931****	-0,00002877****	-0,0007409****	0,0006018****	0,0001448****
$\beta_{22}$	ns	ns	-0,000003261**	0,000002763*	ns
$\beta_{33}$	0,00484***	0,0007231****	0,01415****	-0,00918***	-0,00442****
<b>Productos cruzados</b>					
$\beta_{12}$	ns	ns	0,00001607*	-0,00001665**	ns
$\beta_{13}$	ns	ns	ns	ns	-0,0001267*
$\beta_{23}$	ns	ns	ns	ns	-0,00004271*
$R^2$	0,8811	0,9849	0,9899	0,9882	0,9901
$R^2_{aj}$	0,8692	0,9834	0,9883	0,9864	0,9883
<b>p</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

\*Significante a p<0,05, \*\*Significante a p<0,01, \*\*\*Significante a p<0,001, \*\*\*\*Significante a p<0,0001; ns No significativo

**Tabla 4.6. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los parámetros de calidad del zumo natural de naranja y del zumo natural de granada.**

<b>Coefficientes</b>	<b>ZnG</b>		<b>ZnN</b>	
	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>
$\beta_0$	25,1769****	6,34697*	3,72362****	46,0648****
<b>Lineales</b>				
$\beta_1$	0,02103***	ns	0,0003358*	0,00621****
$\beta_2$	-0,00158****	0,00973****	-0,00312****	0,00762***
$\beta_3$	-0,71214****	0,31449**		-1,23253****
<b>Cuadráticos</b>				
$\beta_{11}$	-0,00005022****	0,00002003****		-0,00002531*
$\beta_{22}$	0,000006131****	0,000005234****	-0,000001438****	
$\beta_{33}$	0,00604****	-0,00251**		0,01224****
<b>Productos cruzados</b>				
$\beta_{12}$	ns	ns	-0,000002552**	
$\beta_{13}$	-0,00028**	ns		
$\beta_{23}$	ns	-0,0001906****	0,00006514****	-0,0001218**
$R^2$	0,9208	0,8618	0,8896	0,958
$R^2_{aj}$	0,9058	0,8400	0,8755	0,9514
<b>p</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

\*Significante a p<0,05, \*\*Significante a p<0,01, \*\*\*Significante a p<0,001, \*\*\*\*Significante a p<0,0001; ns No significativo

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

**Tabla 4.7. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del zumo natural de naranja.**

Coeficientes	FT <sub>10</sub>	FT <sub>130</sub>	FvT	CT <sub>10</sub>	CT <sub>130</sub>	%Inh
$\beta_0$	1574,26****	1961,87****	-37,3896****	0,59854****		374,983****
<b>Lineales</b>						
$\beta_1$	-0,6789****	ns	0,15667****	ns		ns
$\beta_2$	ns	ns	0,02732****	0,00166****		0,03427****
$\beta_3$	-53,4569****	-68,0122****	0,77383****	ns		-12,6786****
<b>Cuadráticos</b>						
$\beta_{11}$	0,00321****	ns	-0,00161****	ns		-0,0008023****
$\beta_{22}$	0,0001823****	ns	-0,00007458****	-0,000003997****		-0,00004858**
$\beta_{33}$	0,47172****	0,60491****	ns	ns		0,11836****
<b>Productos cruzados</b>						
$\beta_{12}$	ns	ns	0,0002768****	ns		ns
$\beta_{13}$	0,00786**	ns	ns	-0,00005068****		0,00163****
$\beta_{23}$	-0,000363*	0,0003948****	ns	ns		ns
$R^2$	0,9604	0,9260	0,9526	0,9245	<0,3	0,9022
$R^2_{aj}$	0,9529	0,9205	0,9451	0,9190	<0,3	0,8868
<b>P</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05

\*Significante a p<0,05, \*\*Significante a p<0,01, \*\*\*Significante a p<0,001, \*\*\*\*Significante a p<0,0001; ns No significativo

**Tabla 4.8. Coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática simplificada para los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del zumo natural de granada.**

Coeficientes	FT <sub>10</sub>	FT <sub>130</sub>	FT	AMT <sub>10</sub>	AMT <sub>130</sub>	% Inh
$\beta_0$	299,094****	4961,89****	481,135****	-32,4638****	282,744****	3512,62****
<b>Lineales</b>						
$\beta_1$	ns	0,20449****	0,60814****	ns	ns	-0,35389****
$\beta_2$	-1,50633****	-1,21765****	-0,0348****	-0,07293****	-0,01743**	ns
$\beta_3$	ns	-174,457****	-16,0734****	1,73355****	-10,3218****	-127,132****
<b>Cuadráticos</b>						
$\beta_{11}$	-0,00356****	ns	ns	-0,0001007****	ns	0,00247***
$\beta_{22}$	0,0005731****	0,0008196****	0,00003784*	ns	ns	ns
$\beta_{33}$	-0,05754****	1,55739****	0,13841****	-0,0188****	0,0944****	1,15837****
<b>Productos cruzados</b>						
$\beta_{12}$	0,00177****	ns	0,0003182****	ns	ns	0,0004084***
$\beta_{13}$	ns	ns	-0,01102****	0,000157**	ns	ns
$\beta_{23}$	0,02105****	0,0158****	ns	0,00122****	0,000276****	ns
$R^2$	0,9691	0,8900	0,9489	0,9679	0,9618	0,9061
$R^2_{aj}$	0,9642	0,8727	0,9392	0,9629	0,958	0,8941
<b>CV</b>						
<b>P</b>	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

\*Significante a p<0,05, \*\*Significante a p<0,01, \*\*\*Significante a p<0,001, \*\*\*\*Significante a p<0,0001; ns No significativo

### **4.3.3. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre la microflora natural del ZnN y del ZnG**

La Tabla 4.3 muestra la población microbiana de los zumos sin tratar.

La Tabla 4.9 muestra el efecto de los tratamientos sobre la población microbiana de ambos zumos naturales.

Para el ZnN, los tratamientos que consiguieron el 100% de la inactivación microbiana fueron varios: 100%US+320mg/L+55°C; 50%US+160mg/L+55°C; 100%US+160 mg/L+50°C; 50%+320mg/L+60°C; 50%+160mg/L+55°C; 50%US+60°C; 160mg/L+60°C; 100%US+160mg/L+60°C. Por el contrario, el tratamiento menos efectivo para inactivar la población microbiana fue la combinación 160 mg/L+50°C que produjo una reducción del 10,70% para AM y del 6,19% para ML.

Para el ZnG, el tratamiento más eficaz para la inactivación microbiana fue la combinación 100%US+160mg/L+60°C que produjo una reducción del 82,40% para AM y del 91,92% para ML. Por el contrario, el tratamiento menos eficaz fue la combinación 100%US+160mg/L+50°C que produjo una reducción del 5,07% para AM y del 13,47% para ML.

**Tabla 4.9. Efecto de los tratamientos de termosonicación sobre la microflora natural del zumo natural de naranja y del zumo natural de granada.**

US (%)	AEC (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	ZnN		ZnG	
			AM	ML	AM	ML
100	320	55	0,00±0,00	0,00±0,00	1,89±0,02	1,42±0,17
50	160	55	0,00±0,00	0,00±0,00	2,13±0,03	1,94±0,05
50	160	55	0,00±0,00	0,00±0,00	2,13±0,03	1,94±0,05
100	160	50	0,00±0,00	0,00±0,00	3,18±0,01	2,57±0,03
0	0	55	0,90±0,08	0,72±0,17	1,92±0,30	1,80±0,28
0	320	55	0,39±0,12	0,00±0,00	1,80±0,06	1,57±0,04
50	0	50	0,95±0,07	0,00±0,00	2,63±0,01	2,70±0,01
100	0	55	0,74±0,06	0,00±0,00	2,13±0,42	1,69±0,30
50	320	60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,87±0,24	0,65±0,07
50	160	55	0,00±0,00	0,00±0,00	2,13±0,03	1,94±0,05
50	320	50	0,30±0,43	0,00±0,00	3,09±0,01	2,31±0,02
50	0	60	0,00±0,00	0,00±0,00	1,39±0,04	0,48±0,67
0	160	60	0,00±0,00	0,00±0,00	1,06±0,31	1,41±0,04
100	160	60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,59±0,83	0,24±0,34
0	160	50	1,34±0,37	1,06±0,08	3,12±0,02	2,66±0,00

Destacar que para ambos zumos, la población de ML fue más sensible a todos los tratamientos que la población de AM. Las bacterias Gram-positivas son más resistentes al tratamiento con US que las Gram-negativas, posiblemente a causa de su pared celular más gruesa, debido a la capa estructuralmente más fuerte de peptidoglicano presente en las células Gram-positivas, que les proporciona una mejor protección contra los efectos del US. En cuanto a la forma de los microorganismos, los cocos son más resistentes que los bacilos debido a la relación superficie celular/volumen (Chemat y col., 2011; Feng y col., 2008).

Respecto al efecto de los AEs, en general las bacterias Gram-positivas son más susceptibles a los AEs, aunque hay algunas excepciones. Los hongos son más susceptibles que las bacterias a algunos AEs, como por ejemplo al AE de canela, (Kalemba y Kunicka, 2003; López y col., 2005; Reyes-Jurado y col., 2015).

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores que estudiaron el efecto de la termosonicación y antimicrobianos naturales sobre la población microbiana de zumos y obtuvieron una mayor inactivación cuando

combinaron los tres factores y determinaron que mohos y levaduras eran más sensibles, y que las bacterias Gram-positivas eran más resistentes (Chemat y col., 2011; Feng y col., 2008; Kalemba y Kunicka, 2003; López y col., 2005).

#### **4.3.4. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante**

##### 4.3.4.1. Determinación del contenido en FT

El contenido en FT de las muestras sin tratar era de  $63,34 \pm 3,06$  y  $111,10 \pm 43,77$  mg Eq ácido gálico/100 mL para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.2).

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado, viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , siendo sus valores 0,95 y 0,96 para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.10), se considera un buen ajuste con una significación de  $p < 0,05$ . Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

La Figura 4.1 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre el contenido en FT de ambos zumos.



**Tabla 4.10. Efecto de la termosonicación y del aceite esencial de hoja se canela sobre el contenido en fenoles totales de los zumos naturales de granada y de naranja.**

US (%)	AEC (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	ZnG		ZnN	
			Val exper	Val pred	Val exper	Val pred
100	320	55	89,62±4,31	93,22	78,90±0,97	80,80
50	160	55	90,43±0,06	89,19	60,10±0,58	58,25
50	160	55	86,06±0,06	89,19	56,05±0,00	58,25
100	160	50	83,41±2,41	90,02	85,66±1,85	85,99
0	0	55	130,30±0,61	125,04	61,20±1,66	61,08
0	320	55	77,73±5,98	72,18	75,57±2,77	73,36
50	0	50	151,79±3,35	146,34	76,20±0,25	74,45
100	0	55	85,86±0,83	89,44	68,04±0,65	68,52
50	320	60	80,97±1,02	92,19	72,88±0,94	74,39
50	160	55	89,27±2,85	89,19	58,53±2,14	58,25
50	320	50	93,95±2,69	88,12	88,44±1,00	87,30
50	0	60	73,20±2,12	83,05	61,32±0,84	62,70
0	160	60	72,84±4,91	67,69	66,47±2,03	66,22
100	160	60	77,65±6,45	60,41	80,14±1,73	77,59
0	160	50	84,26±0,80	97,30	79,85±1,55	82,48
				0,9642*		0,9529*

FT (mg ác gálico/100ml)

\*Valor R<sup>2</sup><sub>aj</sub>

En el ZnG, el tratamiento 50%US+0 mg/L+50°C supuso un incremento del 36,62% en el contenido de FT, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+60°C implicó una disminución del 34,44% en el contenido de FT.

En el ZnN, el tratamiento 50%US+320 mg/L+50°C supuso un incremento del 39,63% en el contenido de FT, mientras que el tratamiento 50%US+160mg/L+55°C implicó una disminución del 11,51% en el contenido de FT.

Rawson y col. (2011) encontraron una disminución significativa en el contenido fenólico total cuando se aumentó la temperatura del procesamiento y se usaron tiempos de tratamientos largos. Sin embargo, la amplitud no tuvo un efecto significativo en el contenido de FT. Este hecho se puede atribuir a las reacciones de oxidación, promovidos por la interacción de los radicales libres formados durante la sonicación (Tiwari y col., 2009d). Rawson y col. (2011) observaron también una mayor retención

de los compuestos fenólicos cuando llevaron a cabo tratamientos de ultrasonidos más suaves (20 kHz, 24,1  $\mu\text{m}$ , 25°C, 2 min). En contraste, observaron una disminución significativa en compuestos fenólicos (58%) cuando se utilizó el US a 20 kHz, 61 $\mu\text{m}$ , 45°C, 10 min. Este hecho podría explicarse por la cantidad de radicales hidroxilo generados durante la cavitación acústica, que depende de la frecuencia, y afecta negativamente al contenido en fenoles, y algunos autores han observado una disminución en su concentración que se ha relacionado con el aumento en la concentración de fenoles hidroxilados (Ashokkumar y col., 2008; Awad y col., 2012; Riesz y Kondo, 1992).

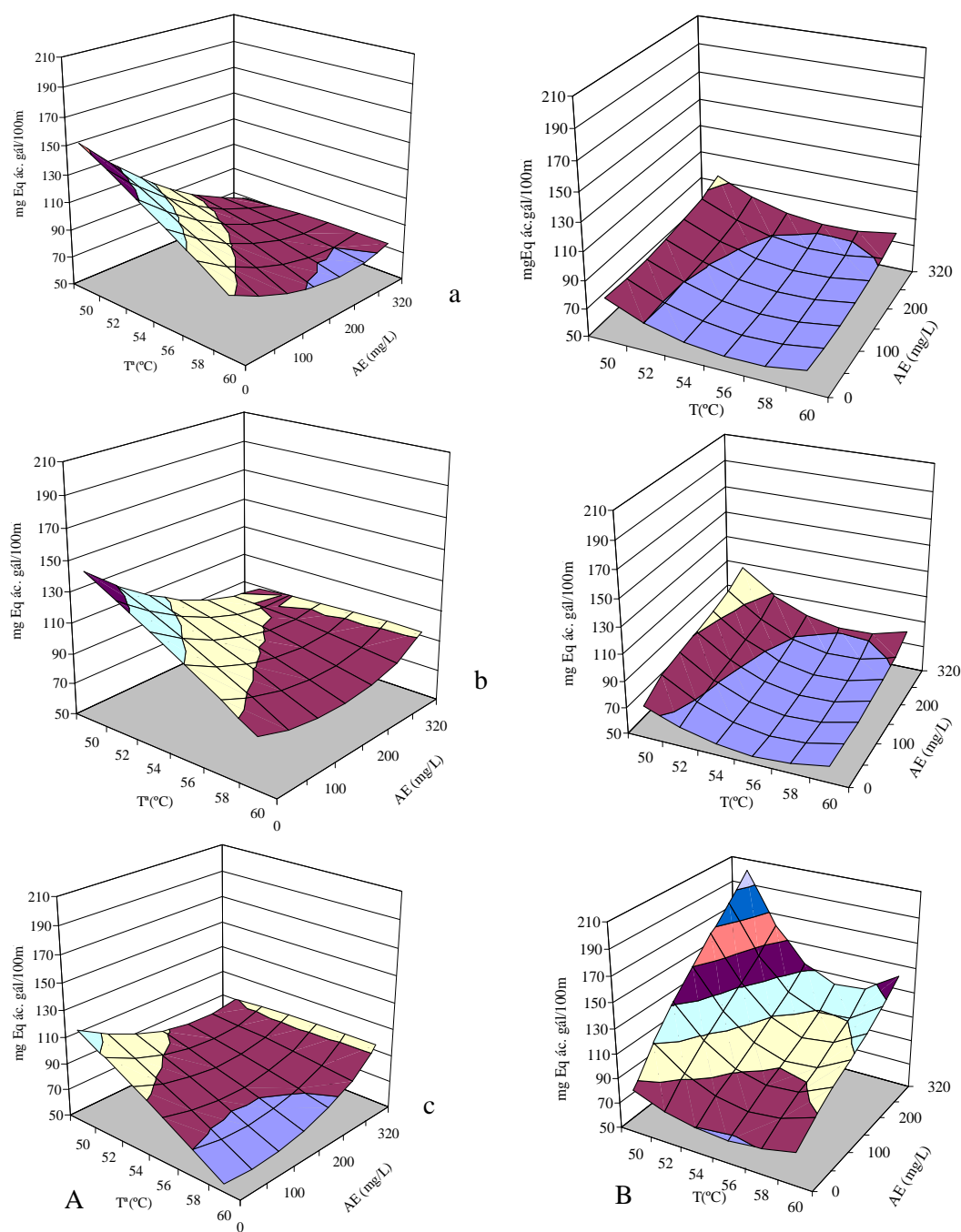
Keenan y col. (2012) estudiaron el efecto del US (20 kHz, 24,4 a 61,0  $\mu\text{m}$ , 3-10 min) en el contenido de FT de batidos de frutas, y observaron que las reducciones más altas se producían al nivel de amplitud máxima

Zafra-Rojas y col. (2013) evaluaron los efectos del US (20 kHz, 40 a 80%, 3-25 min) sobre los compuestos fenólicos de zumo de “cactus pera” y obtuvieron que el US a una amplitud de 80% aplicado durante 5 y 8 min causaba una liberación significativa del contenido de FT, posiblemente debido a la ruptura de las paredes celulares por efecto del US, facilitando, a continuación, la liberación del contenido celular.

Abid y col. (2014a) y Abid y col. (2013) obtuvieron un aumento significativo en el contenido en ácido clorogénico (40%), ácido cafeico (19%), catequina (20%), epicatequina (145%) y floridzina (76%) de ZM tratado por US en comparación con muestras sin tratar.

Santhirasegaram y col. (2013) encontraron un aumento significativo en los compuestos fenólicos totales (30-35%) en zumo de mango tratado con US (40 kHz, 130 W, 15 y 30 min, 25°C) en comparación con las muestras control.

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonificación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta



**Figura 4.1.** Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en fenoles totales. **A:** zumo granada. **B:** zumo naranja. **a:** 0% amplitud; **b:** 50% amplitud; **c:** 100% amplitud. mg Eq. ácido gálico/100 mL. ■ 50-70; ■ 70-90; ■ 90-110; ■ 110-130; ■ 130-150; ■ 150-170; ■ 170-190; ■ 190-210.

#### 4.3.4.2. Determinación del contenido en FvT

El contenido en FvT de las muestras sin tratar es de  $4,87 \pm 0,10$  y  $16,72 \pm 7,90$  mg Eq cat/100 mL para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.2).

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , siendo sus valores 0,95 y 0,94 para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.11), se considera un buen ajuste con una significación  $p < 0,05$ . Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

La Figura 4.2 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre el contenido en FvT de ambos zumos.

**Tabla 4.11. Efecto de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en flavonoides totales de los zumos naturales de granada y de naranja.**

US (%)	AEC (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	ZnG		ZnN	
			Val exper	Val pred	Val exper	Val pred
100	320	55	14,64±1,64	18,91	16,28±0,21	14,70
50	160	55	14,41±0,06	13,84	14,58±0,00	13,66
50	160	55	13,58±0,06	13,84	12,86±0,00	13,66
100	160	50	30,37±1,57	29,70	7,01±0,05	7,76
0	0	55	18,74±3,44	15,79	3,65±0,10	5,17
0	320	55	7,86±0,08	8,53	6,01±0,31	6,28
50	0	50	25,03±0,51	26,35	5,63±0,04	5,11
100	0	55	17,18±2,36	15,99	5,06±0,08	4,74
50	320	60	12,76±0,25	10,18	18,60±0,11	18,38
50	160	55	14,30±0,72	13,84	13,67±0,86	13,66
50	320	50	26,82±1,49	24,18	9,09±0,05	10,64
50	0	60	10,43±0,15	12,35	13,48±0,16	12,85
0	160	60	9,15±0,05	10,41	11,71±0,25	11,50
100	160	60	10,96±0,16	10,19	14,25±0,40	15,50
0	160	50	17,74±0,21	18,89	5,35±0,03	3,76
				0,9392*	0,9451*	

FvT (mg Eq catequina/100 mL)

\*Valor  $R^2_{aj}$

En el ZnG, el tratamiento 100%US+160mg/L+50°C supuso un incremento del 81,64% en el contenido de FvT, mientras que el tratamiento 0%US+320mg/L+55°C implicó una disminución del 52,99% en el contenido de FvT.

#### Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

---

En el ZnN, el tratamiento 50%US+320mg/L+60°C supuso un incremento del 281,93% en el contenido de FvT, mientras que el tratamiento 0%US+0mg/L+55°C disminuyó un 25,05% el contenido de FvT.

Aadil y col. (2013) encontraron que el contenido en FT, flavonoides y flavonoles de zumo de pomelo mejoraron después del tratamiento con US (28 kHz, 20°C, 30-90 min).

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

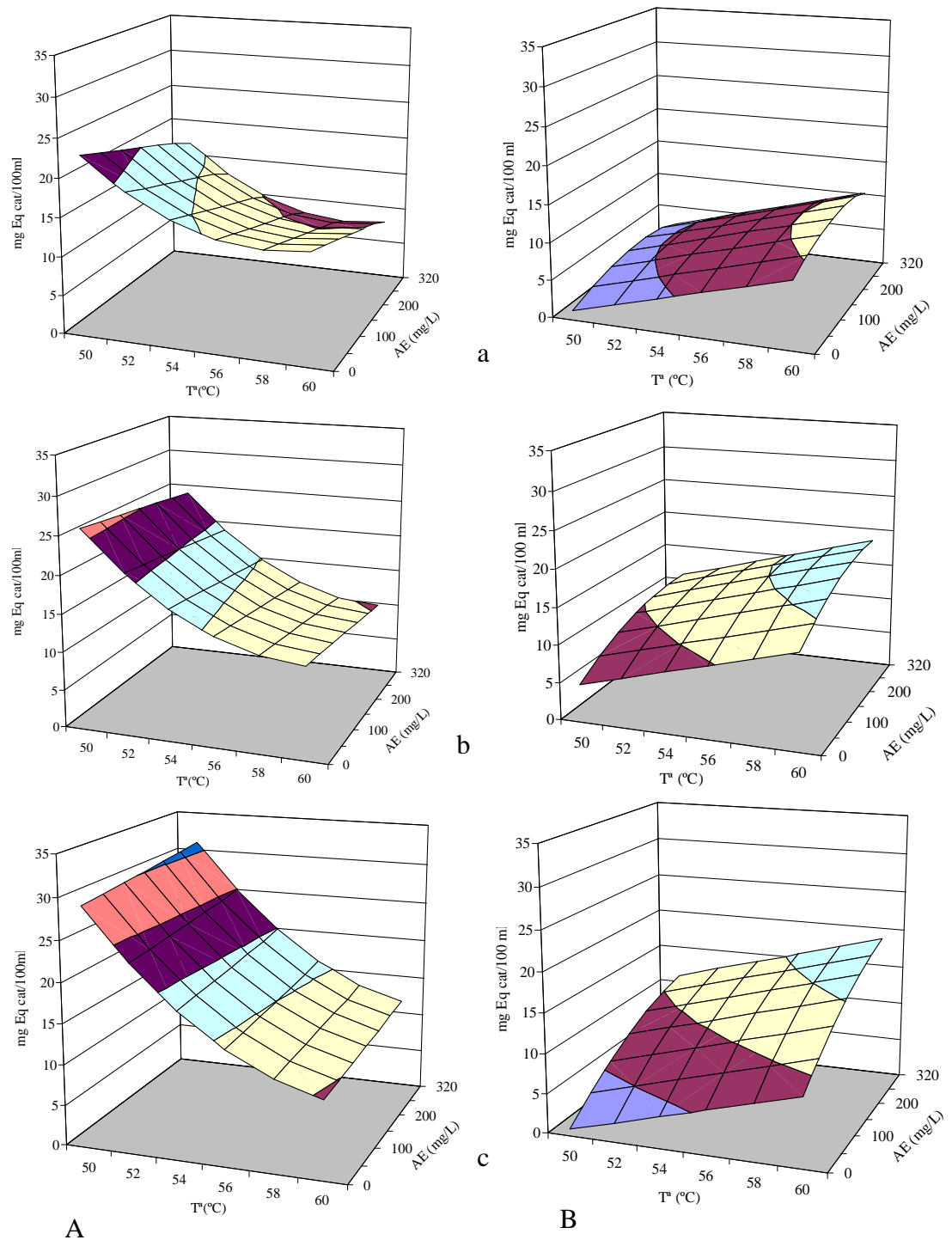


Figura 4.2. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en flavonoides totales. A: zumo granada. B: zumo naranja. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg Eq catq/100 mL. ■ 0-5; ■ 5-10; ■ 10-15; ■ 15-20; ■ 20-25; ■ 25-30; ■ 30-35.

#### 4.3.4.3. Determinación del contenido en CT en ZnN

El contenido en CT del zumo sin tratar es de  $0,73 \pm 0,12$  mg/100 mL (Tabla 4.2). El contenido en CT sólo se determinó en el ZnN pues estos compuestos bioactivos son mayoritarios en el ZnN, y es uno de los parámetros de calidad de este zumo; mientras que en el ZnG se encuentra en cantidades significativamente menores.

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , siendo su valor 0,92 para el ZnN (Tabla 4.12), se considera un buen ajuste con una significación  $p < 0,05$ . Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

La Figura 4.3 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre el contenido en CT del ZnN.

**Tabla 4.12. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre el contenido en carotenoides totales del zumo natural de naranja.**

US (%)	AEC (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	Val exp	Val pred
100	320	55	0,45±0,03	0,44
50	160	55	0,62±0,00	0,62
50	160	55	0,61±0,01	0,62
100	160	50	0,51±0,02	0,51
0	0	55	0,59±0,03	0,60
0	320	55	0,73±0,04	0,72
50	0	50	0,48±0,06	0,47
100	0	55	0,32±0,09	0,32
50	320	60	0,56±0,04	0,57
50	160	55	0,63±0,01	0,62
50	320	50	0,58±0,05	0,59
50	0	60	0,45±0,05	0,45
0	160	60	0,77±0,06	0,76
100	160	60	0,46±0,02	0,46
0	160	50	0,76±0,01	0,76
				0,9190*

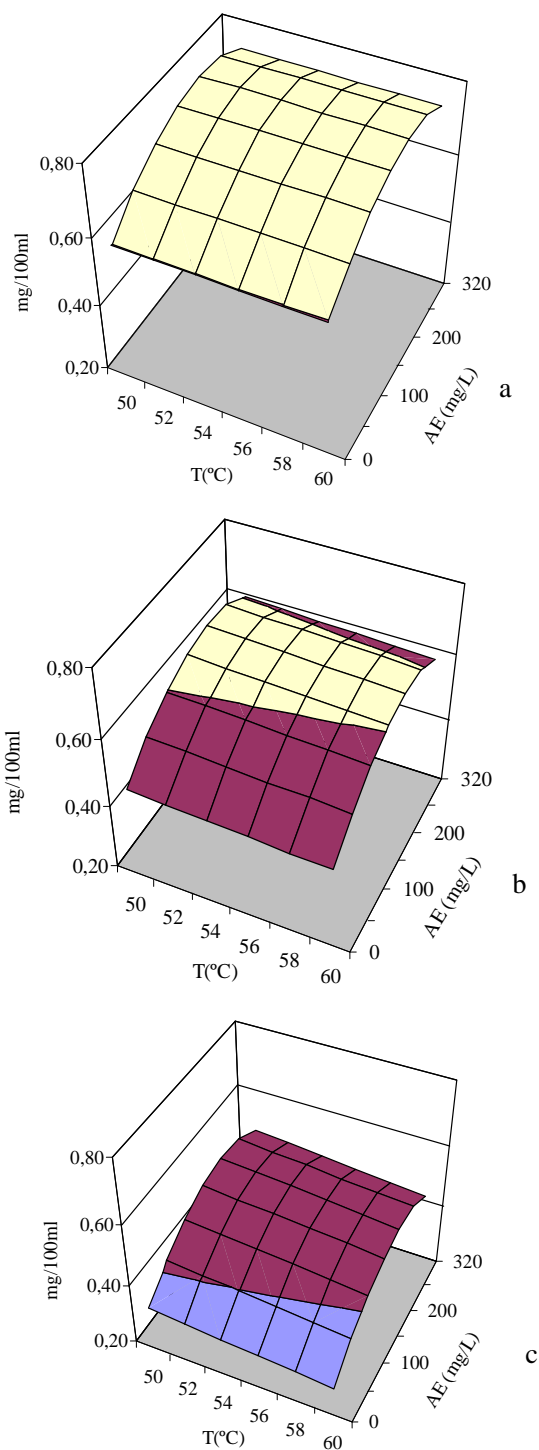
CT ( $\beta$ -caroteno) (mg/100 mL)

\*Valor  $R^2_{aj}$

En el ZnN, el tratamiento 0%US+160mg/L+60°C supuso un incremento del 5,48% en el contenido de CT, mientras que el tratamiento 100%US+0mg/L+55°C disminuyó el contenido de CT un 56,16%.

Varios autores han estudiado el efecto del procesamiento con US sobre la estabilidad de los carotenoides. Rawson y col. (2011) estudiaron el impacto de los tratamientos con US (20 kHz, 24,4 a 61  $\mu\text{m}$ , 25-45°C, 0-10 min) sobre el licopeno. Encontraron una disminución significativa en el contenido de licopeno de las muestras procesadas cuando se aumentaron la amplitud, el tiempo de procesamiento y la temperatura, siendo máxima la degradación del licopeno (54%) cuando se utilizaron las condiciones de tratamiento más altas. Sin embargo, se encontró un ligero aumento en el contenido de licopeno cuando se utilizan las amplitudes más bajas. Por el contrario, Abid y col. (2014a) y Abid y col. (2013) encontraron un aumento significativo de 12-27% en el contenido total de carotenoides de ZM, cuando se aplican tratamientos de US (25 kHz, 70%, 20°C, 0 a 60 min). Ellos atribuyeron este aumento a la ruptura mecánica de las paredes celulares, facilitando así la extracción de carotenoides. Del mismo modo, Santhirasegaram y col. (2013) también encontraron un aumento significativo de los carotenoides (4-9%) en zumo de mango tratado por US (15 y 30 min).





**Figura 4.3. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en carotenoides totales en zumo natural de naranja. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg/100 mL. ■ 0,2-0,4; ■ 0,4-0,6; ■ 0,6-0,8.**

#### 4.3.4.4. Determinación del contenido en AMT en ZnG.

El contenido en AMT de las muestras de ZnG sin tratar es de  $5,65 \pm 1,73$  mg cianidina-3-glucósido/100 mL (Tabla 4.2). El contenido en AMT sólo se determinó en el ZnG pues estos compuestos bioactivos son mayoritarios en el ZnG, y es uno de los parámetros de calidad de este zumo; mientras que en el ZnN se encuentra en cantidades significativamente menores.

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , cuyo valor es 0,96 para el zumo de granada (Tabla 4.13), se considera un buen ajuste con una significación  $p < 0,05$ . Todos los tratamientos duraron 10 minutos. La Figura 4.4 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre el contenido en AMT del ZnG.

**Tabla 4.13. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre el contenido en antocianinas monoméricas totales del zumo natural de granada.**

US (%)	AEC (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	Val exp	Val pred
100	320	55	4,09±0,24	4,00
50	160	55	5,33±0,01	5,26
50	160	55	5,19±0,00	5,26
100	160	50	4,81±0,22	5,08
0	0	55	5,86±0,22	6,01
0	320	55	4,18±0,14	4,15
50	0	50	7,43±0,34	7,35
100	0	55	6,09±0,05	5,87
50	320	60	4,16±0,01	4,17
50	160	55	5,28±0,08	5,26
50	320	50	3,69±0,27	3,54
50	0	60	4,00±0,04	4,09
0	160	60	4,05±0,10	3,91
100	160	60	3,94±0,07	3,85
0	160	50	5,45±0,03	5,30
				0,9629*

mg cianidina-3-glucósido/100 mL

\*Valor  $R^2_{aj}$

En el ZnG, el tratamiento 50%US+0mg/L+50°C supone un incremento del 31,50% en el contenido de AMT, mientras que el tratamiento 50%US+320mg/L+50°C implicó una disminución del 34,69% en el contenido de AMT.

Abid y col., (2014a) y Abid y col., (2013) no encontraron modificaciones significativas en el contenido de antocianinas totales.

En un estudio hecho sobre el efecto del US en zumo de mora, Tiwari y col. (2009b) obtuvieron una ligera degradación (6%) en el contenido total de antocianinas cuando utilizaron las condiciones más severas (100% de amplitud, 10 min), lo que muestra la alta estabilidad de las antocianinas de moras al tratamiento de sonicación.

Patras y col. (2010) obtuvieron diferencias significativas en el contenido de antocianina de zumo de uva después del tratamiento con US, con una retención de 97,5%, 48,2% y 80,9% para cianidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-glucósido y delphinidina-3-O-glucósido. En el mismo estudio, se observó un ligero aumento de cianidina-3-O-glucósido cuando se aplicaron las amplitudes más bajas y el tiempo de tratamiento más corto y esto se atribuyó a la extracción de antocianinas unidas de las matrices. En otro estudio, se obtuvo un ligero aumento (1-2%) en el contenido de antocianinas totales en zumo de fresa tratado con US (20 kHz, 40-100%, 5-39,9°C, 0-10 min). Especialmente importante fue el aumento de pelargonidina-3-glucósido cuando se utilizaron las amplitudes más bajas y los tiempos de tratamiento más cortos (20 kHz, 40% de amplitud, 2 min, 30,6°C) (Tiwari y col., 2008d). Sin embargo, estos autores encontraron una disminución máxima de 3,2% en el contenido de antocianinas totales cuando aplicaron la mayor amplitud y el tiempo de tratamiento más largo (20 kHz, 100% de la amplitud, 10 min, 39,9°C) (Tiwari y col., 2008d).

Cuando el US se aplica a los sistemas de líquidos, varios mecanismos pueden actuar simultáneamente como son las tensiones mecánicas, las microcorrientes y la implosión de ondas de choque, así como los efectos térmicos producidos por la implosión de burbujas y la producción de radicales libres (Valdramidis y col., 2010). En consecuencia, la vía de degradación del ácido ascórbico y de las antocianinas podría ser debida a fenómenos de termólisis y de combustión que tienen lugar dentro de la burbuja de cavitación o a la reacción con radicales hidroxilo que se forman durante la sonicación. La mayor degradación relativa observada de ácido ascórbico en

comparación con la antocianina se puede atribuir a las diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los dos compuestos (Tiwari y col., 2008d). Según Petrier y col. (2007), cuando se aplica sonicación a compuestos con diferentes propiedades físico-químicas, los más volátiles se degradan primero. Sin embargo, a pesar del hecho de que la formación de radicales es una desventaja para la conservación de los componentes sensibles, tales como fenoles, se puede mejorar la actividad antioxidante de otros compuestos como los flavonoides mediante el aumento de la extensión de la hidroxilación (Ashokkumar y col., 2008).

La mayor degradación de antocianinas en muestras tratadas con US se debe a la formación, el crecimiento y rápido colapso de burbujas microscópicas. Las cavidades formadas por sonicación, se pueden llenar con vapor de agua y gases disueltos en el zumo, tales como O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, que pueden ser responsables de la degradación oxidativa de las antocianinas, así como los radicales libres que se forman durante la sonicación. Cuando la amplitud del US es mayor, mayor cantidad de energía y de intensidad se introduce en el sistema sonificado (zumo), provocando un colapso de las burbujas de cavitación. Entonces, el vapor y los gases de las cavidades se disipan en los sistemas, causando varias reacciones químicas. Además, la degradación de antocianinas durante el procesamiento de US podría estar relacionado con las reacciones de oxidación, promovido por la interacción de radicales libres, tales como hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), formados durante la sonicación después de la reacción ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{H}^{\cdot}$ ), lo que conduce a la descomposición química por la apertura de anillos y la formación de chalcona (Dubrović y col., 2011; Tiwari y col., 2009b).

En concreto, la degradación de P3G (Pelargonidina-3-glucósido) y de AA (ác. ascórbico) durante el tratamiento con US puede ser consecuencia de las condiciones físicas extremas que se producen dentro de las burbujas de cavitación durante su colapso y varias reacciones sonoquímicas que ocurren simultáneamente o de forma aislada (Dubrović y col., 2011; Tiwari y col., 2009b). Se sabe que la sonicación causa una reducción del oxígeno disuelto presente en los zumos, el cual es un parámetro crítico que influye en la estabilidad del AA y del P3G. El AA es sensible al calor y su mecanismo de reacción de descomposición en los alimentos se ha estudiado ampliamente. El AA se degrada aeróbicamente y anaeróbicamente durante el

#### Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

almacenamiento, dependiendo de las condiciones de almacenamiento, el envasado y el método de procesamiento empleado. La menor degradación de la P3G durante el almacenamiento podría estar asociada con el efecto protector del AA (Tiwari y col., 2009d).

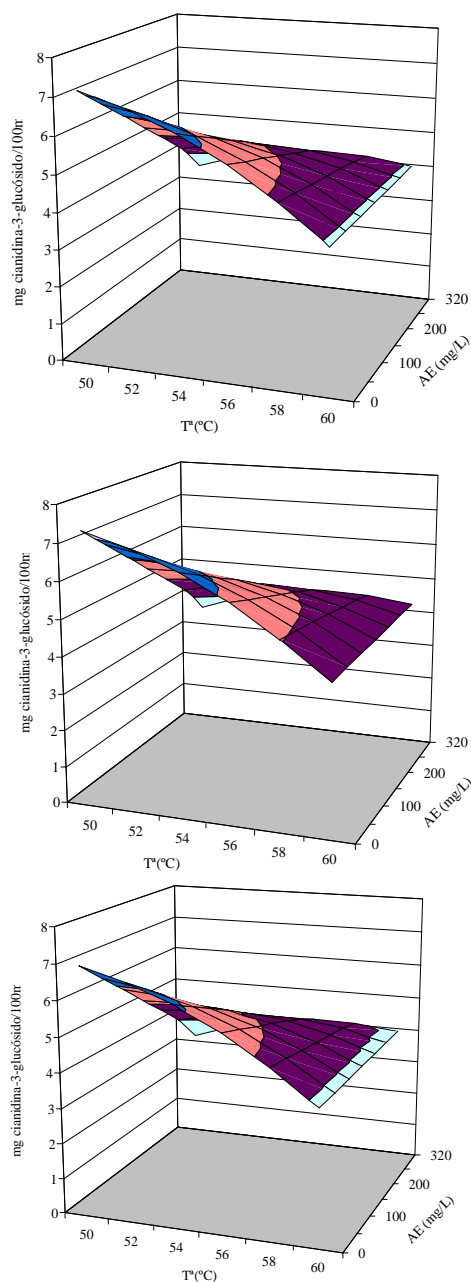


Figura 4.4. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en antocianinas monoméricas totales del zumo natural de granada. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg cianidina-3-glucósido/100 mL. ■ 0-1; ■ 1-2; ■ 2-3; ■ 3-4; ■ 4-5; ■ 5-6; ■ 6-7; ■ 7-8.

#### 4.3.4.5. Determinación de la actividad antioxidante

Los valores de porcentaje de inhibición (%Inh) del radical DPPH de las muestras sin tratar son  $45,29 \pm 13,03$  y  $34,31 \pm 8,27$  para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.2).

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , siendo los valores de 0,89 y 0,89 para ambos zumos (Tabla 4.14), se considera un buen ajuste con una significancia  $p < 0,05$ . Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

La Figura 4.5 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre la actividad antioxidante de ambos zumos.

**Tabla 4.14. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre la actividad antioxidante de los zumos naturales de granada y de naranja.**

US (%)	AEC (mg/L)	Tª(°C)	ZnG		ZnN	
			Val exp	Val pred	Val exp	Val pred
100	320	55	23,66±5,10	26,81	44,21±1,89	42,63
50	160	55	16,11±0,47	16,18	42,38±1,05	42,42
50	160	55	15,95±0,32	16,18	42,41±1,05	42,42
100	160	50	49,91±1,01	47,79	40,08±0,16	41,32
0	0	55	29,18±7,53	24,43	35,12±0,40	35,70
0	320	55	21,22±6,46	24,43	40,74±0,50	41,69
50	0	50	31,58±3,64	40,43	40,08±0,58	39,02
100	0	55	15,94±0,47	13,74	36,60±1,05	36,64
50	320	60	51,54±1,23	49,85	49,06±1,12	49,24
50	160	55	16,08±0,43	16,18	42,38±1,05	42,42
50	320	50	50,89±5,35	46,96	44,51±0,20	45,01
50	0	60	47,10±4,38	43,31	42,75±1,75	43,25
0	160	60	50,45±5,35	54,83	45,55±0,33	44,60
100	160	60	49,69±1,30	50,68	46,02±0,11	46,36
0	160	50	54,85±3,62	51,94	41,82±0,19	41,19
				0,8941*	0,8868*	

% Inhibición (%Inh)

\*Valor  $R^2_{aj}$

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

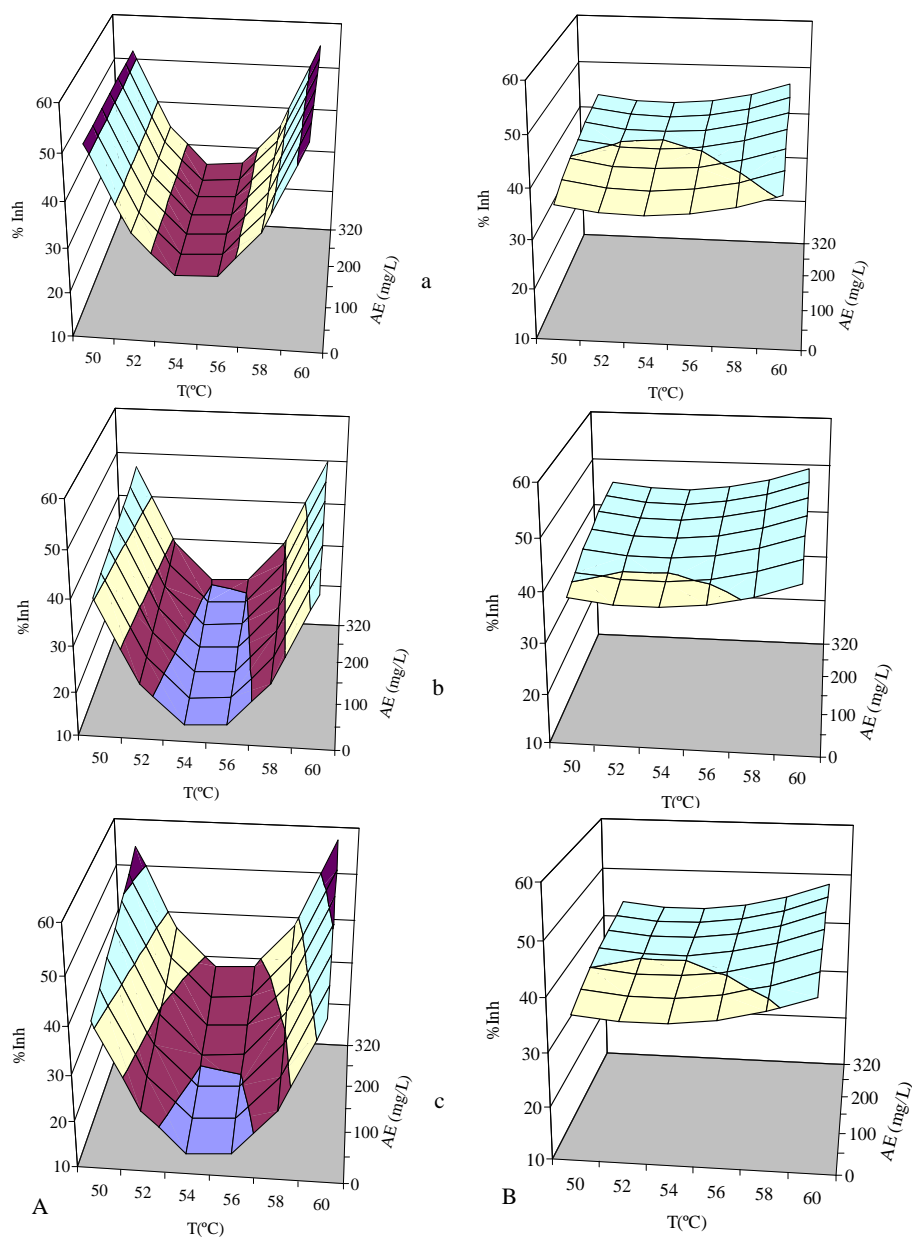
---

En el ZnG, el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C supuso un incremento del 59,87% del %Inh, mientras que el tratamiento 100%US+0mg/L+55°C implicó una disminución del 53,51% del %Inh.

En el ZnN, el tratamiento 50%US+320mg/L+60°C supuso un incremento del 8,32% del %Inh, mientras que el tratamiento 0%US+0mg/L+55°C implicó una disminución del 22,46% del %Inh.

En un estudio realizado sobre el efecto del US (20 kHz, 24,4-61,0  $\mu$ m, 3-10 min) sobre la capacidad antioxidante total de batidos de frutas, se observó que las reducciones más altas de la actividad antioxidante se producían a amplitudes máximas (Keenan y col., 2012).





**Figura 4.5. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja se canela sobre el la actividad antioxidantes. A: zumo natural de granada B: zumo natural de naranja. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. % Inhibición. ■ 10-20; ■ 20-30; ■ 30-40; ■ 40-50; ■ 50-60.**

#### 4.3.5. Efecto de los tratamientos de termosonicación con AEC sobre el color, el pH y los °Brix

Los valores de pH de las muestras sin tratar fueron  $3,78\pm 0,01$  y  $4,28\pm 0,01$  para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.2).

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , cuyos valores fueron 0,88 y 0,96 para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.15), se considera un buen ajuste con una significación  $p < 0,05$ . Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

Tabla 4.15. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre el pH de los zumos naturales de granada y de naranja.

US (%)	AEC (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	ZnG		ZnN	
			Val exp	Val pred	Val exp	Val pred
100	320	55	4,42±0,00	4,46	3,66±0,01	3,68
50	160	55	4,35±0,00	4,34	3,74±0,00	3,76
50	160	55	4,36±0,00	4,34	3,75±0,00	3,76
100	160	50	4,73±0,00	4,77	3,71±0,00	3,70
0	0	55	4,37±0,01	4,28	3,72±0,01	3,72
0	320	55	4,41±0,00	4,40	3,71±0,00	3,72
50	0	50	4,98±0,01	4,90	3,76±0,01	3,74
100	0	55	4,34±0,00	4,34	3,75±0,02	3,76
50	320	60	4,38±0,01	4,40	3,81±0,01	3,80
50	160	55	4,35±0,01	4,34	3,74±0,01	3,76
50	320	50	5,13±0,01	5,02	3,62±0,02	3,60
50	0	60	4,15±0,00	4,28	3,74±0,02	3,74
0	160	60	4,17±0,02	4,10	3,84±0,00	3,81
100	160	60	4,16±0,01	4,02	3,82±0,01	3,81
0	160	50	4,45±0,01	4,57	3,70±0,01	3,71
				0,9642*	0,8755*	

\*Valor  $R^2_{aj}$

En el ZnG, el tratamiento 50%US+320mg/L+50°C supuso un incremento de 0,85 unidades en el pH (19,86%), mientras que el tratamiento 50%US+0mg/L+60°C implicó una disminución de 0,13 unidades en el pH (3,04%).

En el ZnN, el tratamiento 0%US+160mg/L+60°C supuso un incremento de 0,06 unidades en el pH (1,59%), mientras que el tratamiento 50%US+320mg/L+50°C implicó una disminución de 0,16 unidades en el pH (4,23%).

Los °Brix de las muestras sin tratar fueron 15,00±0,09 y 15,72±0,04 para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.2).

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado, que viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , cuyos valores fueron 0,95 y 0,84 para el ZnN y el ZnG respectivamente (Tabla 4.16), siendo mejor el ajuste para el zumo de naranja ( $p<0,01$ ) que para el de granada ( $p<0,05$ ). Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

**Tabla 4.16. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre los °Brix de los zumos naturales de granada y de naranja.**

US (%)	AEC (mg/L)	Tª(°C)	ZnG		ZnN	
			Val exp	Val pred	Val exp	Val pred
100	320	55	16,60±0,00	16,55	15,95±0,01	15,96
50	160	55	16,15±0,00	16,11	15,80±0,00	15,70
50	160	55	16,05±0,00	16,11	15,55±0,00	15,70
100	160	50	16,05±0,00	16,16	15,65±0,05	15,65
0	0	55	16,08±0,06	16,05	15,20±0,05	15,30
0	320	55	16,40±0,00	16,35	15,70±0,01	15,60
50	0	50	16,05±0,00	15,85	15,35±0,05	15,29
100	0	55	16,18±0,12	16,25	15,60±0,05	15,67
50	320	60	16,00±0,00	16,22	16,42±0,06	16,52
50	160	55	16,12±0,06	16,11	15,72±0,14	15,70
50	320	50	16,58±0,06	16,45	15,70±0,01	15,78
50	0	60	16,10±0,00	16,23	16,46±0,10	16,42
0	160	60	16,30±0,00	16,04	16,20±0,05	16,23
100	160	60	16,43±0,06	16,24	16,62±0,06	16,59
0	160	50	15,82±0,06	15,96	15,25±0,05	15,28
				0,8400*	0,9514*	

\*Valor  $R^2_{aj}$

En el ZnG, el tratamiento 100%US+320mg/L+55°C supuso un incremento del 5,60% en los °Brix, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C implicó también un incremento del 0,64% en los °Brix.

En el ZnN, el tratamiento 100%US+160mg/L+60°C supuso un incremento del 10,80% en los °Brix, mientras que el tratamiento 0%US+0mg/L+55°C supuso también un incremento del 1,33% en los °Brix.

Tiwari y col. (2008b) encontraron que el procesamiento ultrasónico no tenía un efecto significativo en el pH, o los °Brix, con independencia de la intensidad de US o el tiempo de tratamiento ( $p < 0,05$ ). Estos resultados están de acuerdo con los de Kim y col. (2001) para el zumo de naranja y con los de Ugarte y col. (2006) para la sidra de manzana procesada con US de potencia. Sin embargo, en los resultados obtenidos en el presente estudio sí se observa un efecto de los factores y de su combinación sobre ambos parámetros. Podría ser debido a la presencia del AEC y a que se trabajó con temperaturas superiores a las usadas por estos autores ( $< 40^{\circ}\text{C}$ ).

Los valores de los parámetros de color de las muestras sin tratar para el ZnN están en la Tabla 4.2.

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado, que viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , es bueno con una significación  $p < 0,05$  (Tabla 4.17). Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

En el ZnN, el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C supuso un incremento del 11,66% de la IC, mientras que el tratamiento 100%US+320mg/L+55°C supuso una disminución del 14,29% de la IC.

El tratamiento 100%US+160mg/L+60°C supuso un incremento del 17,05% del tono, mientras que el tratamiento 0%US+320mg/L+55°C supuso una disminución del 1,55% del tono.

El tratamiento 100%US+160mg/L+60°C supuso un incremento del 12,32% del %Am, mientras que el tratamiento 0%US+320mg/L+55°C supuso una disminución del 1,36% del %Am.

El tratamiento 0%US+320mg/L+55°C supuso un incremento del 0,37% del %Rj, mientras que el tratamiento 100%US+160mg/L+60°C supuso una disminución del 3,95% del %Rj.

El tratamiento 0%US+320mg/L+55°C supuso un incremento del 1,82% del %Az, mientras que el tratamiento 100%US+160mg/L+60°C supuso una disminución del 14,73% del %Az.

Los cambios de color que se observan pueden ser causados por la cavitación, que regula diversas reacciones físicas, químicas, o biológicas, tales como la aceleración de reacciones químicas, el aumento de las velocidades de difusión, la dispersión de agregados, o el desglose de partículas tales como enzimas y microorganismos (Tiwari y col., 2008b).

El color del ZN se debe principalmente a los pigmentos carotenoides, cuyo contenido depende del grado de maduración del fruto, los tratamientos de elaboración, las condiciones de almacenamiento y las reacciones de pardeamiento. La degradación del color puede ser debida a las condiciones físicas extremas que se producen durante la sonicación (temperaturas de hasta 5.000°C y presiones de hasta 500 MPa), conduciendo a la isomerización acelerada de los carotenoides. Zhao y col. (2006) informaron de efectos significativos en pigmentos carotenoides (astaxantina), lo que lleva a la degradación del pigmento en compuesto(s) incoloro(s). Además, la degradación de los carotenoides durante el procesamiento ultrasónico puede estar relacionada con las reacciones de oxidación, que promueve la interacción con los radicales libres formados durante la sonicación. Las cavidades formadas por la sonicación se pueden llenar con vapor de agua y gases disueltos en el zumo, como O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. Los radicales hidroxilo producidos por la cavitación pueden estar implicados en la degradación de los pigmentos carotenoides tales como  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\zeta$ -caroteno presentes en el ZN (Tiwari y col., 2008b).

Los valores de los parámetros de color de las muestras sin tratar para el ZnG están en la Tabla 4.2.

El ajuste de los datos experimentales a los del modelo simplificado, que viene dado por el parámetro  $R^2_{aj}$ , fue bueno con una significación  $p < 0,05$  (Tabla 4.17). Todos los tratamientos duraron 10 minutos.

En el ZnG, se observa que el tratamiento 50%US+160mg/L+55°C supuso un incremento del 49,27% de la IC, mientras que el tratamiento 100%US+160mg/L+60°C supuso una disminución del 33,14% de la IC.

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

---

El tratamiento 50%US+0mg/L+50°C supuso un incremento del 14,89% del tono, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C supuso una disminución del 9,22% del tono.

El tratamiento 50%US+0mg/L+50°C supuso un incremento del 8,85% del %Am, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C supuso una disminución del 7,71% del %Am.

El tratamiento 0%US+160mg/L+50°C supuso un incremento del 1,92% del %Rj, mientras que el tratamiento 50%US+0mg/L+50°C supuso una disminución del 5,11% del %Rj.

El tratamiento 0%US+160mg/L+50°C supuso un incremento del 12,12% del %Az, mientras que el tratamiento 50%US+0mg/L+50°C supuso una disminución del 9,91% del %Az.

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

**Tabla 4.17. Efecto de la temperatura, el aceite esencial de hoja de canela y el ultrasonido sobre los parámetros de color de los zumos naturales de naranja y de granada.**

Zumoo Natural de Naranja												
US	AEC	T <sup>a</sup>	IC	IC <sub>pred</sub>	T <sub>n</sub>	T <sub>n</sub> <sub>pred</sub>	%Am	%Am <sub>pred</sub>	%R	%R <sub>pred</sub>	%Az	%Az <sub>pred</sub>
100	320	55	2,94±0,01	2,97	1,48±0,01	1,48	46,36±0,04	46,40	31,29±0,01	31,30	22,34±0,03	22,31
50	160	55	3,12±0,00	3,04	1,44±0,00	1,45	45,58±0,00	45,83	31,58±0,00	31,50	22,84±0,00	22,68
50	160	55	3,01±0,00	3,04	1,47±0,00	1,45	46,14±0,00	45,83	31,44±0,00	31,50	22,41±0,00	22,68
100	160	50	3,18±0,01	3,13	1,49±0,00	1,50	46,48±0,00	46,75	31,27±0,02	31,23	22,27±0,01	22,09
0	0	55	3,66±0,05	3,57	1,29±0,01	1,28	41,60±0,01	41,64	32,42±0,01	32,42	25,98±0,01	25,94
0	320	55	3,40±0,02	3,57	1,27±0,01	1,28	41,24±0,15	41,30	32,51±0,05	32,47	26,27±0,11	26,22
50	0	50	3,13±0,02	3,20	1,48±0,01	1,47	46,28±0,08	46,14	31,34±0,01	31,36	22,39±0,08	22,47
100	0	55	3,06±0,10	2,97	1,48±0,01	1,48	46,26±0,22	46,22	31,27±0,04	31,25	22,51±0,20	22,56
50	320	60	3,28±0,01	3,12	1,47±0,01	1,47	45,92±0,04	46,06	31,38±0,01	31,35	22,71±0,03	22,58
50	160	55	3,08±0,07	3,04	1,45±0,01	1,45	45,77±0,33	45,83	31,53±0,08	31,50	22,70±0,25	22,68
50	320	50	3,16±0,00	3,20	1,47±0,00	1,47	46,23±0,03	46,06	31,47±0,02	31,48	22,31±0,05	22,49
50	0	60	3,03±0,01	3,12	1,46±0,01	1,47	45,86±0,18	46,13	31,40±0,04	31,37	22,76±0,16	22,56
0	160	60	3,68±0,05	3,65	1,30±0,01	1,30	42,03±0,07	41,91	32,33±0,07	32,34	25,65±0,01	25,83
100	160	60	2,99±0,05	3,05	1,51±0,01	1,50	46,96±0,14	46,75	31,11±0,08	31,10	22,00±0,14	22,18
0	160	50	3,83±0,07	3,73	1,29±0,01	1,29	41,83±0,10	41,91	32,36±0,01	32,33	25,80±0,09	25,74
				0,8692*		0,9834*		0,9883*		0,9883*		0,9864*
Zumoo Natural de Granada												
US	AEC	T <sup>a</sup>	IC	IC <sub>pred</sub>	T <sub>n</sub>	T <sub>n</sub> <sub>pred</sub>	%Am	%Am <sub>pred</sub>	%R	%R <sub>pred</sub>	%Az	%Az <sub>pred</sub>
100	320	55	4,76±0,06	4,81	1,45±0,00	1,45	45,56±0,02	45,82	31,45±0,01	31,42	22,99±0,02	22,73
50	160	55	5,06±0,00	5,06	1,36±0,00	1,37	43,55±0,00	43,64	32,04±0,00	32,03	24,40±0,00	24,30
50	160	55	5,09±0,00	5,06	1,37±0,00	1,37	43,73±0,00	43,64	32,03±0,00	32,03	24,24±0,00	24,30
100	160	50	4,76±0,00	4,74	1,43±0,00	1,45	45,07±0,00	45,27	31,51±0,00	31,45	23,41±0,00	23,29
0	0	55	4,42±0,05	4,30	1,43±0,00	1,42	45,03±0,13	44,79	31,45±0,00	31,54	23,52±0,14	23,71
0	320	55	4,39±0,38	4,58	1,29±0,02	1,30	41,64±0,46	41,60	32,25±0,07	32,22	26,11±0,38	26,08
50	0	50	4,10±0,00	4,28	1,62±0,00	1,61	48,72±0,00	48,47	30,10±0,00	30,19	21,18±0,00	21,34
100	0	55	4,70±0,22	4,54	1,54±0,10	1,56	47,38±2,01	47,44	30,83±0,71	30,75	21,79±1,30	21,77
50	320	60	2,58±0,03	2,38	1,54±0,00	1,56	47,64±0,05	47,90	30,85±0,01	30,74	21,51±0,06	21,29
50	160	55	5,07±0,01	5,06	1,36±0,00	1,37	43,61±0,10	43,64	32,04±0,01	32,03	24,35±0,09	24,30
50	320	50	4,90±0,00	4,82	1,38±0,00	1,36	43,79±0,00	43,33	31,71±0,00	31,84	24,51±0,00	24,78
50	0	60	2,31±0,02	2,37	1,51±0,00	1,54	47,09±0,04	47,57	31,19±0,01	31,04	21,72±0,03	21,40
0	160	60	2,33±0,03	2,34	1,37±0,01	1,37	43,87±0,15	43,67	32,06±0,03	32,13	24,07±0,12	24,23
100	160	60	2,28±0,00	2,37	1,53±0,01	1,51	47,60±0,13	47,11	31,09±0,04	31,22	21,31±0,09	21,58
0	160	50	4,43±0,00	4,32	1,28±0,00	1,30	41,31±0,00	41,83	32,33±0,00	32,13	26,36±0,00	25,94
				0,9773*		0,9121*		0,9308*		0,9038*		0,9422*

US (%); AEC (mg/L); T<sup>a</sup> (°C)

\*Valor R<sup>2</sup><sub>aj</sub>

Los cambios observados en el color y las antocianinas pueden ser causados por la cavitación, que regula diversas reacciones físicas, químicas o biológicas, tales como

la aceleración de reacciones químicas, el aumento de las velocidades de difusión, dispersión de agregados o destrucción de moléculas complejas susceptibles tales como enzimas y polímeros implicados en el color (Sala y col., 1995). Por ejemplo, se sabe que el color del zumo de mora se debe principalmente a la presencia de pigmentos carotenoides y de antocianinas. La degradación del color de este zumo puede ser debida a las condiciones físicas extremas que se producen durante la sonicación (temperatura de hasta 5.500°C y una presión de hasta 500 MPa) (Suslick, 1988). Se sabe que varias reacciones sonoquímicas, como son la generación de radicales libres, la mejora de las reacciones de polimerización/despolimerización y otras reacciones pueden ser las responsables de la degradación de las antocianinas y del color (Floros y Liang, 1994). La degradación de los compuestos responsables del color y de las antocianinas durante el procesamiento con US puede estar relacionada con las reacciones de oxidación, promovidas por la interacción con los radicales libres que se forman durante el tratamiento con US (Portenlänger y Heusinger, 1992). Los radicales hidroxilo producidos por la cavitación pueden estar implicados en la degradación de antocianinas por la apertura de anillos y la formación de chalcona (Sadilova y col., 2007). Se ha postulado la apertura del anillo de pirilio y la formación de chalcona como una primera etapa de la degradación; y se ha propuesto la hidrólisis del resto glicosídico y la formación de la aglicona como la reacción inicial (Tiwari y col., 2009b).

#### **4.3.6. Estudio de estabilidad de los ZnN y ZnG conservados a 5°C**

Los parámetros de color de los zumos sin tratar conservados a 5°C durante 30 días se muestran en la Tabla 4.18, pudiéndose observar cambios significativos en los parámetros del ZnG. Lo cual podría explicarse por la disminución significativa del contenido en antocianinas al final del periodo estudiado (Tabla 4.19), que son las principales responsables del color del ZnG.



**Tabla 4.18. Parámetros de color de los zumos naturales sin tratar (Tiempo 0 y Tiempo 30 días a 5°C).**

<b>ZnN</b>					
	IC	Tn	% Am	%Rj	% Az
Tiempo 0	3,43±0,27	1,29±0,02	41,81±0,53	32,39±0,11	25,80±0,42
Tiempo 30 días	3,05±0,67	1,27±0,05	41,18±1,40	32,39±0,19	26,43±1,22
<b>ZnG</b>					
	IC	Tn	% Am	%Rj	% Az
Tiempo 0	3,41±1,12	1,41±0,04	44,76±0,71	31,72±0,33	23,51±0,42
Tiempo 30 días	0,58±0,14	2,17±0,11	58,48±1,84	26,91±0,53	14,60±1,32

De los compuestos bioactivos determinados al final del periodo de almacenamiento en refrigeración de las muestras sin tratar, se observa que tanto el contenido en CT en el ZnN como el de AMT en el ZnG disminuyeron significativamente (Tabla 4.19).

**Tabla 4.19. Compuestos bioactivos de los zumos naturales sin tratar (Tiempo 0 y Tiempo 30 días a 5°C).**

	ZnN	ZnG
FT <sub>t0</sub> (mg Eq gal/100 mL)	63,34±3,06	111,10±43,77
FT <sub>t30</sub> (mg Eq gal/100 mL)	60,64±1,21	96,58±32,34
CT <sub>t0</sub> (mg/100 mL)	0,73±0,12	–
CT <sub>t30</sub> (mg/100 mL)	0,50±0,08	–
AMT <sub>t0</sub> (mg cianidina-3-glucósido/100 mL)	–	5,65±1,73
AMT <sub>t30</sub> (mg cianidina-3-glucósido/100 mL)	–	0,97±0,89

Los compuestos bioactivos (FT, CT, AMT) y los parámetros de color del ZnN y del ZnG tratados, también se determinaron al final del periodo de almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).

En el ZnN, el ajuste de los datos experimentales del contenido en FT<sub>t30</sub> a los del modelo simplificado es bueno, teniendo  $R^2_{aj}$  un valor de 0,92 con una significación  $p < 0,05$ . Sin embargo, el ajuste para los CT<sub>t30</sub> fue  $R^2_{aj} < 0,3$ , con una significación  $p > 0,05$  (Tabla 4.20).

La Figura 4.6 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre el contenido en FT del ZnN al final del almacenamiento refrigerado.

En el ZnN, el tratamiento 50%US+320mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 32,42% en el contenido de FT<sub>t30</sub>, mientras que el tratamiento 100%US+0mg/L+55°C (10 minutos) supuso una disminución del 16,46% en el contenido de FT<sub>t30</sub> (Tabla 4.20).

En el ZnN, el tratamiento 100%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 24% en el contenido de CT<sub>t30</sub>, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso una disminución del 40,00% en el contenido de CT<sub>t30</sub> (Tabla 4.20).

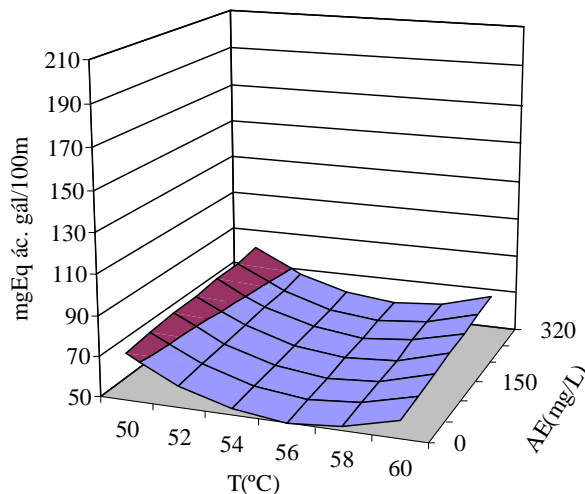
**Tabla 4.20. Compuestos bioactivos del zumo natural de naranja tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).**

US (%)	AEC (mg/L)	Tª(°C)	FT <sub>t30</sub>		CT <sub>t30</sub>	
			Val exp	Val pred	Val exp	Val pred
100	320	55	57,47±0,30	58,00	0,41±0,06	
50	160	55	55,51±0,29	54,53	0,48±0,00	
50	160	55	55,70±0,12	54,53	0,46±0,00	
100	160	50	75,39±2,73	76,69	0,62±0,02	
0	0	55	49,95±2,47	51,05	0,38±0,03	
0	320	55	56,47±0,77	58,00	0,58±0,01	
50	0	50	73,87±2,15	73,53	0,53±0,01	
100	0	55	50,66±1,52	51,05	0,52±0,11	
50	320	60	65,68±1,00	66,39	0,31±0,05	
50	160	55	56,02±0,83	54,53	0,47±0,02	
50	320	50	80,30±0,79	79,85	0,55±0,01	
50	0	60	57,67±1,14	58,81	0,49±0,04	
0	160	60	60,25±1,59	62,60	0,45±0,06	
100	160	60	66,89±8,63	62,60	0,35±0,19	
0	160	50	77,26±2,21	76,69	0,30±0,03	
					0,9205*	≤0,3*

\*Valor R<sup>2</sup><sub>aj</sub>

Se ha informado que el procesamiento con US de zumos tiene, un efecto mínimo sobre la degradación de los principales parámetros de calidad tales como el ácido

ascórbico y el color en ZN durante el almacenamiento a 10°C (Tiwari y col., 2008c). Este efecto positivo del US se supone que es debido a la eliminación eficaz de oxígeno ocluido del zumo el cual se sabe que está implicado en la degradación de los zumos (Knorr y col., 2004).



**Figura 4.6. Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en fenoles totales del zumo natural de naranja al final del almacenamiento refrigerado. 0% amplitud. mg Eq. ác. gálico/100 mL. □ 50-70; ■ 70-90.**

En el ZnG, el ajuste de los datos experimentales del contenido en  $FT_{t30}$  a los del modelo simplificado fue bueno, teniendo  $R^2_{aj}$  un valor de 0,87, con una significación  $p < 0,05$ . El ajuste para el contenido en  $AMT_{t30}$  tuvo un valor de  $R^2_{aj}$  de 0,96, con una significación  $p < 0,05$  (Tabla 4.21).

La Figura 4.7 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre el contenido en  $FT_{30}$  del ZnG al final del almacenamiento refrigerado. La Figura 4.8 muestra el efecto de la temperatura, el US y el AEC sobre el contenido en  $AMT_{30}$  del ZnG al final del almacenamiento refrigerado.

En el ZnG, el tratamiento 50%US+0mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 56,54% en el contenido de  $FT_{t30}$ , mientras que el tratamiento

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

0%US+320mg/L+55°C (10 minutos) supuso una disminución del 47,26% en el contenido de FT<sub>t30</sub>.

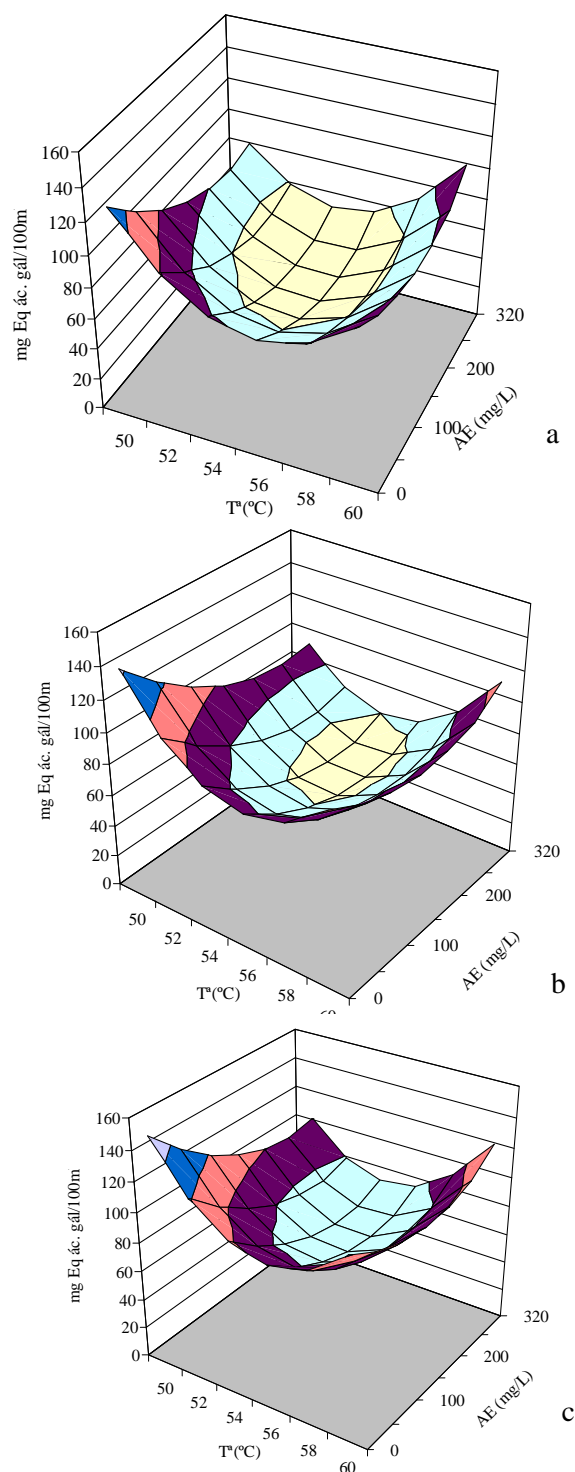
En el ZnG, el tratamiento 50%US+0mg/L+60°C (10 minutos) supuso un incremento del 270,10% en el contenido de AMT<sub>t30</sub>, mientras que el tratamiento 100%US+320mg/L+55°C (10 minutos) supuso una disminución del 81,44% en el contenido de AMT<sub>t30</sub>.

**Tabla 4.21. Compuestos bioactivos del zumo natural de granada tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).**

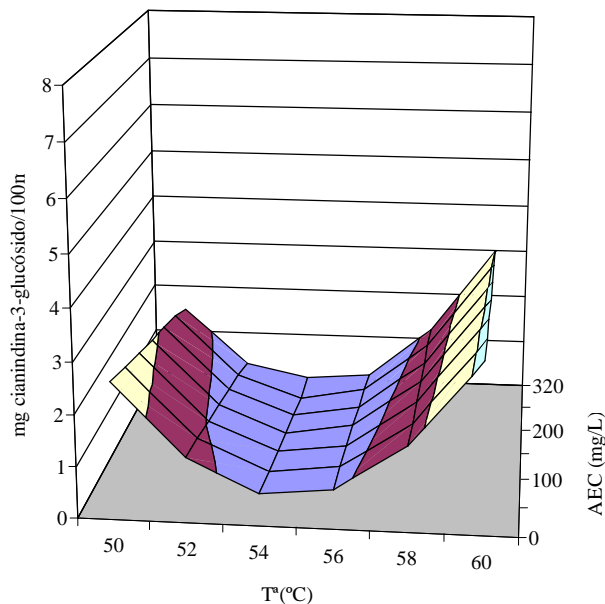
US (%)	AEC (mg/L)	T <sup>a</sup> (°C)	FT <sub>t30</sub>		AMT <sub>t30</sub>	
			Val exp	Val pred	Val exp	Val pred
100	320	55	66,65±2,01	70,67	0,18±0,01	0,00
50	160	55	51,81±0,06	53,28	0,23±0,00	0,25
50	160	55	56,52±0,06	53,28	0,26±0,00	0,25
100	160	50	102,00±0,18	105,52	2,05±0,03	2,07
0	0	55	78,17±2,11	77,86	0,20±0,04	0,61
0	320	55	50,94±1,29	50,22	0,18±0,02	0,00
50	0	50	151,19±5,54	142,74	2,87±0,02	2,65
100	0	55	101,33±2,29	98,31	0,32±0,01	0,61
50	320	60	102,26±4,40	108,94	2,67±0,02	3,00
50	160	55	53,73±2,44	53,28	0,24±0,01	0,25
50	320	50	100,81±4,81	89,82	1,07±0,06	1,49
50	0	60	101,63±0,69	111,30	3,59±0,07	3,28
0	160	60	92,56±4,84	78,91	2,97±0,03	3,14
100	160	60	102,77±13,49	99,36	3,25±0,21	3,14
0	160	50	73,43±16,09	85,07	2,26±0,01	2,07
				0,8727*	0,958*	

\*Valor R<sup>2</sup><sub>aj</sub>

Tiwari y col., (2009d) investigaron la estabilidad de las antocianinas en zumo de fresa sometido a US (20 kHz, 0,33-0,81 W/mL, 0-10 min) durante el almacenamiento, mostrando altos niveles de retención de pelargonidina-3-glucósido. Sin embargo, los resultados dependieron en gran medida de la temperatura de almacenamiento, con una mayor estabilidad de la pelargonidina-3-glucosa a una temperatura de almacenamiento de 4°C que de 20°C.



**Figura 4.7.** Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en fenoles totales del zumo natural de granada al final del almacenamiento refrigerado. a: 0% amplitud; b: 50% amplitud; c: 100% amplitud. mg Eq. Ác. Gálico/100 mL. ■ 0-20; ■ 20-40; ■ 40-60; ■ 60-80; ■ 80-100; ■ 100-120; ■ 120-140; ■ 140-160.



**Figura 4.8.** Efecto de la temperatura, el ultrasonido y el aceite esencial de hoja de canela sobre el contenido en antocianinas monoméricas totales del zumo natural de granada al final del almacenamiento refrigerado. 0% amplitud. mg cianidina-3-glucósido/100 mL. □ 0-1; ■ 1-2; □ 2-3; □ 3-4; ■ 4-5; ■ 5-6; ■ 6-7; □ 7-8.

Respecto a los parámetros de color, el ajuste de los datos experimentales obtenidos al final del estudio de estabilidad a los del modelo simplificado no es bueno, teniendo  $R^2_{aj}$  un valor  $<0,3$  para ambos zumos, con una significación  $p>0,05$ .

En el ZnN (Tabla 4.22), se observa que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C supuso un incremento del 22,95% de la IC, mientras que el tratamiento 100%US+160mg/L+50°C supuso una disminución del 29,51% de la IC.

El tratamiento 100%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 22,05% del tono, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso también un incremento del 1,57% del tono.

El tratamiento 100%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 15,86% del %Am, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso también un incremento del 1,12% del %Am.

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

El tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso una disminución del 0,19% del %Rj, mientras que el tratamiento 100%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso una disminución del 5,25% del %Rj.

El tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso una disminución del 1,51% del %Az, mientras que el tratamiento 100%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso una disminución del 18,27% del %Az.

**Tabla 4.22. Parámetros de color del zumo natural de naranja tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).**

US	AEC	T <sup>a</sup>	IC	Tn	%Am	%Rj	%Az
0	160	60	3,45±0,29	1,31±0,01	42,28±0,23	32,21±0,06	25,51±0,17
0	0	55	2,51±0,93	1,32±0,03	42,37±0,56	32,16±0,20	25,47±0,36
50	320	60	3,18±0,24	1,49±0,02	46,38±0,36	31,22±0,11	22,40±0,36
100	0	55	2,91±0,43	1,51±0,03	46,75±0,64	30,99±0,15	22,25±0,49
50	160	55	2,89±0,79	1,47±0,04	46,11±0,74	31,31±0,28	22,57±0,47
0	320	55	3,23±0,09	1,29±0,00	41,81±0,10	32,31±0,01	25,88±0,09
100	160	60	3,10±0,42	1,51±0,02	46,97±0,31	31,03±0,17	22,00±0,14
0	160	50	3,75±0,23	1,29±0,01	41,64±0,22	32,33±0,04	26,03±0,18
50	160	55	2,89±0,79	1,47±0,04	46,11±0,74	31,31±0,28	22,57±0,47
50	0	60	2,38±0,99	1,53±0,09	47,21±1,86	30,89±0,56	21,90±1,31
50	0	50	2,32±1,39	1,52±0,10	47,02±1,91	30,93±0,74	22,05±1,17
100	320	55	2,75±0,29	1,50±0,02	46,62±0,41	31,05±0,16	22,33±0,25
50	160	55	2,89±0,79	1,47±0,04	46,11±0,74	31,31±0,28	22,57±0,47
50	320	50	2,19±0,93	1,53±0,07	47,23±1,56	30,94±0,49	21,83±1,07
100	160	50	2,15±0,74	1,55±0,05	47,71±1,11	30,69±0,31	21,60±0,79

US (%); AEC (mg/L); T<sup>a</sup>(°C)

Para el ZnG (Tabla 4.23), se observa que el tratamiento 50%US+160mg/L+55°C (10 minutos) supuso un incremento del 393,10% de la IC, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+60°C (10 minutos) supuso una disminución del 29,31% de la IC.

El tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 10,60% del tono, mientras que el tratamiento 50%US+160mg/L+55°C (10 minutos) supuso una disminución del 25,81% del tono.

Capítulo 4. Estudio del efecto combinado de la termosonicación y el aceite esencial de hoja de canela sobre la calidad nutricional y microbiológica de los zumos naturales de naranja y de granada utilizando la metodología de superficie de respuesta

El tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 5,23% del %Am, mientras que el tratamiento 50%US+160mg/L+55°C (10 minutos) supuso una disminución del 16,23% del %Am.

El tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 16,13% del %Rj, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso una disminución del 4,87% del %Rj.

El tratamiento 50%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso un incremento del 41,37% del %Az, mientras que el tratamiento 0%US+160mg/L+50°C (10 minutos) supuso una disminución del 11,92% del %Az.

**Tabla 4.23. Parámetros de color del zumo natural de granada tratado con combinación de ultrasonido, temperatura y aceite esencial de hoja de canela al final del almacenamiento refrigerado (30 días a 5°C).**

US	AEC	T <sup>a</sup>	IC	Tn	%Am	%Rj	%Az
0	160	60	0,41±0,00	1,64±0,02	51,23±0,23	31,25±0,17	17,53±0,07
0	0	55	0,72±0,04	2,33±0,02	60,56±0,34	26,02±0,09	13,42±0,25
50	320	60	0,87±0,00	1,90±0,01	54,70±0,07	28,79±0,05	16,51±0,25
100	0	55	2,30±0,46	1,92±0,24	54,45±3,96	28,42±1,54	17,13±2,42
50	160	55	2,86±0,28	1,61±0,05	48,99±1,13	30,37±0,32	20,64±0,81
0	320	55	0,70±0,04	1,66±0,02	49,68±0,60	29,86±0,06	20,46±0,54
100	160	60	0,77±0,03	1,76±0,01	53,00±0,16	30,05±0,02	16,95±0,14
0	160	50	0,77±0,00	2,40±0,00	61,54±0,04	25,60±0,01	12,86±0,03
50	160	55	2,86±0,28	1,61±0,05	48,99±1,13	30,37±0,32	20,64±0,81
50	0	60	0,80±0,01	1,78±0,05	53,06±0,60	29,74±0,51	17,20±0,09
50	0	50	0,72±0,00	1,69±0,00	50,19±0,02	29,66±0,01	20,15±0,01
100	320	55	2,21±0,03	1,81±0,02	52,66±0,30	29,15±0,10	18,19±0,21
50	160	55	2,86±0,28	1,61±0,05	48,99±1,13	30,37±0,32	20,64±0,81
50	320	50	2,36±0,00	1,75±0,00	51,31±0,04	29,34±0,01	19,35±0,03
100	160	50	2,70±0,00	1,76±0,00	51,65±0,03	29,40±0,01	18,95±0,02

US (%); AEC (mg/L); T<sup>a</sup>(°C)

En conclusión, la MSR y el diseño Box-Behnken han sido eficaces para modelar matemáticamente el efecto de la termosonicación y el AEC en la calidad de los zumos y en reducir al mínimo el número de experimentos requeridos para obtener conclusiones con significación estadística adecuada. En general, los datos experimentales de los



parámetros de calidad (FT; FvT; CT; AMT; parámetros de color; pH; °Brix) del ZnN y del ZnG tratados se ajustaron bien ( $P < 0,05$ ;  $R^2_{aj} > 0,84$ ) a los modelos simplificados desarrollados a partir de los datos experimentales obtenidos.

El tratamiento a aplicar dependerá del zumo que se quiere conservar, de sus propiedades físico-químicas, de su composición en compuestos bioactivos así como de su población microbiana inicial. Es necesario ajustar los parámetros del tratamiento en cada ocasión en función del objetivo del tratamiento y del tipo de zumo.

## **CAPÍTULO 5. ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 5297 Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* LM82 EN ZUMO NATURAL DE MANZANA TRATADO CON TERMOSONICACIÓN Y ACEITE ESENCIAL DE HOJA DE CANELA.**

### **5.1. Justificación del estudio**

La manzana (*Malus domestica*), perteneciente a la familia *Rosaceae*, es una de las frutas más nutritivas y populares. Tanto la manzana como el zumo de manzana son una fuente rica de compuestos con alta capacidad antioxidante tales como ácidos fenólicos, flavonoides y flavonoles. Estos compuestos juegan un papel importante en la protección de nuestro cuerpo contra la enfermedad coronaria, el daño del sistema inmune, el asma y la diabetes (Abid y col., 2014c; 2013).

Los zumos son considerados como vehículos transmisores de enfermedades desde que se han detectado brotes alimentarios asociados a *E. coli* O157: H7 en zumos de frutas. El primer brote de *E. coli* O157:H7 en ZM contaminado se produjo en Estados Unidos en 1991 (Park y Kang, 2013). Aunque no se han reportado brotes relacionados con *L. monocytogenes* en zumos de frutas, sí se ha aislado en ZM de pH 3,78 (Harris y col., 2003). Por ello, se aconseja que *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* sean clasificados como microorganismos diana (US Food and Drug Administration, 1998). Tradicionalmente, para lograr la reducción de 5-log reportado por la “Food and Drug Administration” (FDA), los zumos son pasterizados usando el proceso tradicional de llenado en caliente (Park y Kang, 2013). Aunque el tratamiento térmico tradicional garantiza la seguridad microbiológica de los zumos de fruta, tiene efectos negativos sobre la calidad sensorial y nutricional, debido a los largos tiempos de procesamiento (Chemat y col., 2011; Park y Kang, 2013; Tiwari y Mason, 2012). Durante los últimos años, se ha estudiado el desarrollo de tecnologías emergentes que causan un daño mínimo en la composición nutricional y las características sensoriales de los zumos naturales. Entre estas tecnologías emergentes, se ha prestado especial

atención a la aplicación de US en la conservación de bebidas (Chemat y col., 2011; Piyasena y col., 2003).

Debido a la creciente demanda de los consumidores para eliminar los aditivos alimentarios químicos y/o sintéticos, los AEs de plantas y sus componentes han sido propuestos como buenos candidatos para la conservación de alimentos y zumos de frutas (Tserennadmid y col., 2011).

El objetivo específico de este estudio fue determinar la actividad antimicrobiana de diferentes antimicrobianos naturales y estudiar el efecto combinado de temperatura moderada, US y AEC, en la inactivación y supervivencia de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82 en ZnM.

## **5.2. Diseño experimental y metodología**

### **5.2.1. Microorganismos y preparación de los inóculos**

*L. monocytogenes* LM82 (Food and Drug Administration, EEUU; resistente a estreptomicina (Strep): 0,1g/L) y *E. coli* O157:H7 5297 (cedida por la Universidad de Gante, Bélgica) fueron elegidos como microorganismos diana en el presente estudio. Ambas cepas fueron conservadas a -80°C en microviales Microbank™ (Pro-labo Diagnostics, Neston, Wirral, UK). Cada dos meses, se abrió uno de los viales para preparar los cultivos puros. El cultivo puro de *L. monocytogenes* LM 82 se obtuvo por siembra por agotamiento en medio de cultivo PCA+Strep en placas Petri e inoculación a partir de una colonia aislada en caldo TSB. El cultivo puro de *E. coli* O157:H7 5297 se obtuvo por siembra por agotamiento en medio de cultivo Agar MacConkey Sorbitol O157:H7 (Microkit, Madrid, España) en placas Petri e inoculación a partir de una colonia aislada en TSB estéril (Cultimed, Panreac Barcelona, España). Los inóculos fueron preparados transfiriendo una colonia obtenida en placas Petri, con el medio de cultivo adecuado, a TSB, que fue incubado durante 24 h a 37°C antes de ser almacenado a -20°C en una solución de 40% de TSB y 60% glicerol hasta ser usado. Los cultivos puros para los experimentos se hicieron transfiriendo, con un asa de siembra estéril, una colonia aislada de un cultivo puro a caldo TSB e incubado 24 h a 37°C. Los inóculos

fueron estandarizados por dilución en TSB hasta alcanzar una DO de 0,1 con el espectrofotómetro (Nicolet Evolution 300, Thermo Electron Corporation) ajustado a una longitud de onda de 600 nm para obtener así una concentración microbiana de  $10^7$  ufc/mL. Los recuentos se hicieron empleando diluciones decimales seriadas y el método de vertido en placas Petri que contenían el medio adecuado para cada microorganismo, seguido de incubación a 37°C durante 24 h (Cava-Roda y col., 2012a, 2012b).

### **5.2.2. Actividad antimicrobiana. Determinación de la CMI, de las CPIs y de la CMB**

Se estudió el efecto antimicrobiano del AEL, del limoneno y del AEC que fueron suministrados gratuitamente por Destilerías Muñoz Gálvez, SA (Murcia, Spain). Las soluciones madre se prepararon siguiendo la metodología de Souza y col. (2005) utilizando Tween 20 (0,8%). Las concentraciones del ensayo fueron de 10.524 a 0 mg/L para el AEC y de 8.529 a 0 mg/L para el AEL y el limoneno.

La determinación de la CMI se hizo empleando placas de microtitulación de 96 pocillos (Sarstedt Ltd.) siguiendo la metodología de Gutierrez y col. (2009) con algunas modificaciones y descrita en el apartado 1.2.3 del capítulo 1. Las microplacas se colocaron a continuación en el espectrofotómetro Multiskan Ascent® (Thermo Electron Corporation) ajustado a 37°C. La absorbancia se registró a 595 nm cada 1 hora durante un periodo de incubación de 24 h. La determinación de las CPIs y de los %IC se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2.3 del capítulo 1. Cada experimento se repitió tres veces y los resultados se expresaron en mg/L.

Para el cálculo de la CMB se utilizó el método descrito por Prakash y col. (2012) ligeramente modificado. Tras la determinación de la CMI, 100 µL de los pocillos que no mostraron crecimiento fueron reinoculados en superficie en placas Petri con el medio de cultivo apropiado para cada microorganismo y sin antimicrobiano, a la temperatura apropiada (37°C). La concentración más baja que previno la reactivación de la proliferación de bacterias se consideró como la CMB. Cada experimento se repitió tres veces y los resultados se expresaron en mg/L.

### **5.2.3. Preparación del zumo natural de manzana (ZnM). Preparación de la muestras con AEC**

Las manzanas (var. Golden) se compraron en un supermercado local de Molina de Segura (Murcia, España). Las frutas se mantuvieron a 5°C durante 1 día hasta la elaboración del zumo. Las frutas dañadas se descartaron. Las frutas se lavaron con agua corriente fría y se secaron. Las manzanas se cortaron en cuatro trozos y el zumo se obtuvo inmediatamente con una licuadora (Ariete Centrika metálica 173) en condiciones asépticas. El ZnM se pasteurizó (90°C, 4 minutos). Las muestras se almacenaron en la oscuridad a -20°C hasta la realización de los tratamientos de termosonicación.

Se utilizó la metodología descrita en el apartado 1.2.4 del capítulo 1 para preparar las muestras de ZnM con AEC para los tratamientos de termosonicación.

### **5.2.4. Determinación del pH y de los °Brix**

El pH y los °Brix del ZnM se midieron siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.2 del capítulo 2. Todas medidas se realizaron por triplicado.

### **5.2.5. Tratamientos de termosonicación con AEC en ZnM**

Se estudió la inactivación de *L. monocytogenes* LM82 y *E. coli* O157:H7 5297 en ZnM por tratamientos de termosonicación (24 kHz; 105 µm; 33,31 W/mL; 40°C; 5 minutos) siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2.4 del capítulo 1. También se estudió el efecto combinado de los tratamientos de termosonicación con 20 mg/L de AEC, concentración aceptada sensorialmente en el Capítulo 2. Para cada tratamiento, las muestras de ZnM se precalentaron a la temperatura deseada y se inocularon con una concentración bacteriana de  $\sim 10^5$  ufc/mL (Ciccolini y col., 1997; Gastélum y col., 2012; Guerrero y col., 2001b; Guerrero y col., 2005; López-Malo y col., 2005a; López-Malo y col., 1999). Los recuentos de células viables se determinaron a tiempo 0, 1, 2, 3 4 y 5 minutos de tratamiento, utilizando el método de vertido en placa en PCA+strep (*L. monocytogenes* LM82) y en Agar MacConkey Sorbitol O157:H7 (*E. coli* O157:H7

5297). Se utilizaron dos placas para cada dilución decimal y se incubaron a 37°C durante 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **5.2.6. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM 82 en ZnM tratado durante su almacenamiento a 8°C**

Inmediatamente tras realizarse los tratamientos descritos en el apartado 5.2.6, se conservaron todas las muestras de ZnM (control, 20mg/L, 40°C, 40°C+20mg/L, 40°C+US, 40°C+20mg/L+US) asépticamente envasadas en tubos de polipropileno con tapa de rosca de 50 mL en una estufa refrigerada a 8,0±0,5°C durante 29 días. Las muestras se analizaron los días 0, 4, 7, 11, 18, 21, 25 y 29 de almacenamiento (Ferrario y col., 2015; Valero y col., 2007). Para ello, del zumo previamente agitado, se tomaron alícuotas de 1 mL, se realizaron diluciones decimales seriadas, y se hicieron los recuentos de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82 tal como se ha descrito anteriormente. Se hicieron dos placas por dilución, y se incubaron a 37°C durante 24 h.

#### **5.2.7. Análisis estadístico**

Se utilizaron un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y la prueba de Duncan para la comparación de los efectos del tratamiento en *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82. La significancia se definió en  $p < 0,05$ . Estos análisis se realizaron con el Statgraphic Plus para Windows 3.0®, versión 5.0 (StatPoint, Inc., Herndon, VA, EE.UU.).

### **5.3. Resultados y discusión**

#### **5.3.1. Actividad antimicrobiana. Determinación de la CMI, las CPIs y la CMB**

Las curvas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82 en TSB suplementado con diferentes antimicrobianos naturales e incubados durante 24 horas a 37°C en el microtiter se muestran en las Figura 5.1 a 5.3. *L. monocytogenes* LM82 fue más sensible que *E. coli* O157:H7 5297 a todos los compuestos ensayados, a

excepción del limoneno, del que se necesitó una concentración dos veces mayor para inhibir el crecimiento de la bacteria Gram-positiva. De los compuestos estudiados, el AEC fue el antimicrobiano natural más eficaz inhibiendo el crecimiento de ambas bacterias.

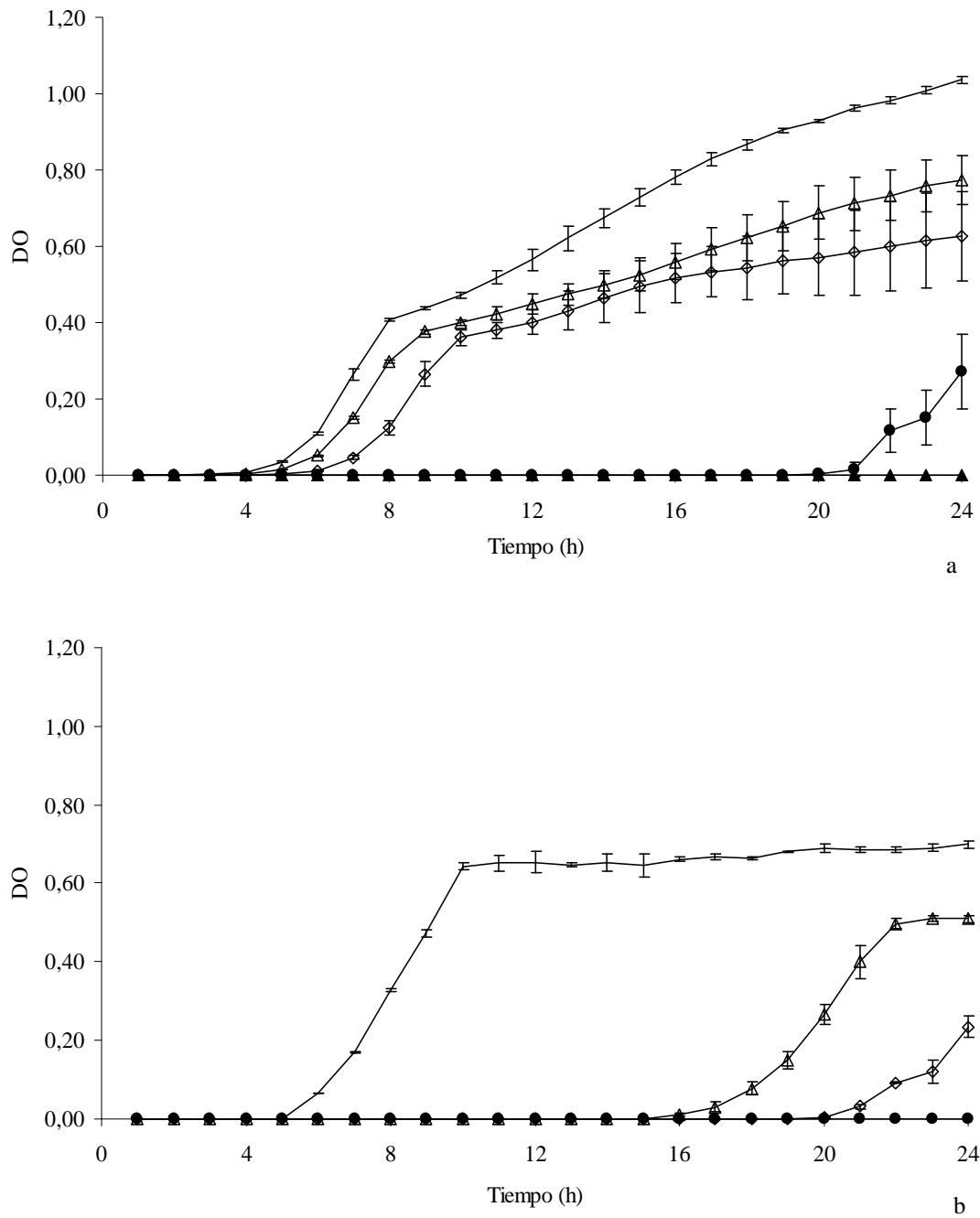


Figura 5.1. Crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (a) y *L. monocytogenes* LM82 (b) en TSB suplementado con aceite esencial de hoja de canela. (▲ 2.631 mg/L, ● 1.316 mg/L, ◇ 658 mg/L, △ 329 mg/L, — control).



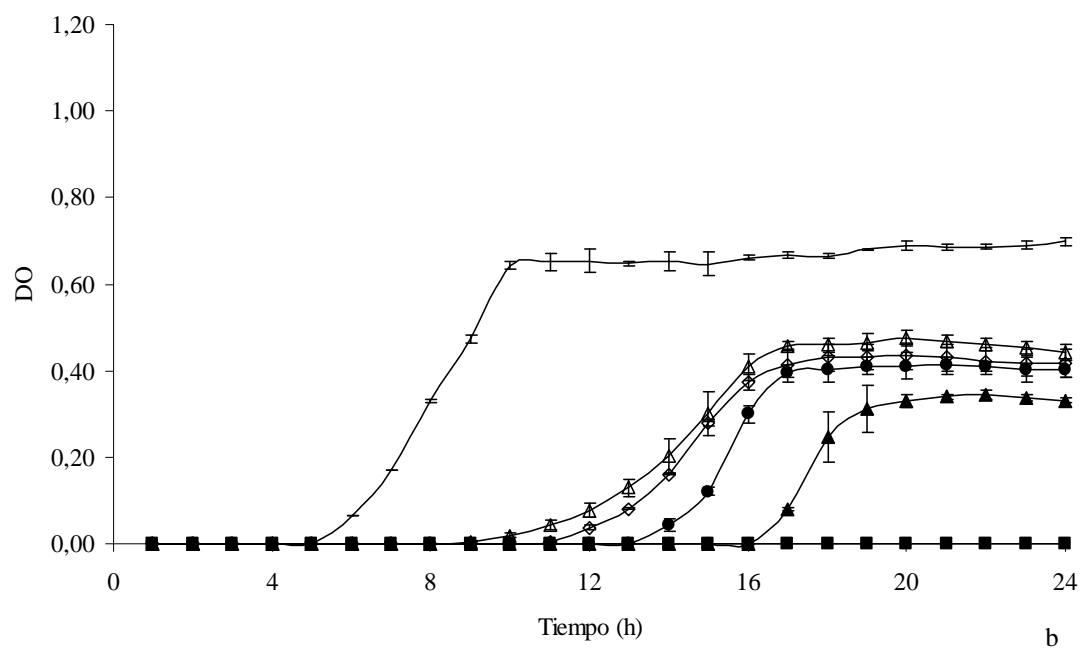
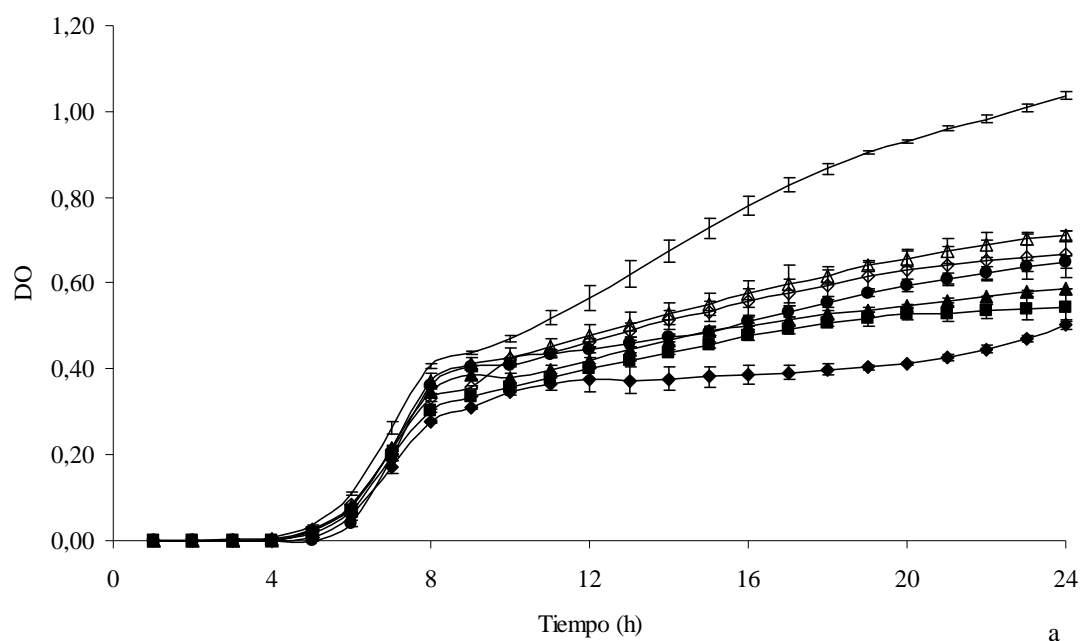


Figura 5.2. Crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (a) y *L. monocytogenes* LM82 (b) en TSB suplementado con aceite esencial de limón. (◆ 8.500 mg/L; ■ 4.250 mg/L; ▲ 2.125 mg/L, ● 1.063 mg/L, ◇ 531 mg/L, △ 266 mg/L, — control).

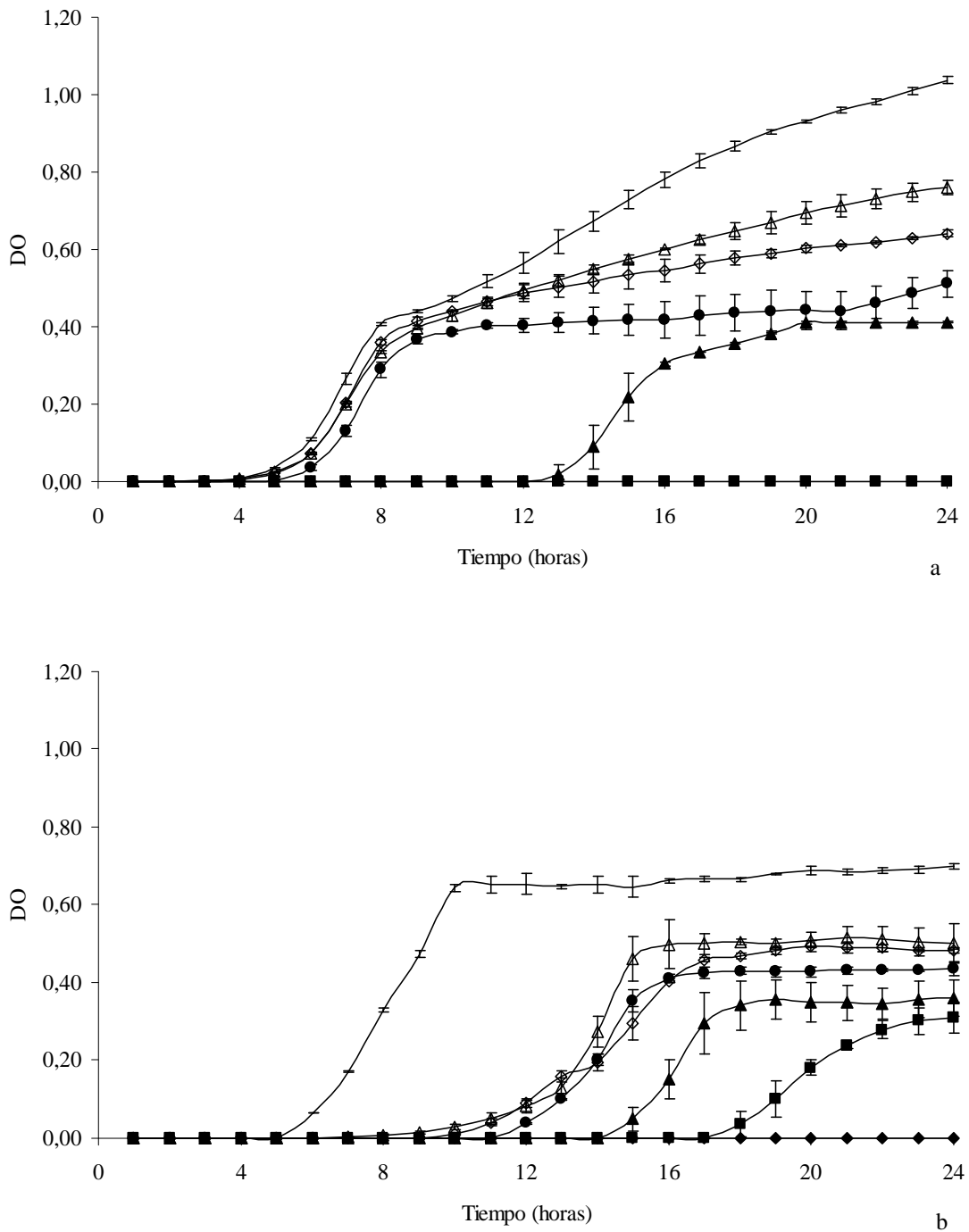


Figura 5.3. Crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (a) y *L. monocytogenes* LM82 (b) en TSB suplementado con Limoneno ( $\blacklozenge$  8.500 mg/L;  $\blacksquare$  4.250 mg/L;  $\blacktriangle$  2.125 mg/L,  $\bullet$  1.063 mg/L,  $\diamond$  531 mg/L,  $\Delta$  266 mg/L, — control).

La Tabla 5.1 muestra la CMI y la CMB de los AEs y sus componentes frente a *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82. El AEC fue el antimicrobiano más efectivo, siendo *L. monocytogenes* LM82 la bacteria más sensible. El limoneno fue más eficaz inhibiendo el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 que el de *L. monocytogenes* LM82, pues se necesitó una concentración de limoneno dos veces menor para inhibir el crecimiento de la bacteria Gram-negativa.

**Tabla 5.1. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82.**

	Antimicrobiano	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
<b><i>E. coli</i> O157:H7 5297</b>	Limóneno	4200	>8400
	AEL	>8529	>8529
	AEC	2631	10524
<b><i>L. monocytogenes</i> LM82</b>	Limóneno	8400	> 8400
	AEL	4200	> 8529
	AEC	1300	2631

La Tabla 5.2 muestra las CPIs y los %IC de los antimicrobianos naturales estudiados. Para *E. coli* O157:H7 5297 las CPIs del limoneno estaban comprendidas entre 2100 y 260 mg/L con un %IC entre 69,43 y 9,27%. Respecto al AEL, las CPIs para esta bacteria Gram-negativa estaban comprendidas entre 8500 y 266 mg/L con un %IC entre el 47,64 y 33,45%, siendo por tanto este antimicrobiano menos efectivo inhibiendo el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297. Sin embargo, el AEC fue el más efectivo inhibiendo el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 pues las CPIs estaban comprendidas entre 1300 y 325 mg/L con un %IC entre el 97,50 y el 25,75%. Para *L. monocytogenes* LM82 las CPIs del limoneno estaban comprendidas entre 4200 y 260 mg/L con un %IC entre el 83,60 y 28,70%. Respecto al AEL, las CPIs para esta bacteria Gram-positiva estaban comprendidas entre 2125 y 266 mg/L con un %IC entre el 69,96 y 45,14%, siendo por tanto este antimicrobiano más efectivo inhibiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* LM82 que el de *E. coli* O157:H7 5297. Finalmente, el AEC fue el antimicrobiano más efectivo inhibiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* LM82 pues las CPIs estaban comprendidas entre 650 y 325 mg/L con un %IC entre el 97,12 y el 72,20%.

Las CPIs tienen una gran importancia en tecnología de los alimentos, pues aunque por si solas no inhiben el crecimiento microbiano, pueden ser combinadas con

tecnologías no térmicas para conseguir alimentos seguros microbiológicamente y que conserven sus propiedades nutricionales sin que sus propiedades sensoriales se vean afectadas negativamente, pues se usarían concentraciones de antimicrobianos inferiores a las necesarias para inhibir el crecimiento o inactivar los microorganismos presentes en los alimentos.

**Tabla 5.2. Porcentajes de inhibición del crecimiento de las concentraciones inhibitorias y de las concentraciones parcialmente inhibitorias.**

	<i>E. coli</i> O157:H7 5297		<i>L. monocytogenes</i> LM82	
	mg/L	%IC	mg/L	%IC
<b>Limoneno</b>	<b>8400</b>	100,00		100,00
	<b>4200</b>	100,00		83,60
	<b>2100</b>	69,43		66,93
	<b>1050</b>	23,37		48,24
	<b>525</b>	16,46		37,94
	<b>260</b>	9,27		28,70
	<b>0</b>	0,00		0,00
<b>AEL</b>	<b>8500</b>	47,64		100,00
	<b>4250</b>	38,78		100,00
	<b>2125</b>	27,76		69,96
	<b>1063</b>	25,40		61,56
	<b>531</b>	32,26		47,26
	<b>266</b>	33,45		48,71
	<b>0</b>	0,00		0,00
<b>AEC</b>	<b>2600</b>	100,00		100,00
	<b>1300</b>	97,50		100,00
	<b>650</b>	38,09		97,12
	<b>325</b>	25,75		72,20
	<b>0</b>	0,00		0,00

Los resultados obtenidos podrían explicarse por la diferente composición de los antimicrobianos estudiados. El principal constituyente del AEC utilizado en este ensayo es el eugenol (74,32%, valor nominal), porcentaje similar al encontrado por otros autores (Ranasinghe y col., 2002; Suhr y Nielsen, 2003). Los AEs de cítricos contienen un 85-99% de componentes volátiles y un 1-15% de componentes no volátiles. Los constituyentes volátiles son una mezcla de monoterpenos (limoneno) y de hidrocarburos de sesquiterpeno y sus derivados oxigenados, incluyendo: aldehídos (cital), cetonas, ácidos, alcoholes (linalool) y ésteres. Los monoterpenos constituyen el 97% de la composición de los AEs de cítricos siendo los alcoholes, aldehídos y ésteres los componentes porcentuales más bajos, que van del 1,8 al 2,2%. El componente principal

del AEL es el limoneno, desde un 45 hasta un 76%; mientras que el linalool se encuentra en una concentración del 0,015% (v/v) (Fisher y Phillips, 2008).

En la bibliografía consultada, hay pocos datos de la actividad inhibitoria que tienen los antimicrobianos empleados en este estudio sobre *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82. Espina y col. (2011) estudiaron la actividad antimicrobiana de los AEs de limón, de mandarina y de naranja frente a diferentes cepas de bacterias, siendo *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* EGD-e dos de ellas. Los AEs contenían de un 76,05 a un 87,51% de monoterpenos hidrocarbonados (Limoneno, 59,10-85,50%) y de un 5,21 a un 13,62% de monoterpenos oxigenados (carvona). El contenido en limoneno era similar en los tres AEs, por lo que la mayor actividad antimicrobiana del AE de mandarina no podía ser atribuida al limoneno, sino que debía estar relacionada con el mayor contenido en monoterpenos oxigenados del AE de mandarina (13,62%) en comparación con los otros dos AEs.

Settanni y col. (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de 23 AEs de cítricos frente a 92 cepas de bacterias patógenas de brotes alimentarios y determinaron la composición química de los AEs más efectivos. Obtuvieron que el AEL tenía para *L. monocytogenes* 133 una CMI de 0,156  $\mu\text{l}/\text{mL}$  y para *S. enterica* Newport 50404 una CMI de 0,019  $\mu\text{l}/\text{mL}$ . Respecto a la composición química de los AELs más efectivos, obtuvieron que los hidrocarburos monoterpénicos eran los compuestos mayoritarios (78,23-67,61%), siendo el limoneno el monoterpeno mayoritario (46,31-60,90%). Mientras que el contenido en monoterpenos oxigenados variaba entre el 6,18 y el 19,35%. Estos autores atribuyeron la mayor capacidad antimicrobiana de ambos AEs de limón a que contenían el mayor contenido en monoterpenos oxigenados (~19%). Otros autores han demostrado que los monoterpenos oxigenados tienen una mayor actividad antimicrobiana que los hidrocarbonados (Burt, 2004). Se sabe que los monoterpenos hidrocarbonados están caracterizados por una baja solubilidad en agua lo cual limita su difusión a través de medios polares y su inactividad está estrechamente relacionada con su limitada capacidad de unión por puentes de hidrógeno (Settanni y col., 2012).

En un estudio llevado a cabo en caldo de cultivo de cerebro y corazón a 37°C, se determinó que el AE de *Citrus limonum* era eficaz contra cuatro cepas de *E. coli* con una CMI de 2,5 ml/100 mL y una CMB de 2,8 ml/100 mL; aunque en medio TBS, los

resultados sugieren que había una inhibición menor del 50% del AEL y del citral frente a *E. coli* y *S. typhimurium*, pero una inhibición > 80% para el geraniol. Cuando el pH de los medios de cultivo se redujo de pH 7 a pH 2, el geraniol (300 µg/mL) mostró un efecto de inhibición menor de 33-13% (Fisher y Phillips, 2008).

Los AEs de limón, de naranja dulce y de bergamota y sus componentes linalool y citral, pero no el limoneno, tuvieron efectos antimicrobianos contra *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *S. aureus*. Cuando las CMI se establecieron *in vitro*, sólo la bergamota (1-0,125% v/v), el linalool (0,06-0,125% v/v) y el citral (0,03-0,06% v/v) tenían concentraciones que eran aceptables para su aplicación en alimentos (Fisher y Phillips, 2008).

Cava-Roda y col. (2012b) determinaron la CMI y la CMB de la vainillina contra *L. monocytogenes* Scott A y *E. coli* O157:H7 en TSB, a pH 7 y pH 6, usando la metodología de microdilución y el espectrofotómetro Multiskan Ascent<sup>®</sup>. Las CMI para *L. monocytogenes* fueron 3.000 mg/L en TSB (pH 7) y 2.800 mg/L en TSB (pH 6). Las CMI para *E. coli* O157:H7 fueron 2.800 mg/L en TSB (pH 7) y 2.400 mg/L en TSB (pH 6). Las CMBs en TSB fueron 8.000 mg/L para *L. monocytogenes* y 6.000 mg/L para *E. coli* O157:H7. La baja resistencia de *E. coli* O157:H7 a la vainillina podría ser explicada por la presencia de ciertas proteínas en la membrana externa, que crean canales para la penetración de compuestos de bajo peso molecular. Un mecanismo similar podría ser aplicado al limoneno, al cual *E. coli* O157:H7 es más sensible que *L. monocytogenes* LM82 (ver Figura 5.3 y Tablas 5.1-5.2).

En la bibliografía se describen diferentes mecanismos de acción antimicrobiana para los AEs y sus componentes principales. Se han observado cambios morfológicos evidentes en la membrana externa de *E. coli* y de *S. typhimurium*, que se desintegra después de la exposición a carvacrol y timol; mientras que el AE de tomillo produce sobre *L. monocytogenes* un mayor engrosamiento además de la disrupción de la pared celular, junto con un aumento de la rugosidad de la pared celular (Fisher y Phillips, 2008). Alteraciones similares fueron observadas en *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en presencia de orégano y canela, respectivamente (Fisher y Phillips, 2008).

Los terpenos tienen la capacidad de producir la disrupción de la envoltura microbiana y penetrar en la estructura de los lípidos de la pared celular de las bacterias, provocando la desnaturalización de las proteínas y la destrucción de la membrana celular que conduce a fugas citoplasmáticas, a la lisis y, finalmente, a la muerte celular. La cantidad de iones  $K^+$  perdidos en *S. aureus* aumentó con concentraciones crecientes de AE de árbol de té. La disminución en el pH que se produce debido a esta disrupción de la membrana celular significa que el control de los procesos celulares, tales como la transcripción del ADN, la síntesis de proteínas y la actividad enzimática se pierde (Fisher y Phillips, 2008). No sólo los AEs penetran en la membrana celular, sino también en la membrana mitocondrial que conduce a una mayor permeabilidad del orgánulo y al mismo proceso de fuga de iones (Raybaudi-Massilis y col., 2006). Espina y col. (2013) determinaron que el efecto antimicrobiano del (+)-limoneno (200  $\mu$ l/L) en *E. coli* a pH 7 era debido a la permeabilización de la membrana externa y postularon que el (+)-limoneno a pH 7 podría actuar sobre los fosfolípidos y los lipopolisacáridos de la membrana externa.

Gill y Holley (2006a) investigaron el papel de ruptura de membrana en la actividad bactericida de los compuestos eugenol y carvacrol. A concentraciones bactericidas, determinaron que el principal mecanismo de acción del carvacrol y del eugenol era la disrupción de la membrana citoplásmica, lo que aumentaba su permeabilidad no selectiva. Además indicaron que la liberación de ATP a partir de células tratadas con eugenol y carvacrol podría indicar que el eugenol y el carvacrol poseen actividad inhibidora de la ATPasa.

Sikkemma y col. (1995) observaron que la capacidad de los hidrocarburos cíclicos de interactuar con las membranas celulares puede estar limitada por su solubilidad. La presencia del grupo hidroxilo en el eugenol y el carvacrol puede aumentar la solubilidad de estas moléculas en suspensiones acuosas y mejorar su capacidad de pasar a través de las porciones hidrófilas de la envoltura celular (Sikkemma y col., 1995). La interacción de moléculas hidrófobas con las membranas celulares se sabe que afectan la actividad de enzimas embebidas o unidas a membrana (Sikkemma y col., 1995). Esto puede explicar los resultados de inhibición de enzimas y el crecimiento alterado obtenidos por otros autores (Gill y Holley, 2006a).

Gill y Holley (2006b) demostraron que el eugenol, el cinamaldehído y el carvacrol inhibían la actividad ATPasa de membrana tanto de *L. monocytogenes* C717 como de *E. coli* O157:H7 tanto a 5 mM como a 10 mM, aunque para la misma concentración ensayada, el porcentaje de inhibición fue mayor para *E. coli*. La inhibición no específica de enzimas unidas a o embebidas en membrana puede ser causada por pequeñas moléculas hidrofóbicas, presumiblemente debido a los cambios en la conformación de la proteína como consecuencia de interacciones hidrofóbicas (Sikkema y col., 1995). Tal mecanismo puede causar la inhibición observada de la actividad de la ATPasa y de otras enzimas así como el crecimiento bacteriano alterado por acción del carvacrol y del eugenol (Gill y Holley, 2006b).

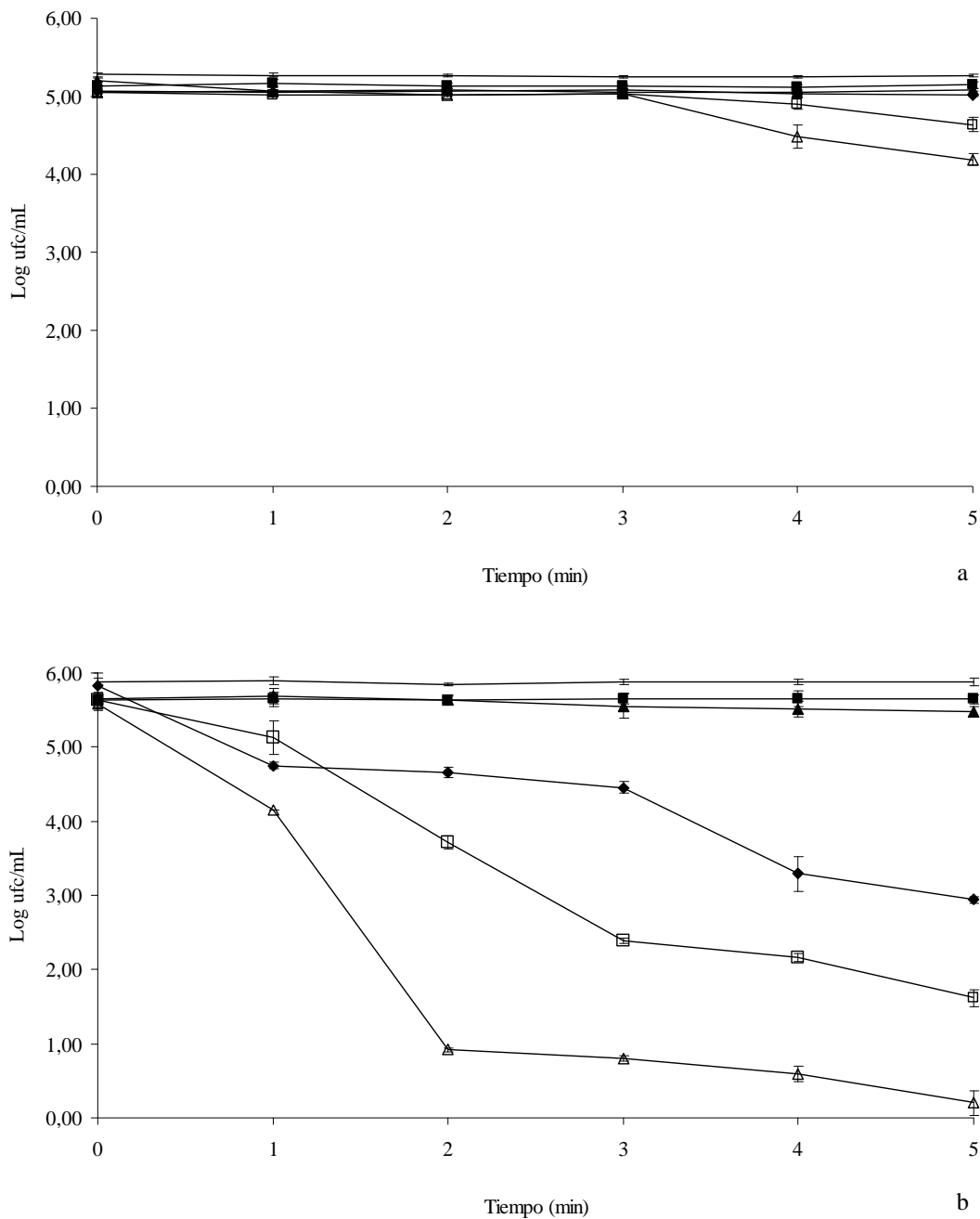
Nuestros resultados concuerdan con la bibliografía consultada, generalmente las bacterias Gram-negativas son menos sensibles a los agentes antimicrobianos debido a la membrana externa de lipopolisacáridos de este grupo, que restringe la difusión de compuestos hidrófobos. Sin embargo, esto no significa que las bacterias Gram-positivas sean siempre más susceptibles (Burt, 2004; Tajkarimi y col., 2010). Burt (2004) y Pelissari y col. (2009) han informado de que el AE de orégano tiene mayor actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) que las Gram-negativas (*E. coli* y *Pseudomonas*). Se ha determinado que *E. coli* y *S. typhimurium* también son tolerantes a los AEs de semilla de zanahoria, de pomelo, de limón, de cebolla y de perejil (Tongnuanchan y Benjakul, 2014). El AE de romero (*Rosmarinus officinalis*) exhibió actividad contra bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y Gram-positivas (*S. aureus* y *Bacillus subtilis*) (Okoh y col., 2010). Teixeira y col. (2013) obtuvieron la mayor reducción (log 8,0 ufc/mL) de *L. innocua* cuando se utilizaron 20 µL de los AEs de cilantro, de orégano y de romero. El AE de tomillo (20 µL) fue capaz de inhibir tanto a *L. monocytogenes* como a *L. innocua*.

### 5.3.2. Tratamientos de termosonicación en ZnM con AEC

La Figura 5.4 muestra la inactivación de *L. monocytogenes* LM82 (a) y *E. coli* O157:H7 5297 (b) en ZnM (pH: 3,97±0,01; °Brix: 11,6±0,15) sometido a diferentes tratamientos. Los resultados muestran que *L. monocytogenes* LM82 fue más resistente a todos los tratamientos ensayados que *E. coli* O157:H7 5297.



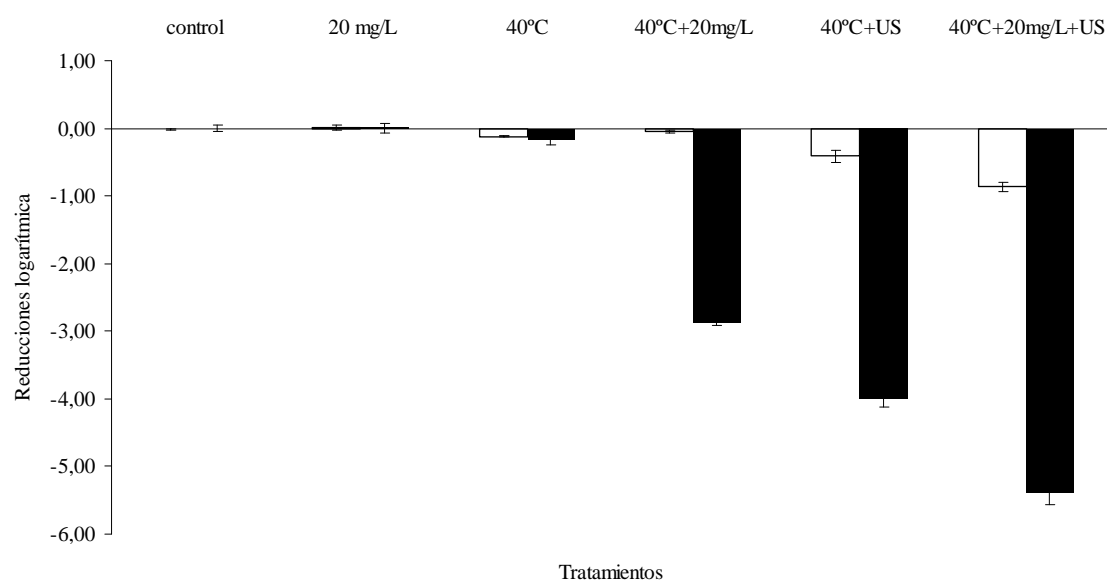
La Figura 5.5 muestra las reducciones logarítmicas obtenidas para *L. monocytogenes* LM82 y *E. coli* O157:H7 5297 al final de los 5 minutos de cada uno de los tratamientos para ambas bacterias, la mayor inactivación se obtuvo en las muestras tratadas con la combinación de 20 mg/L de AEC y US (24 kHz, 105  $\mu$ m; 33,31 W/mL) a 40°C durante 5 minutos. Esta combinación produjo  $0,87\pm 0,07$  y  $5,39\pm 0,17$  reducciones logarítmicas significativas para *L. monocytogenes* LM82 y *E. coli* O157:H7 5297, respectivamente. Los dos factores (20 mg/L AEC; US) a 40°C y su combinación (20mg/L+US) a 40°C tuvieron un efecto significativo en la inactivación de ambas bacterias.



**Figura 5.4. Inactivación de *L. monocytogenes* LM82 (a) y *E. coli* O157:H7 5297 (b) en zumo natural de manzana (— control; ■ 20 mg/L; ▲ 40°C; ◆ 40°C+20 mg/L, □ 40°C+US; △ 40°C+20 mg/L +US).**

En la Figura 5.4a se observa que la inactivación de *L. monocytogenes* LM82 por acción del tratamiento combinado de 20 mg/L+US+40°C comienza a partir del minuto 3, al igual que con el tratamiento combinado de US+40°C, que aunque es menos

efectivo que el que combina los tres factores, también provoca una ligera inactivación de *L. monocytogenes* LM82.



**Figura 5.5. Reducciones logarítmicas de *L. monocytogenes* LM82 (□) y *E. coli* O157:H7 5297 (■) en zumo natural de manzana.**

Gabriel y Nakano. (2010) estudiaron las respuestas de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c y *S. enteritidis* frente a diferentes combinaciones de factores fisicoquímicos de estrés (pH: 3–8; aw: 0,93–0,99; temperatura: 3–62°C). Sus resultados mostraron que *L. monocytogenes* generalmente tenía menores tasas de inactivación y era capaz de crecer en la mayoría de las combinaciones ensayadas. Además, observaron que *L. monocytogenes* 1/2 c tenía la mayor resistencia térmica y que fue más resistente en combinaciones con pH bajo (4,0). Nuestros resultados concuerdan con los autores anteriores, pues *L. monocytogenes* LM82 mostró mayor resistencia a todos los tratamientos testados, por lo que al final de todos los tratamientos su inactivación fue menor que la de *E. coli* O157:H7 5297 (ver Figuras 5.4 y 5.5).

Diferentes estudios han demostrado la eficacia de los AEs y sus componentes activos para controlar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes tanto en zumos como en frutas recién cortadas. Sin embargo, su eficacia depende del pH de la fruta, del tipo y de la concentración de los AEs usados o del compuesto activo, y del tipo de microorganismo (Burt, 2004). Los estudios se han

hecho con diferentes antimicrobianos naturales (AEs de canela, de corteza de canela, de clavo de olor, de hierba limón, carvacrol, cinamaldehído, eugenol y citral), frutas (melones recién cortados, kiwi) y zumos (zumos de fresa, de naranja, de manzana, de pera, de melón, de sandía) a diferentes pH (3,2-5,5) y con varios microorganismos (*S. enteritidis*, microflora natural, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*) (Raybaudi-Massilia y col., 2006, , 2009, 2008a; 2008b, 2008c). Una de las conclusiones a las que se llegó fue que *L. monocytogenes* era más sensible al AE de corteza de canela que *E. coli* O157:H7 y *S. enteritidis* inoculadas en zumos de melón y de sandía. Este hecho se puede atribuir a la membrana externa (ausente en bacterias Gram-positivas) y a la capa de lipopolisacáridos que poseen los microorganismos Gram-negativos, que puede, en parte, limitar la difusión de compuestos hidrófobos hacia el interior de la célula (Brul y Coote, 1999; Burt, 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2009).

Se ha estudiado la actividad antimicrobiana de la canela en polvo obtenida de la corteza, que contiene cinamaldehído y eugenol como principales componentes, para inactivar microorganismos patógenos tales como *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en zumos de frutas. Se alcanzaron de 4 a 6 reducciones logarítmicas de *L. monocytogenes* inoculada en ZM pasteurizado con 0,1%, 0,2% y 0,3% (w/v) de canela en polvo después de 1 h de incubación a 5 y 20°C. Además, no se produjo crecimiento del microorganismo durante 7 días de almacenamiento (Raybaudi-Massilia y col., 2009). En otro estudio, Ceylan y Fung (2004) demostraron que la adición de 0,3% (w/v) de canela en polvo en ZM pasteurizado disminuyó gradualmente los recuentos de *E. coli* O157:H7 en 1,6 (8°C) y 2 (25°C) log ufc/mL después de 14 y 3 días, respectivamente. Por otro lado, se ha reportado una reducción media de 2 log ufc/mL de *E. coli* O157:H7 en sidra de manzana sin pasteurizar mantenida a 42°C mediante la adición de 2% (w/v) de canela en polvo. Los ensayos realizados muestran que la canela en polvo era más eficaz contra *L. monocytogenes* que *E. coli* O157:H7 bajo condiciones experimentales similares (Raybaudi-Massilia y col., 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la adición de 20 mg/L de AEC al ZnM, concentración aceptada sensorialmente, no inhibe el crecimiento de las bacterias estudiadas, lo cual podría atribuirse a la baja concentración utilizada, a la corta duración de los tratamientos (5 minutos) y a que los ZnM con AEC inoculados no tuvieron un periodo de incubación previamente a los tratamientos.

La bibliografía consultada muestra que la combinación de temperatura moderada y antimicrobianos naturales resulta efectiva en la inactivación microbiana.

Cava-Roda y col. (2012a) estudiaron las cinéticas de destrucción de *L. monocytogenes* Scott A en leche semi-desnatada calentada a 55, 58, 60 y 62°C sin y con la adición de 900, 1.400 y 1.800 mg/L de vainillina. Observaron que la adición de vainillina a la leche semi-desnatada calentada entre 55 y 62°C reducía la resistencia térmica de *L. monocytogenes* Scott A, siendo el efecto más evidente a las temperaturas más bajas.

Espina y col. (2011) estudiaron el efecto combinado de los AEs de limón, de mandarina y de naranja (200 µl/L) con temperatura moderada (54°C, 10 minutos) frente a *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* EGD-e en tampón citrato-fosfato (pH 7,0). Determinaron que el tratamiento combinado exhibía efectos letales sinérgicos, obteniendo más de 5 reducciones logarítmicas al final del tratamiento térmico moderado combinado con cada uno de los tres AEs.

Espina y col. (2012) estudiaron la posibilidad de combinar tratamientos térmicos moderados (54-60°C) con AEs de cítricos (0-200 µl/L) para mejorar la eficacia de los tratamientos térmicos y reducir así la intensidad del tratamiento. En el ZM comercial (pH 3,7), al añadir 200 µl/L de AEL se produjo una reducción de la temperatura de tratamiento de 4,5°C o en el tiempo de tratamiento (5,7 veces) en el intervalo de temperatura ensayado (54-60°C). Además, determinaron que la adición de 75 µl/L de AEL al ZM inoculado con  $3 \times 10^4$  ufc/mL podría lograr el mismo efecto sinérgico del tratamiento combinado a 54°C.

Cuando se estudió el efecto combinado de la carvona (5 mmol/L) y el tratamiento térmico suave (45°C, 30 minutos) para la inactivación de *L. monocytogenes* en fase de crecimiento exponencial cultivada a 8°C; se observó que por separado, los dos tratamientos no provocaban pérdida de viabilidad, pero se obtuvo una reducción de 1,3 log en el número de células viables cuando se combinaron ambos tratamientos. Sin embargo, *L. monocytogenes* en fase de crecimiento exponencial cultivada a 35 ó 45°C no fue susceptible al mismo tratamiento combinado. Los autores propusieron que las membranas de las células cultivadas a 35 ó 45°C son menos fluidas, porque hay una relación "normal" entre ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados en sus

fosfolípidos y por lo tanto la carvona es menos eficaz contra ellas pues no podría disolverse fácilmente en la bicapa lipídica de las células (Burt, 2004).

Nuestros resultados concuerdan con la bibliografía consultada, pues se obtuvo una reducción significativa de ~3 ciclos logarítmicos para *E. coli* O157:H7 5297 en el ZnM con el tratamiento de 40°C+20 mg/L de AEC durante 5 minutos. Para *L. monocytogenes* LM82 se observó una reducción no significativa con el mismo tratamiento. En nuestro estudio, *L. monocytogenes* LM82 fue cultivada a 37°C, lo cual unido a la baja concentración de AEC empleado en el tratamiento combinado de 40°C y AEC, podría explicar la baja inactivación obtenida con este tratamiento concreto para *L. monocytogenes* LM82.

La bibliografía consultada muestra que la combinación de temperatura moderada, antimicrobianos y sonicación resulta efectiva en la inactivación microbiana en caldos de cultivo.

Gastélum y col. (2012) investigaron la inactivación de *L. innocua* ATCC 51742 en TSB (100 mL, pH 3,5, aw 0,96) por aplicación combinada de termosonicación (20 kHz/400 W; 60, 75, ó 90  $\mu\text{m}$ ; 40, 50, ó 60°C) con vainillina (200, 350, ó 500 mg/kg). La combinación de US, temperatura inferior o igual a 50°C y vainillina mejoró la inactivación de *L. innocua* ATCC 51742, obteniéndose una reducción logarítmica de 4 ciclos.

Salleh-Mack y Roberts (2007) estudiaron el efecto de la temperatura (<30°C), la concentración de sólidos solubles (8, 12, y 16 g/100 mL), los ácidos orgánicos (ácidos málico y cítrico) y del pH (2,5 y 4,0) en la inactivación *E. coli* ATCC 25922 por ultrasonido (24 kHz; 100  $\mu\text{m}$ ; 85 W/cm<sup>2</sup>) usando una sonda de 22 mm. Los tratamientos duraron el tiempo necesario para alcanzar la reducción de 5 ciclos logarítmicos. Controlando la temperatura (<30°C), obtuvieron una reducción logarítmica de 1,79±0,48 ciclos a los 3 minutos de tratamiento y de 5,54±0,25 a los 10 minutos. Detectaron que a mayor concentración de sólidos solubles mayor tiempo de sonicación se necesitaba para alcanzar la reducción de 5 ciclos logarítmicos; y que a los pH más bajos, *E. coli* tenía menor resistencia a la sonicación. Además, obtuvieron que la inactivación de *E. coli* ATCC 25922 por sonicación combinada con ácidos cítrico y málico a pH 2,5 y 4, era de 5,4 a 4 reducciones logarítmicas a los 9 minutos.

Franco-Vega y col. (2015) estudiaron la supervivencia de *L. monocytogenes* Scott A en TSB (50 mL; aw 0,97; pH 6) tratado con termosonicación (20 kHz; 90  $\mu$ m; 55,0 $\pm$ 0,1; 60,0 $\pm$ 0,1 ó 65,0 $\pm$ 0,1°C) en comparación con tratamiento térmico (55,0 $\pm$ 0,1; 60,0 $\pm$ 0,1 ó 65,0 $\pm$ 0,1°C). Los tratamientos de termosonicación obtuvieron una mayor reducción logarítmica en menos tiempo que los tratamientos térmicos. En concreto, en los tratamientos de termosonicación obtuvieron ~2,2 reducciones logarítmicas a 55°C (10 min), ~3 reducciones logarítmicas a 60°C (7,8 min) y ~5 reducciones logarítmicas a 65°C (2,5 min).

Lee y col. (2009) estudiaron la respuesta de *E. coli* K12 a los tratamientos de sonicación, manosonicación (MS), termosonicación (TS), y manotermosonicación (MTS) a 40, 47, 54, y 61°C y a 100, 300, 400 y 500 kPa, comparándolos con los tratamientos térmicos. El US (20 kHz; 124  $\mu$ m) se aplicó a tampón fosfato (10 mM, pH 7, 50 mL) inoculado con una concentración inicial de  $\sim 10^8$  ufc/mL durante 4 minutos. A los 4 minutos de tratamiento térmico, no se obtuvo inactivación a 40 y 47°C, se obtuvieron 0,2 reducciones logarítmicas a 54°C mientras que a 61°C se obtuvieron 5 reducciones logarítmicas. El tratamiento de sonicación a temperaturas sub-letales (40, 47 y 54 °C) redujo la población de *E. coli* K12 ~4 ciclos log en 4 min. El tratamiento de sonicación a 61°C redujo 5-log la población de *E. coli* en 0,5 minutos.

Baumann y col. (2005) estudiaron el efecto de la temperatura (20-60°C), el US (20 kHz, 457 mW/mL), el pH y la matriz alimentaria (solución salina con pH 7,0, solución salina acidificada a pH 3,4 y sidra de manzana con pH 3,4) sobre la inactivación de *L. monocytogenes* 10403S, una cepa resistente al US. La aplicación del US incrementó la tasa de inactivación tanto a temperaturas letales como subletales. También observaron muerte adicional de *L. monocytogenes* 10403S a temperaturas letales debido a la baja acidez.

La bibliografía consultada muestra que la combinación de temperatura moderada, antimicrobianos y sonicación resulta efectiva en la inactivación microbiana en zumos de fruta.

Gabriel (2012) estudió la eficacia del US de frecuencias múltiples (600 W; 50-100%; 28, 45 y 100 kHz; 0-30 minutos) en ZM (pH 3,78; 11,13°Brix) contra una serie de microorganismos patógenos y alterantes. Los resultados que obtuvo mostraron que la

adaptación microbiana al pH ácido aumentó la resistencia de *E. coli* O157: H7 y *Salmonella* spp., pero disminuyó la de *L. monocytogenes*. El inóculo mixto de levaduras alterantes compuesto de *Debaryomyces hansenii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* y *S. cerevisiae* fue más resistente que cualquiera de los agentes patógenos adaptados o no al pH ácido.

Gabriel (2014) estudió la inactivación de varias cepas de bacterias patógenas *E. coli* O157:H7, *S. enterica*, y *L. monocytogenes*; y de levaduras alterantes, *D. hansenii*, *C. lusitaniae*, *T. delbrueckii*, *P. fermentans*, y *S. cerevisiae* en ZN (pH 3,67; 11,13°Brix) tratado con US de frecuencias múltiples (600 W; 28, 45 y 100 kHz; 0-40 minutos). Los valores  $T_{5D}$  de *E. coli*, *S. enterica*, y *L. monocytogenes* aumentaron significativamente después de la exposición al ácido. El aumento de la temperatura debida a la propagación de calor durante el tratamiento de ultrasonidos redujo la resistencia de las bacterias estudiadas.

López-Malo y col. (2005a) estudiaron la inactivación mediante sonicación (20 kHz; 95.2  $\mu\text{m}$ ; 35 $\pm$ 1°C) de *L. monocytogenes* ATCC 19114 D en ZM comercial (300 mL; pH 3.5) usando una sonda de 25 mm de diámetro. De una población inicial de  $\sim 10^6$  ufc/mL obtuvieron una reducción de  $\sim 3$  ciclos logarítmicos a los 6 min de tratamiento.

Moody y col. (2014) estudiaron la inactivación de *E. coli* en ZM comercial (pH 3,52; 11,5 °Brix) tratado con US en modo continuo y pulsado (400 W; 24 kHz; 120  $\mu\text{m}$ ; 50-60°C; 0-30 min) usando una sonda de 22 mm. El US mostró resultados positivos:  $\sim 1,5$  reducciones logarítmicas a los 10 minutos a 50°C y una reducción  $>$  de 6 log después de 5 minutos a 60°C en modo continuo. El microscopio electrónico de barrido mostró lesiones en la superficie celular tales como membranas rotas, perforaciones, pero no se observaron restos de células. Mientras tanto, el microscopio electrónico de transmisión mostró algunos daños internos en las células, tales como la fuga y aglomeración del contenido del citoplasma y el cambio en la forma celular.

Muñoz y col. (2012) estudiaron la respuesta de *E. coli* K12 DSM 1607 a los tratamientos de termosonicación (20 kHz; 100  $\mu\text{m}$ ; 40°C durante 2,9 minutos a 14 mL/min ó 50°C durante 5 minutos a 8 mL/min) en ZM comercial reconstituido (pH 3,56; °Brix 12). El US se aplicó a 40 mL de ZM inoculado con una concentración inicial



de  $\sim 10^7$  ufc/mL usando una sonda de 22 mm. El tratamiento de termosonicación a 40°C y 14 mL/min supuso una reducción significativa de 1,7 ciclos logarítmicos mientras que el tratamiento a 50°C y 8 mL/min implicó una reducción significativa de 2,6 ciclos logarítmicos, respecto a los controles sin tratar ( $p < 0,001$ ).

D'amico y col. (2006) lograron 5 reducciones logarítmicas de *E. coli* O157:H7 en sidra de manzana en 4,5 y 6 minutos de tratamiento de US a 57 y 20°C, respectivamente.

Ugarte y col. (2006) aplicaron US a 60°C para inactivar a *E. coli* K12 en sidra de manzana (pH 4,1) y obtuvieron 5 reducciones logarítmicas en 4 minutos. Por debajo de 60°C, se necesitaron unos 10 minutos para alcanzar las 5 reducciones logarítmicas de *E. coli* K12.

En un estudio de inactivación de *E. coli* K12 en sidra de manzana tratada por termosonicación (100 kPa /59°C) durante un máximo de 4 min, se logró una reducción de 5 log en 3,8 minutos (Lee y col., 2013).

Ferrante y col. (2007) estudiaron la respuesta de *L. monocytogenes* en ZN (pH 3,5) a los tratamientos combinados de temperatura moderada (45°C), US de alta intensidad (600 W, 20 kHz, 95.2  $\mu$ m), y la adición de diferentes concentraciones de vainillina (0, 1.000, 1.500, y 2.000 mg/L), citral (0, 75, y 100 mg/l), o ambos para encontrar el tratamiento de inactivación más efectivo. Determinaron que la presencia de vainillina o citral incrementó el efecto bactericida del tratamiento de termosonicación. Concretamente, partiendo de una población inicial de  $4 \times 10^6$  ufc/mL, cuando combinaron termosonicación y 1.000 mg/L de vainillina obtuvieron 3,5 reducciones logarítmicas a los 30 minutos; mientras que con la combinación de termosonicación y 75 mg/L citral obtuvieron 5 reducciones logarítmicas a los 30 minutos.

Gabriel (2015) estudió el efecto individual y combinado de los tratamientos térmicos (45, 50, 52, 55, y 60°C), US de frecuencias múltiples (600 W; 28, 45 y 100 kHz), luz ultravioleta-C (UV-C), los aditivos benzoato de sodio (1000 mg/L), sorbato de potasio (1000 mg/L) y los compuestos  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno (60 mg/L) para la pasterización de ZN (pH 3,67; 11,13°Brix) y ZM (pH 3,78; 11,13°Brix) contra *E. coli* O157:H7 ácido-adaptada. En el ZM el tratamiento combinado de ultrasonido y UV-C dio lugar a mayores tasas de inactivación en ambos zumos, con una mayor eficacia en el ZM.

Además, la suplementación con todos los aditivos probados, de forma individual o combinada, resultó en valores  $T_{5D}$  significativamente menores en ambos zumos.

Nuestros resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía, pues la combinación de 20 mg/L+US +40°C durante 5 minutos obtuvo la mayor inactivación de ambos microorganismos. En concreto, esta combinación produjo  $0,87\pm 0,07$  y  $5,39\pm 0,17$  reducciones logarítmicas significativas para *L. monocytogenes* LM82 y *E. coli* O157:H7 5297, respectivamente, coincidiendo nuestros resultados con la bibliografía en que *E. coli* O157:H7 5297 es más sensible que *L. monocytogenes* LM82 a los tratamientos estudiados.

Los resultados obtenidos en el presente ensayo concuerdan con la bibliografía consultada y sugieren que la combinación de US, temperatura moderada y AEC podría tener un efecto sinérgico en la inactivación de *E. coli* O157:H7 5297 y de *L. monocytogenes* LM82 en el ZnM. Esta idea se sustenta por una parte en que la membrana celular es el sitio diana primario de los compuestos bioactivos de los extractos de plantas (Lanciotti y col., 2004) y por otra parte en que los compuestos fenólicos tienen naturaleza lipofílica y podrían acumularse en la bicapa lipídica de la membrana celular, alterando y sensibilizando la membrana a la acción del US (Brul y Coote, 1999). Además, las ondas ultrasónicas mejoran la acción antimicrobiana debilitando la membrana celular (Brul y Coote, 1999; Ferrante y col., 2007; Lanciotti y col., 2004).

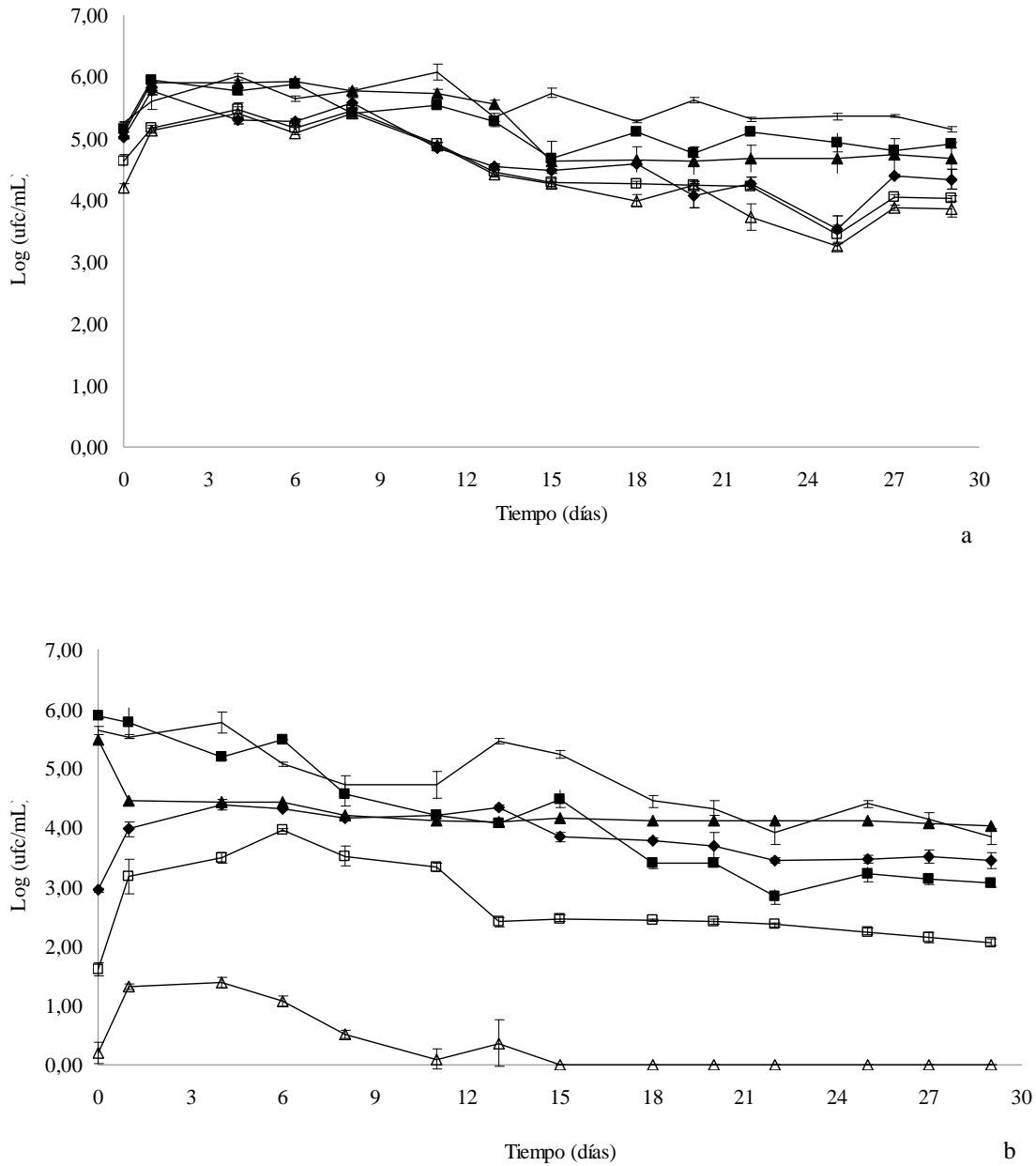
### **5.3.3. Supervivencia de *L. monocytogenes* LM82 y *E. coli* O157:H7 5297 en ZnM durante su almacenamiento a 8°C**

La Figura 5.6 muestra la supervivencia de *L. monocytogenes* LM82 (Figura 5.6a) y *E. coli* O157:H7 5297 (Figura 5.6b) en muestras control y tratadas de ZnM durante su almacenamiento a 8°C (29 días). Durante el almacenamiento en refrigeración (8°C, 29 días), se puede observar que a partir del día 15 de almacenamiento a 8°C no se obtuvieron recuentos de células viables de *E. coli* O157:H7 5297 en la muestra de ZnM tratada con US y 20 mg/L de AEC a 40°C durante 5 minutos.

Respecto a *L. monocytogenes* LM 82, la muestra que conservó la población con los valores más bajos fue la sometida al tratamiento combinado de US y 20 mg/L de

AEC a 40°C durante 5 minutos. También se observa que durante el periodo de refrigeración, *L. monocytogenes* LM82 mantuvo su población sin que se produjeran grandes cambios entre las diferentes muestras tratadas. Lo cual podría explicarse porque *L. monocytogenes* es capaz de resistir temperaturas relativamente bajas comparado con *E. coli* (Gabriel y Nakano, 2010). Por otro lado, se sabe que la temperatura de almacenamiento desempeña un papel importante en la eficacia antimicrobiana de los AEs, siendo más efectivos a temperaturas más altas (Raybaudi-Massilia y col., 2009). Esta característica de los AEs podría explicar el hecho de que durante el almacenamiento refrigerado las muestras tratadas con AEC o con AEC y 40°C no fueran efectivos inhibiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* LM82 (Figura 5.6a).

Respecto al efecto ligeramente inhibitorio que los tratamientos con AEC o con AEC y 40°C tienen sobre *E. coli* O157:H7 5297 (Figura 5.6b), nuestros resultados concuerdan con los de Ceylan y Fung (2004) que observaron que la adición de 0,3% (w/v) de canela en polvo en ZM pasteurizado disminuía gradualmente los recuentos de *E. coli* O157:H7 en 1,6 (8°C) y 2 (25°C) log ufc/mL después de 14 y 3 días de almacenamiento.



**Figura 5.6. Supervivencia de *L. monocytogenes* LM82 (a) y *E. coli* O157:H7 5297 (b) en zumo natural de manzana durante su almacenamiento a 8°C (29 días) (– control; ■ 20 mg/L; ▲ 40°C; ◆ 40°C+20 mg/L, □ 40°C+US; △ 40°C+20 mg/L +US). Todos los tratamientos duraron 5 minutos.**

En la bibliografía consultada no hay muchos estudios donde se describa la supervivencia de *E. coli* O157:H7 5297 y de *L. monocytogenes* LM82 en zumos tratados por combinación de termosonicación y antimicrobianos naturales en condiciones de refrigeración.

El AE de canela o AE de hierba limón y sus compuestos activos eugenol y citral, incorporados en un recubrimiento comestible de alginato en manzanas Fuji recién cortadas mostraron una reducción de más de 4-log en la población de *E. coli* O157:H7. Además, se ha demostrado una inhibición total de la microflora nativa durante 30 días a 5°C, para la conservación, el sabor, la calidad y el control de patógenos del producto. Los antimicrobianos más eficaces fueron los AEs de hierba limón y de canela (0,7%, vol/vol), el cinamaldehído (0,5%, vol/vol) y el citral (0,5%, vol/vol) (Raybaudi-Massilia y col., 2008b). Cuando se probó la aplicación de una combinación de canela y eugenol para el control de la germinación de las esporas de *Alicyclobacillus*, se obtuvo que la aplicación de 40 mg/L de cinamaldehído con 40 mg/L de eugenol o 80 mg/L de eugenol solo en ZM lo conservaron durante 7 días (Bevilacqua y col., 2010).

Palgan y col. (2011) estudiaron la inactivación de *E. coli* y *P. fermentans* inoculadas en una mezcla de zumo fresco de manzana y de arándano tratado con luz ultravioleta (5,3 J/cm<sup>2</sup>), pulsos de luz de alta intensidad (3,3 J/cm<sup>2</sup>), campos eléctricos pulsados (34 kV/cm, 18 Hz, 93 μs) y/o manotermosonicación (4 bar, 43°C, 750 W, 20 kHz). También se realizó el estudio de vida útil de las muestras no tratadas térmicamente durante 35 días y se comparó con muestras pasterizadas (72°C; 26 seg; 94mL/s) y con los zumos no tratados. Todos los tratamientos individuales redujeron significativamente los recuentos microbianos (1,8-6,0 log ufc/mL) en comparación con las muestras no tratadas (p<0,01). Las combinaciones de tratamientos no térmicos UV o HILP seguido de PEF o MTS resultaron para ambos microorganismos en reducciones comparables (p≥0.05) a los observados en las muestras pasterizadas térmicamente (~6 log ufc/mL). Las muestras pasterizadas térmicamente tenían una vida útil superior a 35 días, mientras que la de las muestras tratadas UV+PEF y HILP+PEF tenían 14 y 21 días, respectivamente.

Valero y col. (2007) determinaron que la población microbiana (AM y hongos) del ZN sometido a US de baja y alta frecuencia y mantenido refrigerado a 5°C, no fue

controlada durante más de 42 días de almacenamiento refrigerado. Guerrouj y col. (2016) obtuvieron que las muestras de ZnN sometidas a sonicación a temperaturas inferiores a 46°C y mantenidas en refrigeración durante 29 días (5°C) no eran capaces de controlar la población microbiana del ZnN.

Sánchez-Rubio y col. (2016) obtuvieron que la población de *S. cerevisiae* en ZnN y el ZnG tratados por combinación de US y 20 mg/L de AEC a 50°C durante 30 minutos, disminuyó  $1,55 \pm 0,19$  y  $0,68 \pm 0,16$  ciclos logarítmicos respectivamente al final del periodo de refrigeración (28 días, 5°C). Nuestros resultados concuerdan con estos autores, pues las muestras tratadas con la combinación de US y 20 mg/L de AEC a 40°C durante 5 minutos disminuyeron las poblaciones de ambas bacterias durante el periodo de almacenamiento refrigerado, especialmente la de *E. coli* O157:H7 5297, de la cual no se obtuvieron recuentos a partir del día 15.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que las ondas ultrasónicas actuarían debilitando la membrana celular con lo que el AEC y sus componentes podrían penetrar en el interior de la célula mejorando así la acción microbiana durante el periodo de refrigeración (Ferrante y col., 2007; Lanciotti y col., 2004).

En conclusión, el antimicrobiano más efectivo fue el AEC y *L. monocytogenes* LM82 la bacteria más sensible, excepto para el componente limoneno del que se necesitó una menor concentración para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297. La mayor inactivación de *E. coli* O157:H7 5297 y de *L. monocytogenes* LM82 fue obtenida en las muestras de ZnM tratadas por combinación de US y AEC a 40°C durante 5 minutos, siendo *E. coli* O157:H7 5297 la bacteria más sensible a los tratamientos. Al final del periodo de refrigeración no se obtuvieron recuentos de células viables para *E. coli* O157:H7 5297 en las muestras tratadas por combinación de US y AEC a 40°C durante 5 minutos. Los factores estudiados y su combinación podrían tener un efecto sinérgico en la inactivación y supervivencia en condiciones de refrigeración de *E. coli* O157:H7 5297 y de *L. monocytogenes* LM82.



## CONCLUSIONES GENERALES

1. El aceite esencial de hoja de canela (AEC) inhibió totalmente el crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo de cultivo Soja-Triptona (TSB) (concentración mínima inhibitoria, CMI= 650 mg/L) y parcialmente (concentraciones parcialmente inhibitorias, CPIs, entre 320 y 80 mg/L).
2. El tratamiento combinado de temperatura moderada, ultrasonido (US) y AEC fue efectivo inactivando a *S. cerevisiae* tanto en caldo de cultivo TSB como en zumo natural de naranja (ZnN). La mayor inactivación de *S. cerevisiae* se obtuvo en TSB (5,13 reducciones logarítmicas) tratado con la combinación de AEC y US a 50°C durante 30 minutos. Para el ZnN tratado con la combinación de AEC y US a 50°C durante 30 minutos se obtuvieron ~3,8 reducciones logarítmicas.
3. Los valores  $D_{50/US}$  para *S. cerevisiae* en TSB disminuyeron de 17,26 a 4,74 minutos y fueron significativamente menores conforme aumentaban las concentraciones de AEC.
4. Los modelos “Shoulder+log-linear” y “Weibull” ajustaron con precisión ( $R^2 > 0,97$ ) las curvas de supervivencia de *S. cerevisiae* en TSB y en ZnN obtenidas a partir de los datos de inactivación.
5. El tratamiento de termosonicación combinado con concentraciones subinhibitorias de AEC podría actuar sinérgicamente en la inactivación de *S. cerevisiae*, tanto en TSB como en ZnN.
6. La concentración de AEC aceptada por los panelistas en ZnN y en zumo natural de granada (ZnG) de 20 mg/L es menor que las concentraciones necesarias para provocar la inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae*.
7. La inactivación de *S. cerevisiae*, en muestras de ZnN y ZnG tratadas por combinación de US y AEC (a la concentración aceptada sensorialmente de 20 mg/L) a 50°C durante 30 minutos, fue de  $2,81 \pm 0,19$  y de  $2,52 \pm 0,26$  reducciones logarítmicas en ZnG y en ZnN respectivamente.
8. Los valores  $D_{50}$  para *S. cerevisiae* disminuyeron significativamente en ambos zumos (ZnN y ZnG) cuando se trataron con US y AEC (a la concentración aceptada sensorialmente de 20 mg/L) a 50°C durante 30 minutos. Para ZnN los



valores  $D_{50}$  disminuyeron desde 19,27 a 10,37 minutos y para el ZnG desde 65,36 a 10,80 minutos.

9. Al final del almacenamiento refrigerado (28 días, 5°C), se observó que las células supervivientes de *S. cerevisiae* en las muestras de ZnN y de ZnG tratadas por combinación de US y AEC (a la concentración aceptada sensorialmente de 20 mg/L) a 50°C (30 minutos) disminuyeron significativamente  $1,55 \pm 0,19$  y  $0,68 \pm 0,16$  ciclos logarítmicos para el ZnN y el ZnG respectivamente.

10. Los tratamientos de sonicación (1 a 30 minutos) del ZnN a temperaturas inferiores a 46°C, mejoraron el contenido en compuestos bioactivos (fenoles totales, FT; flavonoides totales, FvT; carotenoides totales, CT) y la actividad antioxidante (AA) en función del tiempo de tratamiento, aumentando significativamente el índice de pardeamiento no enzimático (IP), y obteniéndose reducciones microbianas significativas según aumentaba la temperatura. Sin embargo, se observó un empeoramiento en los atributos sensoriales sabor y aroma a partir de los 20 minutos de tratamiento. El estudio de vida útil de las muestras sonicadas mostró que el US por sí sólo no tiene la capacidad de controlar la población microbiana de las muestras tratadas y almacenadas en condiciones de refrigeración (28 días, 5°C).

11. La metodología de superficie de respuesta (MSR) y el diseño Box-Behnken empleados para estudiar el efecto de la termosonicación y el AEC sobre los parámetros de calidad del ZnN y del ZnG han demostrado ser eficaces para modelar matemáticamente el efecto de la termosonicación y el AEC en la calidad de los zumos y en reducir al mínimo el número de experimentos requeridos para obtener conclusiones con significación estadística adecuada.

12. En general, los datos experimentales de los parámetros de calidad (FT; FvT; CT; antocianinas monoméricas totales, AMT; parámetros de color; pH; °Brix) del ZnN y del ZnG tratados se ajustaron bien ( $P < 0,05$ ;  $R^2_{aj} > 0,84$ ) a los modelos simplificados desarrollados a partir de los datos experimentales obtenidos.

13. Los parámetros de cada tratamiento de conservación optimizado (amplitud, concentración de aceite esencial y temperatura) dependerán del tipo de zumo, de sus propiedades físico-químicas, de su composición en compuestos bioactivos y de su población microbiana inicial.

14. En TSB, el AEC inhibió el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (CMI: 2631 mg/L; CPIs: 1300-325 mg/L; CMB: 10524 mg/L) y el de *L. monocytogenes* LM82 (CMI: 1300 mg/L; CPIs: 650-325 mg/L; CMB: 2631 mg/L). El AEL, no fue muy efectivo inhibiendo el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (CMI > 8529 mg/L; CPIs: 8500-266 mg/L; CMB > 8529 mg/L) pero sí el de *L. monocytogenes* LM82 (CMI: 4200 mg/L; CPIs: 2125-266 mg/L; CMB: 2631 mg/L). El limoneno inhibió el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297 (CMI: 4200 mg/L; CPIs: 2100-260 mg/L; CMB: > 8400 mg/L) y el de *L. monocytogenes* LM82 (CMI: 8400 mg/L; CPIs: 4200-260 mg/L; CMB: >8400 mg/L). El AEC fue el antimicrobiano más efectivo y *L. monocytogenes* LM82 la bacteria más sensible, excepto para el componente limoneno del que se necesitó una menor concentración para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 5297.

15. La mayor inactivación de *E. coli* O157:H7 5297 y *L. monocytogenes* LM82 se obtuvo en las muestras de ZnM tratadas por combinación de US y AEC (a la concentración aceptada sensorialmente de 20 mg/L) a 40°C durante 5 minutos, obteniéndose  $0,87 \pm 0,07$  y  $5,39 \pm 0,17$  reducciones logarítmicas para *L. monocytogenes* LM82 y *E. coli* O157:H7 5297 respectivamente.

16. A partir del día 15 de almacenamiento refrigerado (29 días, 8°C), no se obtuvieron recuentos de células viables para *E. coli* O157:H7 5297 en las muestras de ZnM tratadas por combinación de US y AEC (a la concentración aceptada sensorialmente de 20 ppm) a 40°C durante 5 minutos.

17. Durante el almacenamiento refrigerado (29 días, 8°C) la población de *L. monocytogenes* LM82 se mantuvo sin diferencias significativas en las diferentes muestras de ZnM tratadas, aunque la menor población estaba en la muestra tratada con combinación de AEC y US a 40°C durante 5 minutos. Los factores estudiados y su combinación podrían tener un efecto sinérgico en la inactivación de ambas bacterias y en su supervivencia en condiciones de refrigeración.



## BIBLIOGRAFÍA

Aadil, R.M., Zeng, X.A., Han, Z., Sun, D.W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3), 3201–3206.

Abdelhady, M.I., Aly, H.A.H. (2012). Antioxidant antimicrobial activities of *Callistemon comboynensis* essential oil. *Free Radical Antioxidants*, 2(1), 37–41.

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M.M., Wu, T., Lei, S., Khan, M.A., Zeng, X. (2014a). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 984-990.

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M.M., Wu, T., Wu, Z., Khan, M.A., Zeng, X. (2014b). Synergistic impact of sonication and high hydrostatic pressure on microbial and enzymatic inactivation of apple juice. *LWT-Food Science & Technology*, 59(1), 70–76.

Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M.M., Hu, B., Lei, S., Zeng, X., Zeng, X. (2014c). Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 93–97.

Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M.M., Hu, B., Lei, S., Zhang, X., Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1182–1187.

Adekunte, A.O., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Scannell, A.G.M., O'Donnell, C.P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500–507.

Aguilar-Rosas, S.F., Ballinas-Casarrubias, M.L., Nevarez-Moorillon, G.V., Martin-Belloso, O., Ortega-Rivas, E. (2007). Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 41–46.

Aguirre, A., Borneo, R., León, A.E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2–9.

Ait-Ouazzou, A., Espina, L., García-Gonzalo, D., Pagán, R. (2013). Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. *Food Control*, 32(1), 159-167.

Al-Bayati, F.A., Mohammed, M.J. (2009). Isolation, identification, and purification of cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark oil. An antibacterial study. *Pharmaceutical Biology*, 47(1), 61–66.

Alighourchi, H., Barzegar, M., Sahari, M.A., Abbasi, S. (2014). The effects of sonication and gamma irradiation on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in pomegranate juice. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(1), 51-58.

Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168–4170.

Álvarez, I., Mañas, P., Virto, R., Condón, S. (2006). Inactivation of *Salmonella senftenberg* 775W by ultrasonic waves under pressure at different water activities. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 218–225.

Alzamora, S.M., Guerrero, S.N., Schenk, M., Raffellini, S., López-Malo, A. (2011). Inactivation of Microorganisms. In: Hao Feng, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Jochen Weiss (ed) *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, pp 321-345. Springer. ISSN:1571-0297.

Al-Zoreky, N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244–248.

AOAC, 1995. Vitamin C (Ascorbic acid) in vitamins preparations and juices: 2,6-dichloroindophenol titrimetric method. In: *Official Methods of Analysis of AOAC Int.*, vol. 4, 16th ed., pp. 16–17.

Arques, J.L., Rodriguez, E., Nunez, M., Medina, M. (2008). Inactivation of gramnegative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, 227(1), 77–82.

Arrebola, M.L., Navarro, M.C., Jiménez, J., Ocaña, F.A. (1994). Yield and composition of the essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides*. *Phytochemistry*, 36(1), 67–72.

Aronsson, K., Rönner, U. (2001). Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(2), 105–112.

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkh, K., Versteeg, C.K. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 155–160.

Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., Youssef, M.M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410–427.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.

Bang, K.H., Lee, D.W., Park, H.M., Rhee, Y.H. (2000). Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by transcinnamaldehyde. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 1061–1063.

Basak, S., Ramaswamy, H.S., Piette, J.P.G. (2002). High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(3), 223–231.

Baumann, A.R., Martin, S.E., Feng, H. (2005). Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider. *Journal of Food Protection*, 68(11), 2333–2340.

Baumann, A.R., Martin, S.E., Hao, F. (2009). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of Food Protection*, 72(6), 1306–1309.

Beckett, S.T. (1999). Non-conventional machines and processes. *Industrial chocolate manufacture and use*, 385–408.

Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., Remmal, A. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 454–458.

Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G.V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 383–392.

Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. (2010). Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*, 21(2), 172–177.

Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., Corbo, M.R. (2013). Ultrasound and antimicrobial compounds: a suitable way to control *Fusarium oxysporum* in juices. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1153-1163.

Bevilacqua, A., Speranza, B., Campaniello, D., Sinigaglia, M., Corbo, M.R. (2014). Inactivation of spoiling yeasts of fruit juices by pulsed ultrasound. *Food and Bioprocess Technology*, 7(8), 2189-2197.

Bhat, R., Kamaruddin, N.S.B.C., Minutos-Tze, L., Karim, A.A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1295–1300.

Blois, M.S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Bowman, S.M., Free, S.J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808.

Brewer, M.S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.

Brul, S., Coote, P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 1–17.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223– 253.

Burt, S. A., Der Zee, R. V., Koets, A. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4484–4490.

Butz, P., Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35(2-3), 279–284.

Cameron, M., McMaster, L.D., Britz, T.J. (2008). Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6), 960–964.

Cava-Roda, R.M., Taboada, A., Palop, A., López-Gómez, A., Marin-Iniesta, F. (2012a). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 314–318.

Cava-Roda, R.M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M.T., Marín-Iniesta, F. (2012b). 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(6), 2120–2131.

Cavalieri, F., Ashokkumar, M., Grieser, F., Caruso, F. (2008). Ultrasonic synthesis of stable, functional lysozyme microbubbles. *Langmuir*, 24(18), 10078–10083.

Ceylan, E., Fung, D.Y.C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12(1), 1–55.

Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing - Food quality assurance and food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 26(2), 88–98.

Chanthaphon, S., Chanthachum, S., Hongpattarakere, T. (2008). Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 125–131.

Char, C.D., Mitilinaki, E., Guerrero S.N., Alzadora, S.M. (2010). Use of high-intensity ultrasound and UV-C light to inactivate some microorganisms in fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 797–803.



Chemat, F., Zill-e-Huma, F., Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835.

Chen, D. (2012). Applications of ultrasound in water and wastewater treatment. In: Chen D, Sharma SK, Mudhoo A (eds) *Handbook on application of ultrasound: sonochemistry for sustainability*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Cheng, L.H., Soh, C.Y., Liew, S.C., Teh, F.F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104(4), 1396–1401.

Chowdhury, P., Viraraghavan, T. (2009). Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes—a review. *Science Total Environmental*, 407, 2474–2492.

Ciccolini, L., Taillandier, P., Wilhem, A.M., Delmas, H., Strehaiano, P. (1997). Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: Effect of temperature and of ultrasonic power. *Chemical Engineering Journal*, 65(2), 145–149.

Cliff, M., Dever, M.C., Gayton, R. (1991). Juice extraction process and apple cultivar influences on juice properties. *Journal of Food Science*, 56(6), 1614–1617.

Cooper, D.A. (2004). Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition*, 134(1), 221S-224S.

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.

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 *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170–175.

D'amico, D.J., Silk, T.M., Wu, J., Guo, M. (2006). Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 69(3), 556–63.

Darvishi, E., Omid, M., Bushehri, A.A.S., Golshani, A., Smith, M.L. (2013). The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. *PLoS ONE*, 8(10), e76028-e76037.

Destailats, H., Hoffmann, M.R., Wallace, H.C. (2003). Sonochemical degradation of pollutants. In: Tarr MA (ed) *Chemical degradation methods for wastes and pollutants. Environmental and industrial applications*. Marcel Dekker, Inc., USA

Dolatowski, Z.J., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6(3), 89-99.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.

Dubrović I., Herceg Z., Režek Jambrak A., Badanjak M., Dragović-Uzelac V. (2011). Effect of high intensity ultrasound and pasteurization on anthocyanin content in strawberry juice. *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 196 - 204.

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A.M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Review*, 13, 79–106.

Earnshaw, R.G. (1998). Ultrasound: A new opportunity for food preservation. *Ultrasound in food processing*, 183.

Earnshaw, R., Appleyard, J., Hurst, R. (1995). Understanding physical inactivation processes: Combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 197–219.

Espina, L., Gelaw, T.K., de Lamo-Castellví, S., Pagán, R., García-Gonzalo, D. (2013). Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. *PLOS ONE*, 8(2), e56769-e56769.

Espina, L., Somolinos, M., Ait Ouazzou, A., Condón, S., García-Gonzalo, D., Pagán, R. (2012). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 9–16.

Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R. (2011). Chemical composition of comercial citrus fruit essential oils and evaluation oh their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896-902.

Feng, H., Yang, W., Hielscher, T. (2008). Power Ultrasound. *Food Science and Technology International*, 14(5), 0433–436.

Ferrante, S., Guerrero, S., Alzadora, S.M. (2007). Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1850–1856.

Ferrario, M., Alzamora, S.M., Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, 46, 635-642.

Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156-164.

Floros, J.D., Liang, H. (1994). Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology*, 48(12), 79–84.

Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., López-Malo, A., Palou; E. (2015). Estimation of *Listeria monocytogenes* survival during thermoultrasonic treatments in non-isothermal conditions: Effect of ultrasound on temperature and survival profiles. *Food Microbiology*, 52, 124-130.

Friedman, M. (2006). Antibiotic activities of plant compounds against non-resistant and antibiotic resistant foodborne human pathogens. In: Juneja VK, Cherry JP, Tunick MH, editors. *Advances in microbial food safety ACS Symposium Series*. Washington, DC: American Chemical Society. p 167–83.

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 Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 6042–6048.

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(10), 1545–1560.

Fu, Q., Zhang, L., Cheng, N., Jia, M., Zhang, Y. (2014). Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 321-327.

Fustier, P., St-Germain, F., Lamarche, F. Mondor, M. (2011). Non-enzymatic browning and ascorbic acid degradation of orange juice subjected to electroreduction and electro-oxidation treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(4), 491–498.

Gabriel, A.A. (2012). Microbial inactivation in cloudy apple juice by multi-frequency Dynashock power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 346–351.

Gabriel, A.A. (2014). Inactivation behaviors of foodborne microorganisms in multi-frequency power ultrasound-treated orange juice. *Food Control*, 46, 189-196

Gabriel, A.A. (2015). Combinations of selected physical and chemical hurdles to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple and orange juices. *Food Control* 50, 722-728

Gabriel, A.A., Nakano, H. (2010). Responses of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c and *Salmonella enteritidis* to pH, aw and temperature stress combinations. *Food Control*, 21, 644–650.

Galanakis, C.M. (2013). Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 575–579.

García-Alonso, F.J. (2005). Tesis Doctoral Europea. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Universidad de Murcia.

García, M.L., Burgos, J., Sanz, B., Ordoñez, J.A. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(6), 619–628.

García Pérez, J.V. (2007). Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

García-Viguera, C., Bridle, P. (1999). Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 64(1), 21-26.

Gardner, P.T., White, T.A.C., McPhail, D.B., Duthie, G.G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68(4), 471–474.

Gastélum, G.G., Avila-Sosa, R., López-Malo, A., Palou, E. (2012). *Listeria innocua* multi-target inactivation by thermo-sonication and vanillin. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 665-671.

Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., Caristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* 12(8), 1641–1673.

Geerard, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209.

Geerard, 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(1), 95-105.

Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589.

Gill, A.O., Holley, R.A. (2004). Mechanism of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied Environmental Microbiology*, 70(10), 5750–5755.

Gill, A.O., Holley, R.A. (2006a). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 1–9.

Gill, A.O., Holley, R.A. (2006b). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 170–174.

Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2005). Unit F1.2: characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith, & P. Sporns (Eds.), Handbook of food analytical chemistry (pp. 19–31). New York: John Wiley & Sons.

Gogate, P.R., Pandit, A.B. (2011a). Sonocrystallization and its application in food and bioprocessing. In: H. Feng, G. Barbosa-Canovas, & J. Weiss (Eds.), Ultrasound technologies for food and bioprocessing (pp. 467–493). New York: Springer.

Gogate, P.R., Sutkar, V.S., Pandit, A.B. (2011b). Sonochemical reactors: Important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems. *Chemical Engineering Journal*, 166(3), 1066–1082.

Gogate, P.R., Tayal, R. K., Pandit, A.B. (2006). Cavitation: A technology on the horizon. *Current Science*, 91(1), 35–46.

Goh, E.L.C., Hocking, A.D., Stewart, C.M. Buckle, K.A., Fleet, G.H. (2007) Baroprotective effect of increased solute concentrations on yeast and moulds during high pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(4), 535-542.

Gómez, P.L., Welti-Chanes, J., Alzamora, S.M. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 447–465.

Gómez-Caravaca, A.M., Verardo, V., Toselli, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Caboni, M.F. (2013). Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC–DAD–ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5328–5337

Gómez-López, V.M., Orsolani, L., Martínez-Yépez, A., Tapia, M.S. (2010). Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *LWT-Food Science & Technology*, 43(5), 808–813.

González-Centeno, M.R., Knoerzer K., Sabarez H., Simal S., Rosselló C., Femenia A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176-2184.

Guerrero, S., López-Malo, A., Alzamora, S.M. (2001a). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(1), 31-39.

Guerrero, S., Tognon, M., Alzamora, S.M. (2001b). 'Ultrasound and natural antimicrobials: inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by the combined treatment'. Institute of Food Technologists Annual Meeting, New Orleans, USA.

Guerrero, S., Tognon, M., Alzamora, S.M. (2005). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16(2), 131–139.

Guerrouj, K., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R.M., Marín-Iniesta, F. (2016). Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioprocess Processing*, 99, 20-28.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2009) Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components, *Food Microbiology*, 26(2), 142–150.

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(s1), 78-141.

Hensel, M., Achmus, H., Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K. (1996). The ATP synthase of *Streptomyces lividans*: characterization and purification of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> complex. *Biochimica and Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1274(3), 101–108.

Hernández, F., Melgarejo, P., Tomás-Barberán, F.A., Artés, F. (1999). Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *European Food Research and Technology*, 210(1), 39–42.

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(12), 2379-2383.

Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S. (1995). Flavonoid

intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155(4), 381-386.

Higaki, K., Ueno, S., Koyano, T., Sato, K. (2001). Effects of ultrasonic irradiation on crystallization behavior of tripalmitoylglycerol and cocoa butter. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(5), 513–518.

Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Wu, T., Hashim, M.M., Lei, S., Zhu, X., Zeng, X. (2014). Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. *LWT-Food Science & Technology*, 55(1), 16–21.

Jaiswal, V., DerMarderosian, A., Porter, J.R. (2009). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry*, 118(1), 11–16.

Jayasooriya, S.D., Bhandari, B.R., Torley, P., D'Arcy, B.R. (2004). Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. *International Journal of Food Protection*, 7(2), 301-319.

Jezler, C.N., Batista, R.S., Alves, P.B., Silva, D.D.C., Costa, L.C.D.B. (2013). Histochemistry, content and chemical composition of essential oil in different organs of *Alpinia zerumbet*. *Ciência Rural*, 43(10), 1811–1816.

Jin, P., Wang, S.Y., Gao, H., Chen, H., Zheng, Y., Wang, C.Y. (2012). Effect of cultural system and essential oil treatment on antioxidant capacity in raspberries. *Food Chemistry*, 132(1), 399–405.

Kabasakalis, V., Siopidou, D., Moshatou, E. (2000). Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70(3), 325–328.

Kalemba, D., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(18), 813-829.

Keenan, D.F., Tiwari, B.K., Patras, A., Gormley, R., Butler, F., Brunton, N.P. (2012). Effect of sonication on the bioactive, quality and rheological characteristics of fruit smoothies. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(4), 827–836.

Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro



and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 107, 1710–1716

Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187–192.

Khandpur, P., Gogate, P.R. (2015). Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 125–136.

Kim, T.J., Silva, J.L., Chamul, R.S., Ma, S.X. (2001). Use of continuous high-frequency ultrasound to ‘pasteurize’ orange juice, Abstract 101-3, presented at the IFT Annual Meeting, New Orleans, LA.

King, G.A., Sweeny, J.G., Radford, T. Iacobucci, G.A. (1980). The ascorbic acid-oxygen degradation of anthocyanidins. *Bull. Liaison-Groupe Polyphenols*, 9(0), 121-128.

Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I., Pavela, R. (2012). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International*, 47(2), 161–165.

Knobloch, K., Pauli, P., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 603–608.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15(5), 261–266.

Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., Vanek, T. (2002). Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 51–3.

Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P. W., Cabib, E. (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1170-1178.

Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17762-17775.

Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega. pp 515.

Kuldiloke, J. (2002). Thesis: "Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices". Institute of Food Technology. Food Biotechnology and Process Technology. Berlin University of Technology.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E. (2001). A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–62.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E., Giardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3-4), 201–208.

Lee, H., Kim, H., Cadwallader, K.R., Feng, H., Martin, S.E. (2013). Sonication in combination with heat and low pressure as an alternative pasteurization treatment—Effect on *Escherichia coli* K12 inactivation and quality of apple cider. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1131–1138.

Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H., Martin, S.E. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93(3), 354-364.

Lesage, G., Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 317-343.

Liao, H., Sun, Y., Ni, Y., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Chen, F. (2007). The effect of enzymatic mash treatment, pressing, centrifugation, homogenization, deaeration, sterilization and storage on carrot juice. *Journal of Food Process Engineering*, 30(4), 421-435.

Li, X., Wasila, H., Liu, L., Yuan, T., Gao, Z., Zhao, B., Ahmad, I. (2015). Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chemistry*, 175, 575–584.

Lipke, P.N., Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735-3740.

Lis-Balchin, M., Deans, S.G., Eaglesham, E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2), 98–104.

López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6939-6946.

López-Malo, A., Guerrero, S., Alzamora, S.M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* thermal inactivation kinetics combined with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 62(10), 1215–1217.

López-Malo, A., Guerrero, S.N., Santiesteban, A. Alzamora, S.M. (2005a). Inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* and *Listeria monocytogenes* in apple juice processed by novel technologies. In: proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. CD-ROM, E-papers. Servicios Editoriais. Available at: <http://www.e-papers.com.br>. 20.

López-Malo, A., Palou, E., Jiménez-Fernández, M., Alzamora, S.M., Guerrero, S. (2005b). Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 87–93.

López-Rubira, V., Conesa, A., Allende, A., Artés, F. (2005). Shelf-life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C. *Postharvest Biology and Technology*, 37(2), 174–185.

Loureiro, V. (2000). Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, 33(3-4), 247-256.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. (2003) SPOILAGE/Yeasts in Spoilage. Elsevier Science Ltd. 5530-5537.

Loureiro, V., Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 10(11), 356-365.

Luo, H., Schmid, F., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 415-420.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard S., Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 107-113.

Mañas, P., Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1387–1399.

Marín, F.R., Martínez, M., Uribealago, T., Castillo, S., Frutos, M.J. (2002). Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chemistry*, 78(3), 319-324.

Marx, G., Moody, A., Bermúdez-Aguirre, D. (2011). A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 327–337.

Mason, T.J. (1998). Power ultrasound in food processing-the way forward. M.J.W. Povey, T. Mason (Eds.), *Ultrasonics in Food Processing*, Blackie Academic and Professional, London.

Mason, T.J. (1991). Practical sonochemistry: user's guide to application in chemistry and chemical engineering, 22–25. Ellis Horwood, UK, pp. 1-150.

Mason, J., Chemat, F., Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237–247.

Mason, T.J. Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S253-S260.

McClements, D.J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 6(9), 293-299.

Moody, A., Marx, G., Swanson, B.G., Bermúdez-Aguirre, D. (2014). A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound. *Food Control*, 37, 305-314

Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., Khodaparast, M.H.H. (2009). Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*, 115(4), 1274–1278.

Muñoz, A., Caminiti, I.M., Palgan, I., Pataro, G., Noci, F., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Whyte, P., Ferrari, G., Lyng, J.G. (2012). Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Research International*, 45(1), 299–305.

Muthukumaran, S., Kentish, S.E., Stevens, G.W., Ashokkumar, M. (2006). Application of ultrasound in membrane separation processes: A review. *Reviews in Chemical Engineering*, 22(3), 155–194.

Nanasombat, S., Wimuttigosol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 45-53.

Nagy, S., Smoot, J.M. (1977). Temperature and storage effects on percent retention and percent U.S. recommended dietary allowance of vitamin C in canned single strength orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(1), 135–138.

Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S.A., Sayeed, S.A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, 72(9), M341-M345.

Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, D. R., Schieber, A., Carle, R., Simons, L., Bitsch, I., Bitsch, R., Konczak, I. (2007). Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(3), 365-372.

Nuncio-Jáuregui, N.; Calín-Sánchez, Á.; Vázquez-Araujo, L.; Pérez-López, A.J.; Frutos-Fernández, M.J.; Carbonell-Barrachina, Á.A. (2015). Processing pomegranates

for juice and impact on bioactive components. In: Processing and Impact on Active Components in Food; Elsevier: London, UK, Chapter 76. pp. 629–636.

Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. (2003). Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller S, editor. Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Washington, D.C.: CRC Press. p 177–99.

Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry, 120, 308–312.

Opara, L.U., Al-Ani, M.R., Al-Shuaibi, Y.S. (2009). Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). Food and Bioprocess Technology, 2(3), 315–321

Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall formation. Micron, 29 (2-3), 207-233.

Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M. (2006). Mechanism of action Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membrane and walls of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 69, 1046–1055.

Pagán, R., Mañas, P., Raso, J., Condón, S. (1999) Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 65(1), 297–300.

Palgan, I., Caminiti, I.M., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Lyng, J.G. (2011). Combined effect of selected non-thermal technologies on *Escherichia coli* and *Pichia fermentans* inactivation in an apple and cranberry juice blend and on product shelf life. International Journal of Food Microbiology, 151, 1–6.

Pang, Y.L., Abdullah, A.Z., Bhatia, S. (2011). Review on sonochemical methods in the presence of catalysts and chemical additives for treatment of organic pollutants in wastewater. Desalination, 277, 1–14.

Park, I.K., Kang, D.H. (2013). Effect of electroporation by ohmic heating for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar

*typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7122–7129.

Patist, A. Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 147–154

Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C., Tiwari, B.K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21(1), 3–11.

Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S.L.S., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E. (2009). Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiolog*, 136(1), 26–31.

Pauli, A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, 11(3), 126-133.

Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74(7) 379-383.

Peleg, M. (2000). Microbial survival curves. The reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International*, 33(7), 531-538.

Peleg, M., Cole, M.B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(5), 353-380.

Pelissari, F.M., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F., Pineda, E.A.G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7499–7504.

Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312.

Petrier, C., Combet, E., Mason, T. (2007). Oxygen-induced concurrent ultrasonic degradation of volatile and non-volatile aromatic compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(2), 117–121.

Phull, S.S., Newman, A.P., Lorimer, J.P., Pollet, B., Mason, T.J. (1997). The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4, 157–164.

Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216.

Polydera, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60(1), 21-29.

Polydera, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2005). Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chemistry*, 91(3), 495-503.

Portenlänger, G., Heusinger, H. (1992). Chemical reactions induced by ultrasound and  $\gamma$ -rays in aqueous solutions of L-ascorbic acid. *Carbohydrate Research*, 232(2), 291–301.

Poyrazoglu, E., Gökmen, V., Nevzat, A. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J. Food Comp. Anal.* 15, 567–575.

Prakash, B., Singh, P., Mishra, P.K., Dubey, N.K. (2012). Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 183–191.

Praphailong, W., Fleet, G.H. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 14(5), 459–468.

Proestos, C., Boziaris, I., Kapsokefalou, S. M., Komaitis, M. (2008). Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 151–156.



Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K., Oksman-Caldentey, K.M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 991–1000.

Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia A., Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494-507.

Qu, W., Pan, Z., Ma, H. (2010). Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*, 99(1), 16–23.

Ranasinghe, L., Jayawardena, B., Abeywickrama, K. (2002). Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*, 35(3), 208–211.

Raso, J., Barbosa-Cánovas, G.V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 265–285.

Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J. (1998a) Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 465–471.

Raso, J., Palop, A., Pagán, R., Condón, S. (1998b) Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 849–854.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O. (2006). Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 69, 1579–1586.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157–180.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O. (2008a). Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf life and safety of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 313–327.

Raybaudi-Massilia, R.M., Rojas-Graü, M.A., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O. (2008b). 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.

Rawson, A., Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P.J., O'Donnell, C. (2011). Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, 44(5), 1168–1173.

Reddy M.K., Gupta S.K., Jacob M.R., Khan S.I., Ferreira D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannins-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Medica*, 73(5), 461-467.

Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., López-Malo, A. (2015). Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 275–297.

Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G. (2008). Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. *Food Chemistry*, 109(2), 402–407.

Riesz, P., Kondo, T. (1992). Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 13(3), 247–270.

Rivas-Soler, A. (2012). Tesis Doctoral. Aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad en una bebida mezcla de zumo de naranja y leche: efectos sobre *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, componentes nutricionales y calidad. Universidad Politécnica de Valencia.

Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., Pan, Z., McHugh, T.H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81, 634–641.

Rupasinghe, H.P.V., Yu, L.J. (2012). Emerging preservation methods for fruit juices and beverages. In: Food Additive, Yehia El-Samragy (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/food-additive/emerging-preservation-methods-3-for-fruit-juices-and-beverages>

Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(12), 1461–1471.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89(4), 569–575.

Sala, F.J., Burgos, J., Condón, S., López, P., Raso, J. (1995) Effect of Heat and Ultrasound on Microorganisms and Enzymes. In: GW Gould (ed) *New Methods of Food Preservation*, pp 176–204.

Salleh-Mack, S.Z., Roberts, J.S. (2007). Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(3), 323–329.

Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R.M., López-Gómez, A., Marín-Iniesta, F. (2016). Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. *LWT- Food Science and Technology*. 73, 140-146.

Santhirasegaram, V., Razali, Z., Somasundram, C. (2013). Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1276–1282.

Schmidt, E., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Eller, G.A., Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Geissler, M. (2006). Composition and antioxidant activities of the essential oil of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) leaves from Sri Lanka. *Journal of essential oil- bearing plants*, 9(2), 170 – 182.

Scouten, A.J., Beuchat, L.R. (2002). Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 668-674.

Settanni, L., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., Germanà, M.A. (2012). Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, 26, 326-330.

Seymour, I.J., Burfoot, D., Smith, R.L., Cox, L.A., Lockwood, A. (2002). Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(5), 547-557.

Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Review*, 59, 201–222.

Silva, F. G., Oliveira, C. B. A., Pinto, J. E. B. P., Nascimento, V. E., Santos, S. C., Seraphin, J. C., Ferri, P.H. (2007). Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18, 990–997.

Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P.K., Dubey, N.K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1734–1740.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Skocibusic, M., Bezic, N., Dunkic, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry*, 96(1), 20–28.

Smits, G.J., van den Ende, H., Klis, F.M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 147(4), 781–794.

Sondheimer, E. Kertesz, Z.I. (1953) Participation of ascorbic acid in the destruction of anthocyanins in strawberry juice and model systems. *Food Research*, 18(1-6), 475-479.

Soria, A.C., Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323-331.

Souza, E.L., Lima, E.O., Luna Freire, K.R., Sousa, C.P. (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 245-250.

Starr, M.S. Francis, F.J. (1968). Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice. *Food Technology*, 22, 1293–1295.

Stinco, C.M., Baroni, M.V., Di Paola Naranjo, R.D., Wunderlin, D.A., Heredia, F.J., Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. (2015). Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 1–10.

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(4), 665–674.

Sukatta, U., Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, W., Dilokkunanant, 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.

Suslick, K.S. (1988). *Ultrasounds: Its Chemical Physical and Biological Effects*. VHC Publishers, New York.

Sutkar, V.S., Gogate, P.R. (2009). Design aspects of sonochemical reactors: Techniques for understanding cavitation activity distribution and effect of operating parameters. *Chemical Engineering Journal*, 155(1-2), 26–36.

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.

TehraniFar, A., Selahvarzia, Y., Kharrazia, M., Bakhshb, V.J. (2011). High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1523– 1527.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops Productions*, 43, 587–595.

Thangavadivel, K., Megharaj, M., Mudhoo, A., Naidu, R. (2012). Degradation of organic pollutants using ultrasound. In: Chen D, Sharma SK, Mudhoo A (eds) *Handbook on application of ultrasound: sonochemistry for sustainability*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Thompson, L.H., Doraiswamy, L.K. (1999). Sonochemistry: Science and engineering. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 38(4), 1215–1249.

Timberlake, C.F. (1960a). Metallic components of fruit juices. III.- Oxidation and stability of ascorbic acid in model systems resembling blackcurrant Juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 11(5), 258-268.

Timberlake, C.F. (1960b) Metallic components of fruit juices: IV. Oxidation and stability of ascorbic acid in blackcurrant juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 11(5), 268-273.

Tiwari, B.K., Mason, T.J. (2012). Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. In: P.J. Cullen, B.K. Tiwari, V.P. Valdramidis (Eds.), London: Academic Press.

Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2008a). Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT - Food Science & Technology*, 41(10), 1876–1883.

Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2008b). Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2423–2428.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2009a). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 137-145.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J. (2009b). Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 166–171.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Cullen, P.J. (2008c). Effect of sonication on orange juice quality parameters during storage. *International Journal of Food Science and Technology*. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01858.x.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Cullen, P.J. (2009c). Effect of low temperature sonication on orange juice quality parameters using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 109–114.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J. (2009d). Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. *European Food Research and Technology*, 228(5), 717–724.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Patras, A., Cullen, P.J. (2008d). Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10071–10077.

Tiwari, B.K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(3), 598–604.

Tongnuanchan, P., Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231-R1249.

Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23(7), 684-688.

Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A. Bandler, R. (1998). Yeasts, Molds and Mycotoxins. In: *Bacteriological Analytical Manual*, 8th edn (edited by R.I. Merker). Revision A. Chapter 18. Silver Spring, MD, USA: FDA. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm>

Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvolgyi, 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(3), 480–486.

Tudor, E.A., Board, R.G. (1993). Food-spoilage yeasts. En: Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds.), *The Yeasts*, vol.5, *Yeast Technology*, 2<sup>a</sup> ed., Academic Press, Londres, pp. 435-516.

Türkyılmaz, M., Tağ, Ş., Dereli, U., Özkan, M. (2013). Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1810–1818.

Türkyılmaz, M., Özkan, M. (2014). Effects of condensed tannins on anthocyanins and colour of authentic pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Food Chemistry* 164(1), 324–331.

Turgis, M., Han, J., Caillet, S., Lacroix, M. (2009). Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20, 1073–1079.

Tzortzakis, N.G. (2009). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(1), 97–102.

Ugarte, E., Feng H., Martin, E.S., Cadwallader K.R. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* with power ultrasound in apple cider. *Journal of Food Science*, 71(2), E102–E108.

Ugarte, E., Feng H., Martin, E.S. (2007). Inactivation of *Shigella* and *Listeria monocytogenes* with power ultrasound at sub-lethal and lethal temperatures. *Journal of Food Science*, 72(4), M103–M107.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 4606–4610.

Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G.V., Zeytinoglu, H.S., Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3274–3280.

US Food and Drug Administration. (1998). Hazard analysis and critical control points (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice. *Fed. Regist.* 63:20450–20486.

Vajnhandl, S., Marechal, A.M.L. (2005) Ultrasound in textile dyeing and the decolourization/mineralization of textile dyes. *Dyes Pigments*, 65, 89–101.



Valdramidis, V.P., Cullen, P.J., Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P. (2010). Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 449–454.

Varela-Santos, E., Ochoa-Martínez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J.E., Pérez-Won, M., Briones-Labarca, V., Morales-Castro, J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 13–22.

Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Munoz, N., Marti, N., Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 509–516.

Valverde, M.T., Marín-Iniesta, F., Calvo, L. (2010). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 421–428.

Vázquez-Araújo, L., Chambers IV, E., Adhikari, K., and Carbonell-Barrachina, Á.A. (2010). Sensory and physicochemical characterization of juices made with pomegranate and blueberries, blackberries, or raspberries. *Journal of Food Science*, 75(7), S398-S404.

Velázquez-Estrada, R.M., Hernández-Herrero, M.M., Rüfer, C.E., Guamis-López, B., Roig-Sagués, A.X. (2013). Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 89–94.

Veldhuizen, E.J.A., Tjeerdma-van Bokhoven, J.L.M., Zweijtzer, C., Burt, S.A., Haagsman, H.P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1874–9.

Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, C.L.M. (2000). Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *Journal of Food Engineering*, 43(1), 1-7.

Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635-654.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. (2008). Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety*, 28(4), 567–576.

Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J. (2009) Shelf life and sensory evaluation of orange juice after exposure to thermosonication and pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 87(2), 102–107.

Wang, J., Hu, X., Wang, Z. (2010). Kinetics models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM14558T and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM3922T in apple juice by ultrasound. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 177-181.

Wang, S.Y., Chen, P.F., Chang, S.T. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96(7), 813–818.

Wang, C.Y., Wang, S.Y., Yin, J.J., Parry, J., Yu, L.L. (2007). Enhancing antioxidant, antiproliferation, and free radical scavenging activities in strawberries with essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6527–6532.

Wendakoon, C.N., Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58, 280–283.

Wordon, B.A., Mortimer, B., McMaster, L.D. (2012). Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Research International*, 47(2), 134–139.

Wu, T.Y., Guo, N., Tech, C.Y., Hay, J.X.W. (2013). Theory and fundamentals of ultrasound. In: *Advances in ultrasound technology for environmental remediation*. SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability, DOI: 10.1007/978-94-007-5533-8\_2.

Yen, T.B., Chang, S.T. (2008). Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 99(1), 232–236.

Zafra-Rojas, Q.Y., Cruz-Cansino, N., Ramirez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sanchez, J., Alanis-Garcia, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1283–1288.

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 675-683.

Zerdin, K., Rooney, M. L., Vermue, J. (2003). The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chemistry*, 82(3), 387–395.

Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., Hu, X. (2006). Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (*all-E*)-astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8346–8351.

Zheng, L., Sun, D.W. (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes – a review. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 16-23.

Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M., Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M.J., Saraiva, J.A., Patras, A., Tiwari, B., Barba, F.J. (2015). Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. *Food Research International*, 77(4), 743-752.

## **ANEXO: ARTÍCULOS**



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Food and Bioproducts Processing

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fbp](http://www.elsevier.com/locate/fbp)

 IChemE ADVANCING CHEMICAL ENGINEERING WORLDWIDE


# Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice

Kamal Guerrouj<sup>a</sup>, Marta Sánchez-Rubio<sup>b</sup>, Amaury Taboada-Rodríguez<sup>c</sup>, Rita María Cava-Roda<sup>c</sup>, Fulgencio Marín-Iniesta<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut Supérieur des Professions Infirmières et des Techniques de Santé, 32000 Al Hoceima, Morocco

<sup>b</sup> Grupo de Biotecnología de Alimentos (Food Biotechnology Group), Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

<sup>c</sup> Desarrollos Bio-Tecno Alimentarios SL, Virgen de las Maravillas 6, P01 B. 30009 Murcia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 March 2015

Received in revised form 16 March 2016

Accepted 17 March 2016

Available online 24 March 2016

## Keywords:

Orange juice

Sonication

Bioactive compounds

Antioxidants

Microorganisms

Shelf life

## ABSTRACT

Freshly squeezed orange juice was sonicated (for 1, 10, 20 and 30 min at 24 kHz frequency) to evaluate its impact on selected physico-chemical and antioxidant properties, such as total phenolics, flavonoids, DPPH radical scavenging activity, total carotenoids, ascorbic acid, pH, °Brix and color attributes. Additionally, the effects of sonication treatments on the microbial load (aerobic mesophilic, yeast and mold) were also evaluated. Sonication of juice samples for 10, 20 and 30 min during which the temperature rose to 43–45 °C showed enhancement in most of the bioactive compounds compared to samples treated for 1 min and control samples (untreated). Significant reductions in the microbial load corresponding to sonication time were also recorded. Results of the present study indicate that sonication coupled with mild temperatures may be employed as a suitable technique for orange juice processing, and may be applied to improve its safety and nutritional quality.

© 2016 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Processing methods play an important role in determining product quality, safety and shelf life of foodstuffs. It is well established that thermal processing technology assures the safety of food products with extended shelf life but it also causes losses in the beneficial nutrients. Thus, compared to other food preservation methods, heat has the important advantage of ensuring food safety and long preservation due to its destructive effect on enzymes and microorganisms. However, the non-specific effect of heat can cause reductions in nutritive and sensorial quality of foods and impairs their functional properties (Gómez et al., 2011).

These facts inspired the researchers all over the world to look for the most suitable innovative technique which gives a positive result with the application of little or no heat (Riener et al., 2008). Indeed, to avoid unwanted effects of heat, many attempts have been made to design alternative procedures for food preservation and sanitation. Some of the non-thermal technologies with potential to replace thermal processing of foods include membrane filtration, osmotic dehydration, pulse electric field, ultrasound, irradiation, high pressure, active packaging and ozone treatment (Cheng et al., 2007).

Ultrasound is an innovative emerging food processing technology that has shown important advances in food

\* Corresponding author. Tel.: +34 619 512000; fax: +34 868 884148.

E-mail address: [fmartin@um.es](mailto:fmartin@um.es) (F. Marín-Iniesta).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.03.007>

0960-3085/© 2016 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

processing in the last few years, and its application in food industry has been reviewed recently (González-Centeno et al., 2014). Ultrasound treatment had a high yield and low solvent consumption compared with other extraction methods and is a very economical method (Fu et al., 2014). Ultrasound assisted three phase partitioning has considerably increased the extraction yield of ursolic acid and oleanolic acid from *Ocimum sanctum* (Vetal et al., 2014).

Fruit juices could be easily consumed by infants, children and adults to meet their nutrient needs particularly that of micronutrients (Nnam and Njoku, 2005). Orange juice is the most widely produced and most popular fruit juice worldwide according to the United States Department of Agriculture (USDA, 2004). Orange juice is the predominant juice processed by the beverage industry worldwide. Citrus juices are the most popular fruit juices, accounting for greater than 50% of juice in the international commerce (Varnam and Sutherland, 1999).

The nutritional quality of orange juice is primarily related to the ascorbic acid content (Zerdin et al., 2003), in addition to phenolic acids and flavanones which are the two main groups of phenolic compounds in orange juices. Phenolic compounds are the secondary plant metabolites which play a considerable role in the development of characteristic color and flavor of fruit juices (Abid et al., 2014a). Polyphenols possess several biological properties and exhibit anticancer, antioxidant, antiviral and anti-inflammatory actions. However, cloudy juice processing technology affects the quality of the final product (Cliff et al., 1991) and especially loss of ascorbic acid (Nagy and Smoot, 1977). Kabasakalis et al. (2000) reported a 60–67% loss of ascorbic acid content in commercially processed orange juice and a 7–13% loss in fresh unprocessed orange juice during a refrigerated storage period of 31 days.

Thermosonication has been attempted as an alternative to thermal treatment for processing of fruit juices such as strawberry juice, blackberry juice and orange juice (Tiwari et al., 2008a, 2009).

Ultrasound processing of juices is reported to have a minimal effect on the degradation of key quality parameters in strawberry and blackberry juices (Tiwari et al., 2008a). Fu et al. (2014) showed that ultrasound treatment did not affect antioxidant capacity, likely because ultrasonic extraction is rapid. Many studies depicted that sonication treatment significantly enhanced the phenolic compounds, ascorbic acid, cloud value, DPPH free radical scavenging activity and total antioxidant capacity besides significant reduction in microbial population of fruits juices (Abid et al., 2013). The DPPH assay engrosses the reaction between a specific antioxidant with a stable free radical, such as that of DPPH, wherein reduction in the DPPH concentration caused by an antioxidant decreases the optical absorbance. It was reported that during storage at 10 °C sonicated juice was found to have higher retention of ascorbic acid compared to thermally processed and control samples (Tiwari et al., 2009).

The serious concern about unprocessed fruit juices is microbial contamination with acid-tolerant bacteria, fungi (yeasts and molds), and pathogenic bacteria, that leads to the deterioration of nutritional and sensorial properties such as functional ingredients, color, flavor, and odor, as well as food-borne diseases due to the pathogenic bacteria or toxigenic fungi (Tournas et al., 2006).

Sonication is a non-thermal method of food preservation that has the advantage of inactivating microorganisms in fruit juices without causing the common side-effects associated

with conventional heat treatments (Knorr et al., 2004; Tiwari et al., 2008a). It has been reported that power ultrasound is effective against food borne pathogens found in orange juice (Valero et al., 2007).

The aim of the study was to investigate the effect of sonication on natural microflora and bioactive compounds of natural orange juice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Orange juice preparation

Fresh oranges (*Citrus sinensis* cultivar Navelina) were purchased in a grocery store in Murcia, Spain. The oranges were washed with tap water, dried with paper towels and cut into two pieces.

Juice extractor of Solac (Citro new 100 W, Spain) was used to extract the juice which was then filtered through sterilized double layered muslin cloth. The freshly extracted juice was vortex mixed and selected as the control. The juice was divided into five different parts as control fresh sample and working samples subjected to sonication treatments.

### 2.2. Ultrasound treatment

Ultrasonic treatments (Salleh-Mack and Roberts, 2007; Jabbar et al., 2014) were carried out in a double-wall cylindrical vessel in which water was circulated with a thermostatic bath (Digiterm 100, PSelecta®). The thermostatic bath temperature was set to avoid the increasing of treated sample temperature above 46 °C. Temperatures before and after each treatment were recorded. Ultrasound (24 kHz; 105 μm; 33.31 W ml<sup>-1</sup>) was continuously applied with a UP200H ultrasonic processor (Hielscher Ultrasound Technology) using a S3 probe (Hielscher). The sonication treatments without temperature control consisted of a control sample (untreated) and four treated samples (1, 10, 20, 30 min) as shown in Table 1. Orange juice sample (30 ml) was taken in a 50 ml jacketed vessel through which water was circulated. The depth of the probe was kept 25 mm in the juice samples. The observed rise in temperature of the samples due to sonication was registered. Overheating of the samples (temperature measured by thermocouple with an accuracy ±0.5 °C) during the ultrasound treatment was prevented by circulating ice-water through the treatment chamber. The results were compared to the control sample (untreated). Each experimental condition was conducted in triplicate.

It was calculated the calorimetric energy dissipation according the equation of Gogate et al. (2011) modified:

$$P_{cal} = (mC_p \Delta T_a)_{liquid} + (m_i C_{pi} \Delta T_a)_{inner\ reactor\ wall} + (hA \Delta T_b \Delta t)$$

where  $m$  is mass of liquid (kg),  $m_i$  is the mass of reactor/transducers (kg),  $C_p$  is specific heat of liquid at constant pressure (J/kg K),  $C_{pi}$  is the specific heat of material of reactor (J/kg K),  $\Delta T_a$  is change in temperature (K) in the juice,  $h$  is convective heat transfer coefficient (W/m<sup>2</sup> K) and  $A$  is the area of heat transfer (m<sup>2</sup>),  $\Delta T_b$  is change in temperature (K) between juice and air,  $\Delta t$  is treatment time. It was taken into account that in laboratory scale operation with operating volume in the range of few ml, convective and conductive heat transfer hold little significance (Gogate et al., 2011; Sutkar and Gogate, 2009).

**Table 1 – Processing conditions used during ultrasound treatments.**

Samples	Time (min)	Initial temperature sample (°C)	Final temperature treated sample (°C)	Energy (kJ)	Calorimetric energy dissipation (kJ)
Control	–	25.0 ± 0.6	25.0 ± 0.6	–	–
A	1	25.4 ± 0.2	27.1 ± 0.6	60	0.5 ± 0.1 <sup>c</sup>
B	10	25.0 ± 0.3	43.4 ± 0.8	600	2.3 ± 0.1 <sup>b</sup>
C	20	25.1 ± 0.4	43.0 ± 0.6	1199	2.4 ± 0.1 <sup>b</sup>
D	30	25.1 ± 0.3	45.6 ± 0.6	1799	2.7 ± 0.1 <sup>a</sup>

Average of three replications ±SD; different letters indicate a significant ( $p < 0.05$ ) difference between values of the column.

### 2.3. Total phenolics and flavonoids

The total phenolic content of juice samples was determined using the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, 1965) with slight modifications as follow. Control and samples (1 ml each) were diluted 1:10 in methanol:water (6:4) and centrifuged (10 min, 3000 rpm). 125  $\mu$ l of diluted sample were added to 125  $\mu$ l of Folin-Ciocalteu reagent and 1.25 ml of saturated sodium carbonate solution (7%) was added. Finally, 1.3 ml of distilled water was added to the mixture and shaken gently in a vortex. After 90 min of incubation in darkness at room temperature, the absorbance at 760 nm was measured in triplicate using a UV-VIS spectrophotometer (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation). A calibration curve was prepared by using a standard solution of gallic acid (0–600  $\mu$ g/ml), and the results of phenols were expressed as mg gallic acid equivalent per 100 ml of juice.

To determine total flavonoids content, the method described by Sakanaka et al. (2005) with slight modifications was used as follow. Briefly, 250  $\mu$ l of the centrifuged sample

where  $A_0$  is the absorbance of the control at 30 min and  $A_1$  is that of the sample at 30 min. Samples were analyzed in triplicate.

### 2.5. Ascorbic acid determination

The ascorbic acid content in samples was determined based on the 2,6-dichlorophenol iodophenol (DCPIP) Titrimetric Method (967.21) of AOAC (1995), with slight modifications. The coloring factor was obtained by titration of the standard solution of ascorbic acid with standard dye solution until a pink colored solution (end point) was obtained. A known volume of the juice sample (10 ml) was diluted to 100 ml with 3% metaphosphoric acid, followed by filtering through Whatman (No. 1) filter paper. Further, a known volume of the aliquot (5 ml) filtrate was titrated with 2,6-dichlorophenol iodophenol (DCPIP) indicator until the end point was reached. The results obtained were expressed as milligrams of ascorbic acid per 100 ml sample, and the calculation was done as stated below:

$$\text{Ascorbic acid} \left( \frac{\text{mg equivalent}}{100 \text{ mL of juice}} \right) = \frac{\text{titer} \times \text{dye factor} \times \text{concentration} \times 100}{\text{extract aliquot used for estimation} \times \text{volume of sample use for estimation}}$$

(10 min, 3000 rpm) was mixed with 1.25 ml of distilled water, followed by addition of 75  $\mu$ l of a 5% sodium nitrite solution and was mixing gently with a vortex. After waiting for 6 min, 150  $\mu$ l of a 10% aluminium chloride solution was added and gently shaken. The mixture was allowed to stand for a further 5 min before 0.5 ml of 1 M sodium hydroxide was added. Finally 0.275 ml of distilled water was added and mixed well. The absorbance was measured immediately in triplicate at 510 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation). The results of flavonoids were expressed as mg catechin equivalent per 100 ml of juice.

### 2.4. DPPH assay

Scavenging activity of orange juice against DPPH radical was assessed according to the method of Blois (1958) with some modifications. To a known aliquot (2.5 ml) of diluted sample juice (1/10 in methanol), 0.5 ml of DPPH (1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl) solution (1 mM in methanol) was added. The reaction mixture was vortexed thoroughly and left in the dark at room temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 30 min. The decrease in the absorbance (due to the proton donating activity) was measured at 517 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Nicolet evolution 300). Ascorbic acid and catechin were used as references. The ability to scavenge DPPH radical was calculated by the following equation:

$$(I) = \left[ \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right]$$

### 2.6. Determination of total carotenoids

The content of total carotenoids ( $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lycopene) was determined by the method stated by Liao et al. (2007), with some modifications, by measuring the absorbance at 445, 450 and 470 nm respectively using UV-VIS spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Nicolet evolution 300) at ambient temperature. Mixing 25 ml of juice sample with 80 ml of n-hexane/acetone (1:1, v/v) in a separation funnel and shaking well, the organic phase after separation was taken out. Again by using 15 ml of n-hexane/acetone (1:1, v/v), the aqueous phase was repeatedly extracted until it was colorless. The organic phase was dehydrated using anhydrous sodium sulfate. The results were expressed as mg carotenoids equivalent per 100 ml of juice.

### 2.7. Color analysis

Color proportions in the juice samples were determined using the spectrophotometric color analysis reported by Glories (1984). A direct measurement of absorbance of the orange juice samples at 420, 520, and 620 nm was carried out using a UV-VIS spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Nicolet evolution 300). The following variables were calculated; color intensity (CI) as the sum of 420 nm, 520 nm, and 620 nm absorbance; proportion of yellow (Ye %), red (Rd %) and blue color (Bl %) were calculated by dividing the absorbance of 420, 520 and 620, to the color intensity (CI), respectively.



## 2.8. Total soluble solids (°Brix) and pH

The total soluble solids were determined using a hand refractometer (Model: Pocket PAL-1 Atago, Tokyo, Japan). Refractive indexes were recorded and converted to °Brix using a conversion table. After performing each analysis at room temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), the refractometer prism was cleaned thoroughly with distilled water. All the measurements were performed in triplicate, and the pH of the samples was determined using a pH meter (Crison pH meter 507).

## 2.9. Non-enzymatic browning index

Orange juice (10 ml) sample was centrifuged (10 min at  $7800 \times g$ ) to remove coarse particles from the sample. Five milliliters of ethanol (95%) was added to 5 ml of the supernatant and centrifugation was repeated. The absorbance of the supernatant was read at 420 nm using a UV-Visible spectrophotometer (Nicolet evolution 300, Thermo Electron Corporation) with a cell path length of 1 cm, with distilled water as blank. Measurements were taken in triplicate and mean value reported (Fustier et al., 2011; Meydav et al., 1977).

## 2.10. Microbiological analysis

This study included determination of total plate counts (TPC) of aerobic bacteria and fungi (molds and yeasts) in both a control and in sonicated orange juice samples.

The microbial load of samples was determined based on the standard method of FDA's *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Methods* (2001). A pour plate method was applied to determine the TPC. Accordingly, appropriate serial dilutions were prepared with 0.1% (w/v) peptone water (Merck, Germany), followed by decimal dilutions (up to  $10^{-4}$ ) of samples, which were further pipetted into sterile Petri plates (dish) followed by addition of 15 ml of molten plate count agar (PCA, MERCK, Germany) ( $45^\circ\text{C}$ ) to each plate. Sample dilutions were immediately mixed with an agar medium by rotating the plates in a figure "8" manner and were allowed to solidify for 30 min at room temperature ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Subsequently, the plates were turned upside down and the PCA plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2 days in an incubator (Ambient-High Temperature Incubator Model Tuttingem, Germany). The estimation numbers of bacterial colonies in samples (as CFU/ml juice) were counted by multiplying the number of colonies with the reciprocal.

The total yeast and mold content was enumerated by a pour plate method using (PCA) media (MERCK, Germany). Additionally, 0.01% chloramphenicol was added into PCA plates to inhibit the growth of other microbes as cross-contaminants. PCA plates were incubated at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  for 5–7 days in an incubator (Sanyo Incubator, Japan) to determine yeast and mold counts. Each test was performed in replicates of three, and the results were expressed as log colony-forming units (CFU) per milliliter of juice.

## 2.11. Sensory analysis

Prior to sensory evaluation orange juice samples were refrigerated ( $5^\circ\text{C}$ ), randomly coded and served (30 ml) at  $15^\circ\text{C}$  together with still water (Lanjarón, Spain) to the panelists ( $n=10$ ). The orange juice untreated (control) and treated samples (as above) were presented to panelists who were asked to describe differences between samples by using a 10-point hedonic

scale, where 1 means very much disliked and 10 very much liked. A score of 5 was the minimum threshold for samples acceptability (Walkling-Ribeiro et al., 2009).

## 2.12. Shelf life study

The methodology used in this study was based on previous works (Ferrario et al., 2015; Valero et al., 2007) but with some modifications. Replicates of control and treated orange juice samples aseptically packaged into screw-top 50-ml polypropylene containers were analyzed after 0, 15 and 28 days of storage at  $5^\circ\text{C}$ . The juice was agitated and 1 ml aliquots were removed at each incubation period, decimal dilutions were made, and counts of microorganisms were performed as previously described for the microbiological analysis of natural juices. Two plates were used for each dilution and were incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 48 h for molds and yeast and at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h for bacteria.

The evolution of sensorial attributes and non-enzymatic brown index was also determined as described previously.

## 2.13. Statistical analysis

The data obtained in this study were reported as mean value  $\pm$  standard deviation (SD). Completely randomized design (CRD) was conducted with one-way ANOVA at a significance level of  $P < 0.05$ , and significant differences between mean values were determined by Duncan comparison test. Statistical analyses were determined by using STATGRAPHICS plus Version 5.1 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, USA).

# 3. Results and discussion

## 3.1. Total phenolics and flavonoids

A significant increase in the total phenolic content occurred in sonicated orange juice samples when compared to a control (Table 2). This increase was from 42.74 up to 69.45 mg GAE/100 ml for a sonication treatment of 30 min. These results show a significant enhancement on phenolic compounds within sonication treatment with increased temperature. In fact, within 10, 20 and 30 min treatment, temperatures registered were 43.4, 43.0 and  $45.6^\circ\text{C}$  respectively, and the amounts of total phenolics were 68.44, 68.37 and 69.45 mg GAE/100 ml respectively. Same results were noticed by Abid et al. (2014a), showing a significant enhancement on total phenolic contents for apple juice sonicated at  $60^\circ\text{C}$ .

This increase on phenolic compounds can be attributed to the enhanced disruption of cell walls by thermosonication treatment, which might have facilitated the release of bound phenolic contents. Fu et al. (2014) basing on scanning electron microscopy showed that ultrasound changed the surface structure of plant material making it easier to break the plant cell walls. With cavitation, hydroxyl and hydrogen free radicals are generated from the dissociation of the water molecules in aqueous solutions as a result of the high temperature and pressure of the collapsing gas bubbles associated with cavitation (Awad et al., 2012; Riesz and Kondo, 1992). There are concerns regarding potential oxidative damage associated with free radicals, which is considered as a disadvantage for preserving phenols but it may enhance antioxidant efficiency for flavonoids (Ashokkumar et al., 2008).



**Table 2 – Effect of sonication treatments on total phenolics, total flavonoids, DPPH radical scavenging activity, total carotenoids, and ascorbic acid content in orange juice.**

Samples	Total phenolics <sup>1</sup>	Total flavonoids <sup>2</sup>	Percentage inhibition <sup>3</sup>	Total carotenoids <sup>4</sup>			Ascorbic acid <sup>5</sup>
				$\alpha$	$\beta$	L	
Control	42.7 ± 0.8 <sup>d</sup>	8.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	21.7 ± 0.8 <sup>d</sup>	0.4 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.4 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.2 ± 0.01 <sup>d</sup>	28.9 ± 0.01 <sup>b</sup>
1 min	60.2 ± 0.9 <sup>c</sup>	13.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	37.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.005 <sup>c</sup>	29.4 ± 0.05 <sup>b</sup>
10 min	68.4 ± 0.05 <sup>b</sup>	14.1 ± 0.01 <sup>a</sup>	35.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.001 <sup>b</sup>	36.8 ± 0.05 <sup>a</sup>
20 min	68.3 ± 0.02 <sup>b</sup>	13.9 ± 0.03 <sup>a</sup>	34.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.005 <sup>a</sup>	37.6 ± 0.01 <sup>a</sup>
30 min	69.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	14.3 ± 0.02 <sup>a</sup>	35.2 ± 0.4 <sup>bc</sup>	0.6 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.005 <sup>a</sup>	37.6 ± 0.02 <sup>a</sup>

Values with different letters in the same column (a–d) are significantly different ( $p < 0.05$ ) from each other.

\* Values are the means of three replicates ± standard deviation (SD).

<sup>1</sup> mg gallic acid equivalent/100 ml of juice.

<sup>2</sup> mg catechin equivalent/100 ml of juice.

<sup>3</sup> Percentage inhibition of DPPH radical [ascorbic acid (0.01 mg/ml): 38.3; catechin (0.01 mg/ml): 68.5].

<sup>4</sup> mg carotenoids/100 ml of juice.

<sup>5</sup> mg ascorbic acid equivalent/100 ml.

Flavonoids are natural polyphenolic compounds present in plants (and plant products) that possess a wide spectrum of chemical and biological activities. Several studies have shown a positive correlation between augmented consumption of flavonoids with reduced risk of cardiovascular diseases and cancer (Hertog et al., 1992).

In our study, sonication treatment of orange juice has allowed enhancement of flavonoids contents (Table 2). Indeed, compared to the amount found in the control sample (8.78 mg catechin equivalent/100 ml) a significant increase was found in all sonication treatments; from 11.58 to 14.32 mg catechin equivalent/100 ml of juice.

### 3.2. Radical scavenging activity

The results on DPPH free radical scavenging activity of orange juice are represented in Table 2. Sonicated samples showed significant increase in the percent DPPH inhibition compared to control indicating a higher level of antioxidants. The percent inhibition of DPPH was 37.48%, 35.70%, 34.70% and 35.21% in 1, 10, 20 and 30 min sonicated samples, respectively compared to control samples (21.67%). Similar results were found with sonicated kasturi lime juice (Bhat et al., 2011). These results indicate that sonication treatment enhance the extractability of antioxidant compounds.

### 3.3. Total carotenoids

Carotenoids are thought to be associated with reduced risk of several chronic health disorders including some forms of cancer, heart disease and eye degeneration, and also as regulators of cell proliferation and differentiation, stimulators of cell to cell communication and blue light filters. Several studies show that carotenoids enhance the immune system and lower the risk of many cardiovascular diseases, cancer, cataract and macular degeneration (Cooper, 2004).

Results (Table 2) present the effect of sonication treatments on the total carotenoids of orange juice. Significant increases in total carotenoids ( $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lycopene) were observed in the juice samples sonicated for 1, 10, 20 and 30 min as compared to control sample, with a maximum amounts within samples sonicated for 10 min at 43.4 °C (0.65, 0.69 and 0.47 mg of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lycopene respectively per 100 ml of juice). Recent studies showed such increase in total carotenoids content in the orange juice-milk orange juice and apple juice treated with high pressure (Abid

et al., 2014b). This increase in total carotenoids by sonication might be attributed to the mechanical disruption of cell walls, which might enhance free carotenoids in the juice.

### 3.4. Ascorbic acid

The nutritional quality of orange juice is primarily related to the ascorbic acid content (Zerdin et al., 2003). Ascorbic acid exhibits potential antioxidant activity and is known to protect cells from free radicals induced damage. Ascorbic acid contributes substantially toward prevention of the onset of cardiovascular diseases and cancer (Marín et al., 2002). Ascorbic acid is thermolabile and highly sensitive to various processing conditions. The mechanism of vitamin C degradation follows aerobic and/or anaerobic pathways and depends upon several processing conditions (Vieira et al., 2000).

Several study reports sensitivity of ascorbic acid to sonication. Indeed, Adekunle et al. (2010) found high ascorbic acid degradation in sonicated tomato juice. However, in our study, a significant increase in the ascorbic acid content was observed after sonication treatments of orange juice (Table 2). However, in 10, 20 and 30 min in which temperature was up of 43.0 °C respectively, amounts of ascorbic acid were significantly higher; 36.76, 37.59 and 36.23 mg ascorbic acid/100 ml of juice compared with control (28.9 mg ascorbic acid/100 ml) and 1 min treated sample (29.4 mg ascorbic acid/100 ml), showing the beneficial impact of coupling sonication with mild temperatures for the extraction of ascorbic acid. Similar results were reported, with an increase of ascorbic acid content after sonication of guava juice (Cheng et al., 2007) and kasturi lime juice (Bhat et al., 2011). Sonication increases ascorbic acid content because of the elimination of dissolved oxygen that is essential for ascorbic acid degradation during cavitation (Cheng et al., 2007). This is applicable in our present study as well.

### 3.5. pH, total soluble solids, and color attributes

The results on effect of sonication treatments on pH, total soluble solids (°Brix), and color attributes in orange juice are depicted in Table 3. The pH of juice showed significant decrease to 3.83 after 1 min of sonication treatments ( $P < 0.05$ ). However, we recorded stabilization of pH at 3.7 within samples treated for 10, 20 and 30 min. Sonication did not induce any significant changes in the total soluble solids, even after 30 min of treatment time. These results are in agreement

**Table 3 – Effect of sonication on pH, total soluble solids, and color attributes in orange juice ( $n = 3 \pm SD$ ).**

Sample	pH	Total soluble solids ( $^{\circ}$ Brix)	Color			
			Color intensity	% Yellow	% Red	% Blue
Control	4.00 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	10.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.787 $\pm$ 0.119 <sup>b</sup>	41.376 $\pm$ 0.172 <sup>c</sup>	32.364 $\pm$ 0.069 <sup>a</sup>	26.305 $\pm$ 0.251 <sup>a</sup>
1 min	3.83 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	10.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.057 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	43.224 $\pm$ 0.045 <sup>c</sup>	32.421 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	24.337 $\pm$ 0.044 <sup>a</sup>
10 min	3.79 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	10.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.512 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	45.888 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>	31.714 $\pm$ 0.016 <sup>a</sup>	22.410 $\pm$ 0.010 <sup>b</sup>
20 min	3.79 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	10.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.496 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	46.035 $\pm$ 0.037 <sup>a</sup>	31.555 $\pm$ 0.040 <sup>a</sup>	22.426 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>
30 min	3.78 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	10.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.506 $\pm$ 0.005 <sup>c</sup>	46.403 $\pm$ 0.156 <sup>a</sup>	31.271 $\pm$ 0.088 <sup>a</sup>	22.368 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>

Values with different letters in the same column (a–c) are significantly different ( $p < 0.05$ ) from each other.

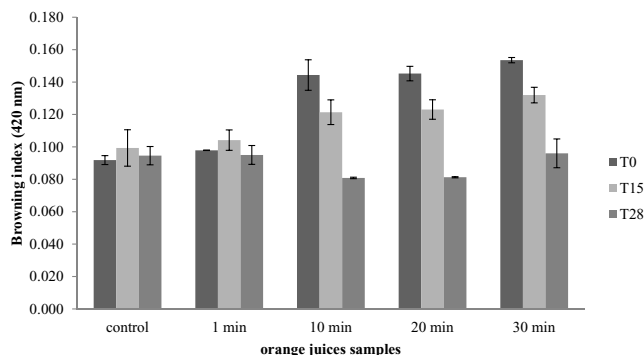
with the observations on sonicated orange and tomato juices (Tiwari et al., 2008a).

Color is the key quality parameter of fruit juices that directly influences the consumer criteria for acceptance or rejection. In the present study, significant differences in all the color attributes were recorded between the control and different sonicated samples. The juice samples sonicated for 10, 20 and 30 min showed reduction in color intensity (CI) and blue percentage (% blue) compared with control and samples sonicated for 1 min. This reduction appears more significant with prolongation of treatment time. The same result was observed for yellow percentage (% yellow), but inversely proportional with time. Our results are in agreement with the observations reported by Bhat et al. (2011) in sonicated kasturi lime juice.

Degradation of color in sonicated juice samples can be attributed to the oxidation reactions that occur as a result of interaction with free radicals generated during sonication treatments (Mason, 1991). Cavitation induced during sonication has been reported to contribute to changes occurring in the color of fruit juices (Tiwari et al., 2008a; Cheng et al., 2007). During sensory analysis (Fig. 3), the minor color changes induced during sonication of orange juice were detected.

### 3.6. Non-enzymatic browning index (BI)

The BI is one of the parameters that indicates the non-enzymatic browning of orange juice. The BI significantly increased with treatment time (Fig. 1). At the lowest treatment time (1 min), the BI was found to increase by 107%. At 10 min of treatment, BI increased 157%, at 20 min 158% and at 30 min 172%. Furthermore, kinetics studies on BI reactions based on  $A_{420\text{nm}}$  measurement in juices reported zero-order reaction kinetics ( $C = C_0 + K_0T$ ; being  $K_0$  reaction rate constant of a zero-order kinetic model), in which  $K_0$  values  $>1$  indicate



**Fig. 1 – Changes in browning index for orange juice during sonication treatments and evolution of the browning index of the control and treated orange juice samples stored at 5°C in polypropylene containers for 0, 15 and 28 days.**

that non-enzymatic browning predominates over pigment destruction due to sonication; while  $K_0$  values  $<1$  indicate that pigment (carotenoid) destruction predominates over non-enzymatic browning (Tiwari et al., 2008b).

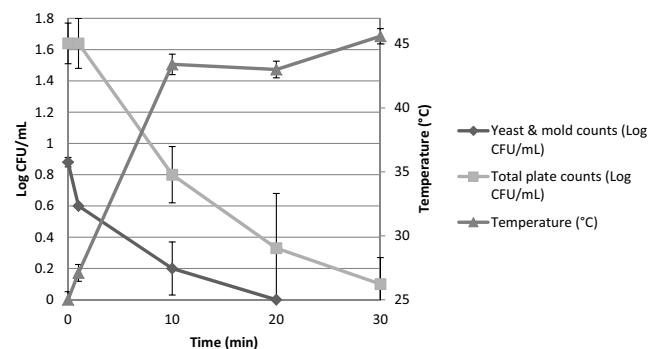
### 3.7. Microbiological analysis

Power ultrasound treatment has been reported to be effective in minimizing the presence of food borne pathogens in guava, orange and tomato juices (Valero et al., 2007; Cheng et al., 2007; Adekunle et al., 2010). Previously, it was assumed that acidic foods such as those of citrus and their products are safe for direct consumption because survival of microbes or pathogens can be difficult at lower pH levels. However, available reports have indicated the survival of pathogenic microbes even at a lower or acidic pH for long time durations (Wang et al., 2010). Indeed, in our study, presence of TPC, yeast and mold was observed in control sample of orange juice. However, a clear reduction in the microbial load was found after sonication treatments (Fig. 2).

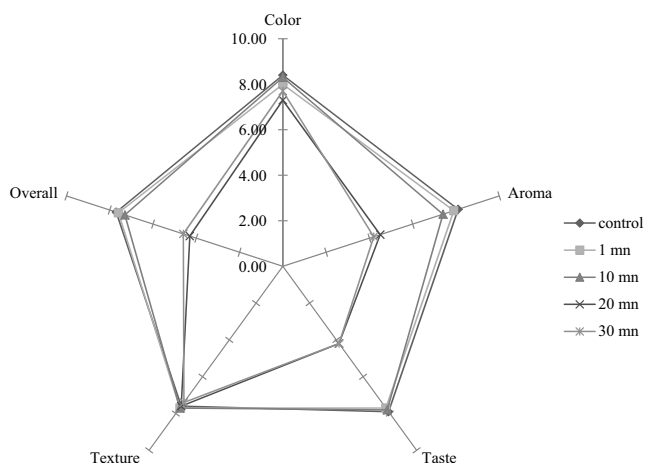
The aerobic plate count showed a significant reduction in samples sonicated for 30 min, while 20 min of sonication was sufficient for elimination of yeast and mold. Reduction in the microbial load might be attributed to the combined physical and chemical mechanisms that occur during cavitation (Abid et al., 2014a). Abid et al. (2014a) showed that the inactivation of all microbial cells was observed in apple juice sonicated using probe USP40-10, with higher microbial reduction in extending sonication treatment time.

However, researchers have reported (Chemat et al., 2011) that sonication alone is ineffective for decontamination of the products; hence, sonication combined with other physical treatments such as application of pressure, mild heat or non-thermal treatments needs to be employed.

It has been reported that thermosonication cause the highest inactivation of pathogens as recorded in cranberry, pineapple and grape fruit juices (Bermúdez-Aguirre and



**Fig. 2 – Effect of sonication treatment on the survival of microorganisms in orange juice.**



**Fig. 3 – Sensory assessment of untreated (control) and treated orange juice samples by sonication (1 min, 10 min, 20 min, 30 min).**

Barbosa-Cánovas, 2012). In this study, the increase of temperature due to the extension of sonication treatment time has significantly reduced count of microorganisms and led to the total decontamination of samples at 30 min of treatment. Ultrasound has been proved to increase microbial sensitivity to heat, high osmotic pressure and low pH due to cavitations and other changes in the outer membrane of the cell structure (Wordon et al., 2012). Several study reported that more reductions in microbial cells of juices samples treated with ultrasound at higher temperatures, evidencing synergism between sonication and heat (Wordon et al., 2012).

So, our results indicate that the increased level of microbial inactivation of orange juice can be obtained by coupling ultrasound with moderate heat in the juice.

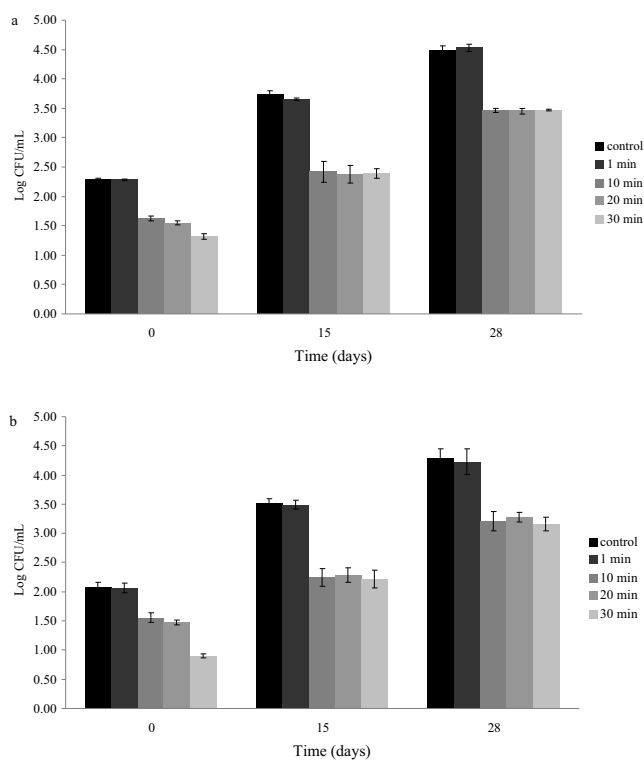
### 3.8. Sensory analysis

Fig. 3 shows the results of sensory analysis a time zero. The untreated and treated samples for 1 and 10 min had no statistically significant difference in any of the sensory parameters analyzed (color, aroma, flavor, texture, in general). The sample treated for 20 min and 30 min had a statistically significant decrease in all the sensory parameters tested (aroma, taste, overall) except color and texture, driving the scores beyond the rejection limit (below 5 points). Similar results were obtained by Gómez-López et al. (2010).

### 3.9. Shelf life study

Refrigerated storage at 5 °C was not effective in controlling the growth of TPC and fungi up to 28 days of storage in orange juices subjected to sonication. During storage at 5 °C of untreated (control), 1 min treated sample and samples treated by ultrasound (10 min, 20 min, 30 min), significant differences in microbial growth were observed. The behavior of TPC and molds and yeast in refrigerated orange juices for 28 days is shown in Fig. 4. Similar results were obtained by Valero et al. (2007), who reported that refrigerated storage at 5 °C was not effective in controlling the growth of mesophilic aerobes and fungi up to 42 days of storage in orange juices subjected to low and high frequency ultrasounds.

The evolution of the browning extent in orange juice during refrigerated storage at 5 °C is shown in Fig. 1. Browning extent showed little fluctuation over a 28 days period, and it



**Fig. 4 – Survival of total plate counts (a) and fungi (b) during refrigerated storage (5 °C during 0, 15 and 28 days).**

was observed that the BI significantly decreased for all samples. These observations are in agreement with the studies who reported minor browning of clear orange juices stored 19 weeks at 4 °C. Browning in citrus beverage involves a complex group of reactants that produce an assortment of pigments of highly unstable characteristics (Fustier et al., 2011).

During the evolution of sensorial attributes of refrigerated juices at 5 °C, control and sonicated samples were rejected after 15 and 28 days due to off-odor (sensory score below 5). Natural microflora reached ~3 log CFU/mL at those days, which suggests a possible relation between microbial growth and sensory deterioration. Based in perception of off-odor and in calculation of microflora evolution of orange juice we can estimate a shelf-life extension of 10 days for 10 min sonicated samples. For 10 days of storage at 5 °C we can calculate that control reached 2.5 log CFU/mL of TPC and 10 min sonicated samples reach only 1.6 log CFU/mL of TPC.

## 4. Conclusion

The present study was conducted to evaluate the influence of different sonication treatments at mild temperatures on nutritional and microbial quality of orange juice. The results obtained in this study clearly indicated that sonication treatments have good potential to improve the nutritional and microbiological quality of orange juice. Sonication showed general enhancement in bioactive compounds (total phenolics, flavonoids, carotenoids, anthocyanins and ascorbic acid) with significant reductions in the microbial counts. Our results showed that ultrasound alone does not have the power to inactivate micro-organisms reliably for purposes of food preservation. However, ultrasound could be used in combination with other preservation methods such as antimicrobial compounds, high-hydrostatic pressure, heat or heat

and moderate static pressure to allow microbial and enzymatic inactivation in liquid foods.

It is expected that the results of this study might further improve sonication treatments to be used on a pilot scale (in food processing industries) for production of safer and high quality juice with an extendable shelf life.

### Conflict of interest

No conflict of interest exists in this manuscript.

### Acknowledgements

This work was supported by a grant-in-aid from the program Erasmus Mundus Action 2 EU-MARE NOSTRUM. The authors would like to express their thanks to the research group of Food Biotechnology E098-06, Department of Food Nutrition and Technology, Veterinary Faculty, University of Murcia, Spain.

### References

- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M.M., Hu, B., Lei, S., Zhang, X., Zeng, X., 2013. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* 20, 1182–1187.
- Abid, M., Jabbar, S., Hua, B., Hashim, M.M., Wu, T., Lei, S., Khan, M.A., Zeng, X., 2014a. Thermo-sonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* 21, 984–990.
- Abid, M., Jabbar, S., Wua, T., Hashim, M., Hua, B., Lei, S., Zeng, X., 2014b. Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* 21, 93–97.
- Adekunte, A.O., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Scannell, A.G.M., O'Donnell, C.P., 2010. Effect of sonication on color, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chem.* 122, 500–507.
- AOAC, 1995. Vitamin C (Ascorbic acid) in vitamin preparations and juices: 2,6-dichloroindophenol titrimetric method. *Official Methods of Analysis of AOAC Int.*, vol. 4., 16th ed., pp. 16–17.
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkh, K., Versteeg, C., 2008. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 155–160.
- Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., Youssef, M.M., 2012. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. *Food Res. Int.* 48, 410–427.
- Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G.V., 2012. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *J. Food Eng.* 108, 383–392.
- Bhat, R., Kamaruddin, N.S.B.C., Min-Tze, L., Karim, A.A., 2011. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrason. Sonochem.* 18, 1295–1300.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, F., Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18, 813–835.
- Cheng, L.H., Soh, C.Y., Liew, S.C., The, F.F., 2007. Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chem.* 104, 1396–1401.
- Cliff, M., Dever, M.C., Gayton, R., 1991. Juice extraction process and apple cultivar influences on juice properties. *J. Food Sci.* 56, 1614–1617.
- Cooper, D.A., 2004. Carotenoids in health and disease: recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *J. Nutr.* 134, 221S–224S.
- FDA, U.S. Food and Drug Administration, 2001. FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition, Bacteriological Analytical Manual, 8th ed (Chapter 18) Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam> (accessed 18.12.09).
- Ferrario, M., Alzamora, S.M., Guerrero, S., 2015. Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiol.* 46, 635–642.
- Fu, Q., Zhang, L., Cheng, N., Jia, M., Zhang, Y., 2014. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum L.*) flowers. *Food Bioprod. Process.* 92, 321–327.
- Fustier, P., St-Germain, F., Lamarche, F., Mondor, M., 2011. Non-enzymatic browning and ascorbic acid degradation of orange juice subjected to electroreduction and electro-oxidation treatments. *Innov. Food Sci. Emerg.* 12, 491–498.
- Glories, Y., 1984. La couleur des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin.* 18, 253–271.
- Gómez-López, V.M., Orsolani, L., Martínez-Yépez, A., Tapia, M.S., 2010. Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *LWT – Food Sci. Technol.* 43, 808–813.
- Gómez, P.L., Welte-Chanes, J., Alzamora, S.M., 2011. Hurdle technology in fruit processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 447–465.
- Gogate, P.R., Sutkar, V.S., Pandit, A.B., 2011. Sonochemical reactors: important design and scale up considerations with a special emphasis on heterogeneous systems. *Chem. Eng. J.* 166, 1066–1082.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2379–2383.
- Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Wu, T., Hashim, M.M., Lei, S., Zhu, X., Zeng, X., 2014. Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. *LWT. Food Sci. Technol.* 55, 16–21.
- Kabasakalis, V., Siopidou, D., Moshatou, E., 2000. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem.* 70, 325–328.
- Knorr, D., Zenker, M., Volker, H., Lee, D.U., 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Technol.* 15 (5), 261–266.
- Liao, H., Sun, Y., Ni, Y., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Chen, F., 2007. The effect of enzymatic mash treatment, pressing, centrifugation, homogenization, deaeration, sterilization and storage on carrot juice. *J. Food Process Eng.* 30, 421–435.
- Marín, F.R., Martínez, M., Urbesalga, T., Castillo, S., Frutos, M.J., 2002. Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems. *Food Chem.* 78, 319–324.
- Mason, T.J., 1991. Practical Sonochemistry: User's Guide to Application in Chemistry and Chemical Engineering, vol. 22–25. Ellis Horwood, UK, pp. 1–150.
- Meydav, S., Saguy, I., Kopelman, I.J., 1977. Browning determination in citrus products. *J. Agric. Food Chem.* 25, 602–604.
- Nagy, S., Smoot, J.M., 1977. Temperature and storage effects on percent retention and percent U.S. recommended dietary allowance of vitamin C in canned single strength orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 25, 135–138.
- Nnam, N.M., Njoku, I.E., 2005. Production and evaluation of nutrient and sensory properties of juices made from citrus fruits. *Nig. J. Nutr. Sci.* 26 (2), 62–66.
- González-Centeno, M.R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., 2014. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera L.*) – a response surface approach. *Ultrason. Sonochem.* 21, 2176–2184.
- Riener, J., Noci, F., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Lyng, J.G., 2008. Combined effect of temperature and pulsed electric fields on apple juice peroxidase and polyphenoloxidase inactivation. *Food Chem.* 109, 402–407.



- Riesz, P., Kondo, T., 1992. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biol. Med.* 13 (3), 247–270.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y., 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chem.* 89, 569–575.
- Salleh-Mack, S.Z., Roberts, J.S., 2007. Ultrasound pasteurization: the effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrason. Sonochem.* 14, 323–329.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Sutkar, V.S., Gogate, P.R., 2009. Review. Design aspects of sonochemical reactors: techniques for understanding cavitation activity distribution and effect of operating parameters. *Chem. Eng. J.* 155, 26–36.
- Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., 2008a. Color degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT – Food Sci. Technol.* 41, 1876–1883.
- Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., 2008b. Effects of Sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2423–2428.
- Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Cullen, P.J., 2009. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *J. Food Eng.* 93, 166–171.
- Tournas, V.H., Heeres, J., Burgess, L., 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol.* 23 (7), 684–688.
- USDA, 2004. The U.S. and World Situation: Juices. Foreign Agricultural Service, Horticultural & Tropical Products Division, Washington, DC, USA.
- Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., Lizama, V., 2007. Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *J. Food Eng.* 80 (2), 509–516.
- Varnam, A.H., Sutherland, J.P., 1999. *Beverage: Technology, Chemistry and Microbiology*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg.
- Vetal, M.D., Shirpurkar, N.D., Rathod, V.K., 2014. Three phase partitioning coupled with ultrasound for the extraction of ursolic acid and oleanolic acid from *Ocimum sanctum*. *Food Bioprod. Process.* 92, 402–408.
- Vieira, M.C., Teixeira, A.A., Silva, C.L.M., 2000. Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuacbu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *J. Food Eng.* 43, 1–7.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J., 2009. Shelf life and sensory evaluation of orange juice after exposure to thermosonication and pulsed electric fields. *Food Bioprod. Process.* 87, 102–107.
- Wang, J., Hu, X., Wang, Z., 2010. Kinetics models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM14558T and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM3922T in apple juice by ultrasound. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 177–181.
- Wordon, B.A., Mortimer, B., McMaster, L.D., 2012. Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Res. Int.* 47, 134–139.
- Zerdin, K., Rooney, M.L., Vermue, J., 2003. The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chem.* 82, 387–395.



# Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices



Marta Sánchez-Rubio <sup>a</sup>, Amaury Taboada-Rodríguez <sup>b</sup>, Rita Cava-Roda <sup>a</sup>, Antonio López-Gómez <sup>c</sup>, Fulgencio Marín-Iniesta <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Group of Food Biotechnology, Food Technology, Nutrition and Bromatology Department, Faculty of Veterinary, University of Murcia, Campus Espinardo, s/n, E-30100, Murcia, Spain

<sup>b</sup> Desarrollos Bio-Tecno Alimentarios Ltd., Virgen de las Maravillas 6, 1<sup>ª</sup>B, 30009, Murcia, Spain

<sup>c</sup> Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 25 February 2016

Received in revised form

20 May 2016

Accepted 2 June 2016

Available online 3 June 2016

### Keywords:

*Saccharomyces cerevisiae*

Natural juices

Ultrasound

Essential oil

## ABSTRACT

The inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices untreated (control) and treated with mild temperature (50 °C), cinnamon leaf essential oil, thermo-ultrasound (24 KHz; 33.31 W mL<sup>-1</sup>; 30 min; 50 °C), alone or in combination, and its survival under refrigerated conditions (5 °C, 28 days) were studied. Additionally, the maximum concentration of cinnamon leaf essential oil accepted by consumers in both juices was determined by sensory analysis. A significant reduction in the yeast population was obtained compared to controls. The most effective treatment to inactivate yeast cells was the combination of ultrasound and cinnamon leaf essential oil during 30 min at 50 °C, which, from an initial population of 5.13 log cfu ml<sup>-1</sup>, achieved significant 2.81 ± 0.19 and 2.52 ± 0.26 log-reductions in natural pomegranate and orange juices respectively. During refrigerated storage (5 °C, 28 days), the *S. cerevisiae* population in orange and pomegranate juices, treated with ultrasound and cinnamon leaf essential oil at 50 °C for 30 min, decreased by 1.55 ± 0.19 and 0.68 ± 0.16 log respectively, while the controls kept the yeast population without significant changes.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Fresh juices are an important source of beneficial bioactive compounds for human beings. Orange and pomegranate juices are highly valued by consumers for their nutritional content and refreshing taste. Orange juice (OJ) is an important source of compounds of antioxidant relevance (carotenoids, phenols and vitamin C). The principal phenolic compounds of OJ are hydroxycinnamic acids and flavonoids (Stinco et al., 2015). Pomegranate juice (PJ) is rich in polyphenols and ascorbic acid. Pomegranate polyphenols include flavonoids (anthocyanins), condensed tannins (proanthocyanidins) and hydrolysable tannins (Li et al., 2015).

Yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, are the most important microorganism responsible for juice spoilage in the industry and

produce severe economical losses (Marx, Moody, & Bermúdez-Aguirre, 2011). Thermal pasteurization is the most common method to prolong juices shelf-life. But, heat treatments may alter their organoleptic and nutritional properties (Soria & Villamiel, 2010). The demand of the consumers has increased the effort of juice industry to offer products that preserve their nutritional value through the development of technologies which cause the minimal damage on juice composition.

Among these emergent technologies, special attention has been paid to the application of ultrasound (UST) in beverages conservation (Chemat, Huma, & Khan, 2011; Jabbar et al. 2014; Soria & Villamiel, 2010; Tiwari, O'Donnell, Muthukumarappan, & Cullen, 2009; Tiwari, Muthukumarappan, O'Donnell, & Cullen, 2008; Valero et al., 2007). UST at frequencies from 20 to 100 kHz causes cavitation, resulting in a rapid creation, growth, and abrupt breakdown of bubbles, yielding localized extremely high temperatures (5,500 °C) and pressures (50 MPa). Cavitation erodes the cell wall with fine membrane fragmentation, produces disruption of sub-cellular particles, as well as structural and functional

\* Corresponding author.

E-mail address: [fmarin@um.es](mailto:fmarin@um.es) (F. Marín-Iniesta).

URL: <http://www.debiotec.com>

components up to cell lysis, causing inactivation of enzymes and microbial death (Guerrero, López-Malo, & Alzamora, 2001a; Guerrero, Tognon, & Alzamora, 2005; López-Malo, Palou, Jiménez-Fernández, Alzamora, & Guerrero, 2005b; Marx et al., 2011; Piyasena, Mohareb, & McKellar, 2003).

Essential oils (EOs) and their components have been proposed as natural preservatives (Tserennadmid et al., 2011; Unlu, Ergene, Unlu, Zeytinoglu, & Vural, 2010), and have been used in milk (Cava-Roda, Taboada, Palop, López-Gómez, & Marin-Iniesta, 2012a; Cava-Roda, Taboada-Rodríguez, Valverde-Franco, & Marín-Iniesta, 2012b), fruits (Lanciotti et al., 2004; Prakash, Singh, Mishra, & Dubey, 2012) and fruit juices (Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009; Tserennadmid et al., 2011). *Cinnamomum zeylanicum* leaf EO (CLEO) is recognized as a safe additive and it is possible to use it or their main component (eugenol) to extend the shelf life of selected foods considering their GRAS status (Prakash et al., 2012) and their antimicrobial activity (Burt, 2004; Suhr & Nielsen, 2003).

UST and EOs have been assayed for their combined application (Gastélum, Avila-Sosa, López-Malo, & Palou, 2012; Guerrero et al., 2001a; López-Malo et al., 2005b), to obtain high-quality beverages with “fresh-like” characteristics and novel functionalities (Bevilacqua, Speranza, Campaniello, Sinigaglia, & Corbo, 2014).

The aim of this research was to study the inactivation effect of the combined application of UST, CLEO and mild heat treatment on *S. cerevisiae* in juices and its survival after treatments during 28 days of storage at 5 °C.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples preparation

The oranges were harvested in a local orchard (Beniján, Murcia, Spain). The pomegranates were purchased at local supermarket in Murcia (Spain). The fruits were kept at 5 °C for 1 day before juice extraction. Damaged fruits were discarded. Fruits were washed in cold tap water before drained. OJ was obtained by squeezing (Citro New 100 W, Solac) in aseptic conditions. To obtain PJ, the top and bottom of the pomegranate husks were removed with a disinfected sharp stainless steel knife to prevent microbial contamination. After, pomegranates were cut in halves and arils were hand-separated from the pith. Juice was immediately obtained of the arils with a blender (Ariete Centrika metal 173) in aseptic conditions. Both juices were pasteurized and stored at –20 °C in the dark until treatments.

### 2.2. Measurement of °Brix and pH

pH was measured using a digital pH meter (pH meter 507, Crison) and °Brix were measured using a refractometer (pocket PAL-1, Atago, Japan). Measurements were performed at 25 ± 0.5 °C. All measures were carried out in triplicate.

### 2.3. Cinnamon leaf essential oil (CLEO)

CLEO ( $\rho = 1.0524 \text{ g ml}^{-1}$ ; GC-FID: 74.32% eugenol, 2.98% benzyl benzoate, nominal values) was supplied by Destilerías Muñoz Gálvez, SA (Murcia, Spain). Following the procedure described by Ait-Ouazzou, Espina, García-Gonzalo, and Pagán (2013), a vigorous shaking method by stirrer (TQTECH, multipoint magnetic stirrer, Spain) agitation was used to prepare CLEO suspension in both juices, for sensorial assessments and thermo-UST treatments.

### 2.4. Sensory assessment

In order to select the maximum concentration of CLEO accepted by consumer, OJ and PJ samples with different concentrations of CLEO (0–0.65 mg/ml) were sensorially evaluated. The tests were performed in two different days. Prior to sensory evaluation samples were refrigerated, randomly coded and served (30 ml) at 15 °C together with bottled water without gas (Lanjarón, Spain). The juice samples with different concentrations of CLEO were presented to panelists ( $n = 22$ ) who were asked to describe differences between samples by using a 10-point hedonic scale, where 1 means very much disliked and 10 very much liked. A score of 5 was the minimum threshold for samples acceptability (Walking-Ribeiro, Noci, Cronin, Lyng, & Morgan, 2009).

### 2.5. Microorganism and inocula preparation

The strain of *S. cerevisiae* was isolated and identified by Valverde, Marín-Iniesta, and Calvo (2010) and kept at –80 °C in Microbank™ vials (Pro-labo Diagnostics, Neston, Wirral, UK). Every two months, one of the vials was opened and the stock culture was grown in Trypticase Soy Broth (TSB; Cultimed, Barcelona, Spain) for 24 h at 25 °C. After, it was streaked onto Standard Methods Agar (SMA; Cultimed, Panreac Barcelona, Spain) containing chloramphenicol (Ch) at 0.1 g l<sup>-1</sup> (Tournas, Stack, Mislivec, Koch, & Bandler, 1998). The *S. cerevisiae* inocula were prepared by transferring a colony obtained in SMA-Ch plates to TSB, which was incubated for 24 h at 25 °C before being stored at –20 °C in a solution of 40% TSB and 60% glycerol until use. The fresh cultures for the experiments were made by incubating one loopful of pure culture in TSB for 24 h at 25 °C. The inocula were standardized by dilution in TSB until an optical density (OD) of 0.1 at 600 nm (Nicolet Evolution 300, Thermo Electron Corporation VIS-UV spectrophotometer) was reached to obtain a yeast concentration of 10<sup>7</sup> cfu ml<sup>-1</sup>. The yeast populations were estimated by spreading suitable diluted aliquots onto SMA-Ch plates, followed by incubation at 25 °C for 48 h.

### 2.6. Thermo-UST treatments on both juices with CLEO

Thermal and ultrasonic treatments were carried out separately and in combination in a double-wall cylindrical vessel in which water was circulated with a thermostatic bath (Digiterm 100, PSelecta®) to fix temperatures close to 50 °C in the samples. A sterile thermometer was used to measure the temperature in the samples. UST (24 kHz; 105  $\mu\text{m}$ ; 33.31 W ml<sup>-1</sup>; 30 min) was continuously applied with a UP200H ultrasonic processor (Hielscher Ultrasound Technology) using a S3 probe (Hielscher). The effect of the ultrasonic treatment at 50 °C (30 min) was also tested with 0.02 mg/ml of CLEO (maximum concentration accepted by panelists). For each treatment (Table 1), a population of yeasts ( $\sim 10^5$  cfu ml<sup>-1</sup>) was inoculated to juice samples previously heated to the desired temperature (Gastélum et al., 2012). The viable cell counts were determined immediately after 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min of treatment using the pouring method on SMA-Ch. Two plates were used for each decimal dilution and were incubated at 25 °C for 48 h. All experiments were performed by triplicate.

D-values of *S. cerevisiae* in treated juices were calculated from the survival curve slopes obtained by plotting the log reduction  $\log N_0/N$  (where  $N_0$  is the initial microorganism concentration and  $N$  is the surviving microorganisms) as a function of time.

**Table 1**  
Experimental design of the treatments in natural juices.

Samples	Overall treatment duration (°)	Temperature (50 °C)	CLEO 0.02 mg/ml	US (24 kHz; 105 µm; 33.31 W ml <sup>-1</sup> )
Control 1	–	–	–	–
Control 2	–	–	+	–
S1	30 min	+	–	–
S2	30 min	+	+	–
S3	30 min	+	–	+
S4	30 min	+	+	+

<sup>a</sup> Samples were taken at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min.

### 2.7. *S. cerevisiae* survival in treated natural orange and pomegranate juices during storage at 5 °C (28 days)

The methodology used in this study was based on previous works (Ferrario, Alzamora, & Guerrero, 2015; Valero et al., 2007) slightly modified. Immediately after treatments, the replicates of controls (Control 1, Control 2) and treated (S1, S2, S3, S4) samples were aseptically packaged into screw-top 50-ml polypropylene containers and they were stocked in a refrigerator at 5 °C. The samples were analyzed after 4, 7, 11, 18, 21, 25 and 28 days of storage at 5 °C. From previously agitated samples, 1 ml aliquots were removed at each incubation period, decimal dilutions were made, and counts of *S. cerevisiae* were performed as previously described. Two plates were used for each dilution and were incubated at 25 °C for 48 h.

### 2.8. Statistical analysis

A two-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test were used for the comparison of treatment effects on *S. cerevisiae*. For the sensory assessment, one-way analysis of variance was used. Significance was defined at  $p < 0.05$ . These analyses were conducted with the Statgraphic Plus for Windows 3.0<sup>®</sup>, version 5.0 (StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sensory assessment

The sensory analysis of OJ (pH:  $3.61 \pm 0.01$ ; °Brix:  $13.3 \pm 0.15$ ) and PJ (pH:  $4.31 \pm 0.09$ ; °Brix:  $15.72 \pm 0.08$ ) is showed in Table 2. The samples with concentrations  $\geq 0.04$  mg/ml of CLEO were rejected by all the panelists. These observations were related with significantly negative changes in aroma and flavour of both juices. The maximum concentration accepted by panelists (0.02 mg/ml) was used to study the inactivation of *S. cerevisiae* in both juices.

During PJ preparation, whose bright red color is due to

anthocyanins (Türkyılmaz, Taği, Dereli, & Özkan, 2013), it was noted a shift from red to light brown color that could be caused for the oxidation of anthocyanins and ascorbic acid. Oxidation of ascorbic acid produces hydrogen peroxide that may react with anthocyanins to form undesirable breakdown products. Furthermore, anthocyanins and ascorbic acid are mutually destructive in the presence of oxygen, and oxygen is an essential requirement in the loss of color of anthocyanidins by ascorbic acid (García-Viguera & Bridle, 1999). During sensory analysis, a color change (from light brown to red) in PJ with the highest concentrations of CLEO was detected; this significant change was positively evaluated by panelists (Table 2). This color change could be due to antioxidant capacity of EOs (Nuncio-Jáuregui et al., 2015, chap. 76). Specifically, CLEO antioxidant activity can be attributed to their phenolic compounds as eugenol (Brewer, 2011).

### 3.2. Thermo-UST treatments on both juices with CLEO

Fig. 1 shows the inactivation of *S. cerevisiae* in OJ (1a) and PJ (1b) by application of temperature (S1), temperature with CLEO (S2), thermo-UST (S3), and thermo-UST with CLEO (S4). All the treatments lasted 30 min. In both juices, the highest inactivation was obtained in the samples treated by combination of UST and 0.02 mg/ml of CLEO at 50 °C. This combination yielded  $2.52 \pm 0.26$  and  $2.81 \pm 0.19$  log reductions of *S. cerevisiae* in OJ and PJ respectively. In OJ, UST was the only factor with a statistically significant effect ( $p < 0.05$ ) on inactivation of *S. cerevisiae* at 50 °C. In PJ, UST, CLEO and their combination (CLEO + UST) had a statistically significant effect ( $p < 0.05$ ) on inactivation of *S. cerevisiae* at 50 °C.

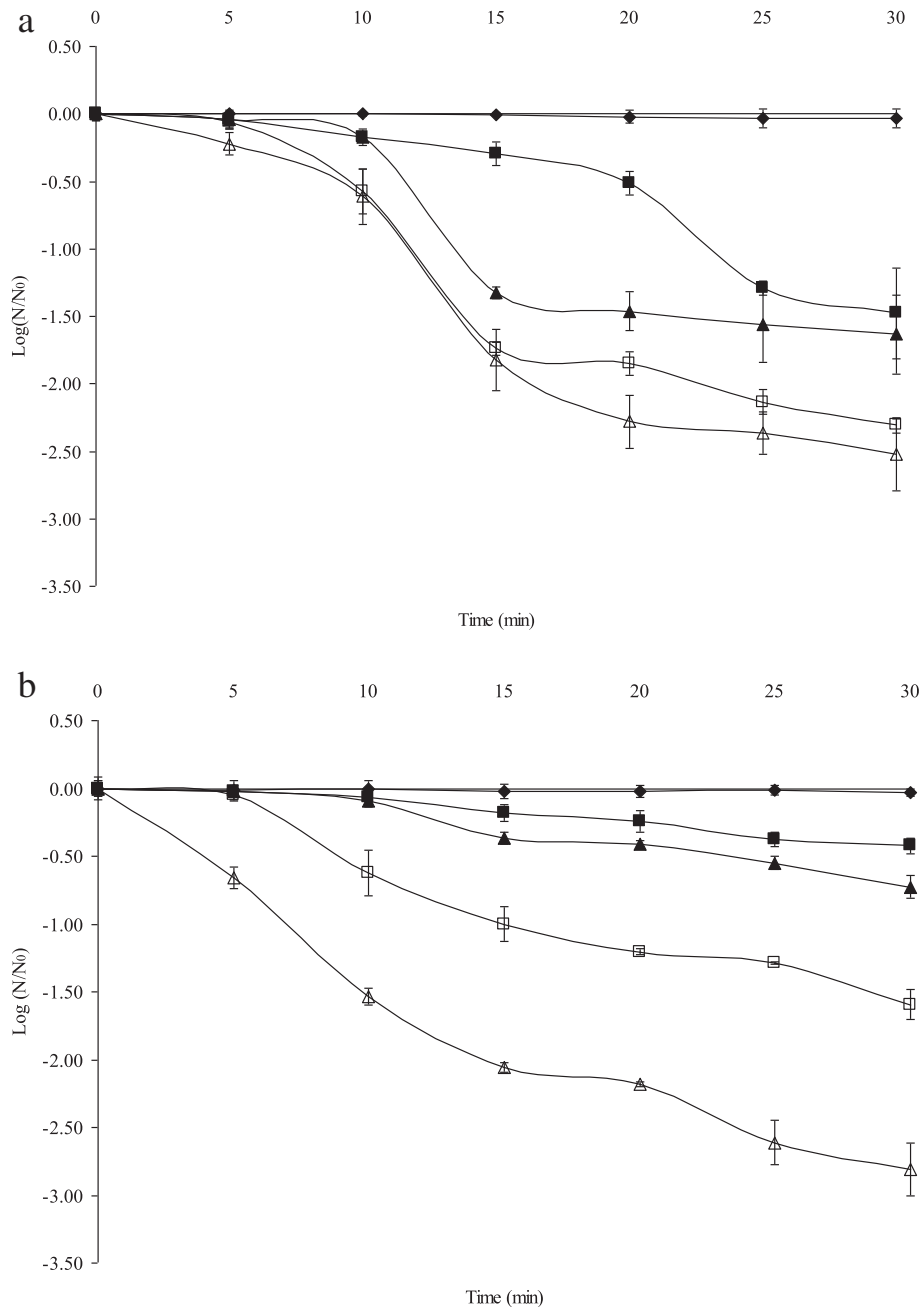
Table 3 shows the decimal reduction times (D-values) of *S. cerevisiae* at 50 °C in both juices. In OJ, UST had a statistically significant effect ( $p < 0.05$ ) on *S. cerevisiae* D-values. For OJ, D-values reduction percentages at 50 °C were 21% with the application of CLEO, 54% with the application of UST and 75% with the combination of UST and CLEO. In PJ, UST, CLEO and their combination (CLEO + UST) had a statistically significant effect ( $p < 0.05$ ) on *S. cerevisiae* D-values. For PJ, D-values reduction percentages at 50 °C

**Table 2**  
Sensory assessment of orange (OJ) and pomegranate (PJ) juices with sub-inhibitory concentrations of CLEO (n = 22).

		CLEO (mg/ml)					
		0	0.02	0.04	0.08	0.16	0.65
Color	OJ	$7.95 \pm 1.21^a$	$7.91 \pm 1.11^a$	$8.05 \pm 0.84^a$	$7.86 \pm 1.04^a$	$7.73 \pm 1.08^a$	$7.77 \pm 1.07^a$
	PJ	$4.00 \pm 1.66^a$	$3.86 \pm 2.10^{ab}$	$4.68 \pm 1.52^b$	$5.95 \pm 2.80^c$	$6.59 \pm 1.94^c$	$7.23 \pm 1.60^c$
Aroma	OJ	$8.05 \pm 1.43^a$	$5.82 \pm 1.47^b$	$3.68 \pm 2.40^c$	$3.00 \pm 2.00^c$	$1.68 \pm 1.99^d$	$0.90 \pm 1.79^d$
	PJ	$6.82 \pm 1.89^a$	$5.18 \pm 2.02^b$	$3.14 \pm 2.10^c$	$2.68 \pm 2.28^c$	$2.05 \pm 2.10^{cd}$	$1.10 \pm 1.30^d$
Taste	OJ	$8.09 \pm 1.19^a$	$5.55 \pm 1.14^b$	$3.09 \pm 2.29^c$	$2.55 \pm 2.15^c$	$1.45 \pm 2.18^d$	$0.64 \pm 0.85^d$
	PJ	$7.64 \pm 1.29^a$	$5.23 \pm 1.88^b$	$1.68 \pm 1.09^c$	$1.18 \pm 1.10^c$	$1.82 \pm 2.38^{cd}$	$0.41 \pm 0.59^d$
Texture	OJ	$7.55 \pm 1.18^a$	$7.32 \pm 1.55^{ab}$	$7.05 \pm 1.56^{abc}$	$6.64 \pm 1.50^{abc}$	$6.23 \pm 1.97^{cd}$	$6.09 \pm 2.16^d$
	PJ	$6.23 \pm 1.51^a$	$5.86 \pm 1.49^a$	$6.23 \pm 0.87^a$	$5.41 \pm 1.68^a$	$6.23 \pm 1.48^a$	$5.91 \pm 1.02^a$
Overall	OJ	$8.14 \pm 1.25^a$	$5.64 \pm 1.05^b$	$3.82 \pm 2.36^c$	$2.77 \pm 2.11^d$	$1.77 \pm 2.00^d$	$0.68 \pm 0.99^e$
	PJ	$7.50 \pm 1.60^a$	$5.14 \pm 1.32^b$	$2.59 \pm 1.37^c$	$2.45 \pm 1.99^c$	$1.73 \pm 1.91^c$	$0.36 \pm 0.49^d$

Different letters mean significantly different ( $P < 0.05$ ) for each row.





**Fig. 1.** Survival of *S. cerevisiae* in orange (a) and pomegranate (b) juices without or with CLEO and treated by thermo-US (◆ control; ■ S1: 50 °C; ▲ S2: 50 °C + 0.02 mg/ml CLEO; □ S3: 50 °C + US; △ S4: 50 °C + 0.02 mg/ml CLEO + US). Control 1 and Control 2 did not have any difference between them.

**Table 3**  
Decimal reduction times (D50 °C min) of *S. cerevisiae* in natural juices.

	S1	S2	S3	S4
OJ	19.27 ± 4.02 <sup>a</sup>	15.15 ± 4.17 <sup>a</sup>	11.35 ± 0.48 <sup>b</sup>	10.35 ± 1.30 <sup>b</sup>
PJ	65.36 ± 7.42 <sup>a</sup>	49.37 ± 1.93 <sup>b</sup>	17.86 ± 1.24 <sup>c</sup>	10.80 ± 0.77 <sup>d</sup>

Mean of 3 replications. Values followed by the different letter, in the same row, were significantly different ( $p < 0.05$ ), multiple contrast ranges (Duncan test). (S1: 50 °C), (S2: 50 °C + 0.02 mg/ml CLEO), (S3: 50 °C + US), (S4: 50 °C + 0.02 mg/ml CLEO + US).

were 40% with the application of CLEO, 84% with the application of UST and 97% with the combination of UST and CLEO.

The composition of juices treated by thermo-UST could affect the inactivation of *S. cerevisiae* (Bermúdez-Aguirre & Barbosa-

Cánovas, 2012). PJ is rich in anthocyanins and tannins (Li et al., 2015), which have antimicrobial activity (Cowan, 1999; Puupponen-Pimiä et al., 2001; Türkylmaz et al., 2013). Cowan (1999) suggested that the antimicrobial properties of tannins might be related to their ability to inactivate microbial enzymes and cell envelope transport proteins or to their capacity of link with microbial polysaccharides. The antimicrobial activity of anthocyanins is probably due to their ability to complex with extracellular soluble proteins and with bacterial cell walls (Cowan, 1999; Puupponen-Pimiä et al., 2001). Thus, when we combined UST and CLEO at 50 °C, as well as the presence of tannins and anthocyanins in the PJ, all these factors would act synergistically in the inactivation of *S. cerevisiae*, and we obtained a higher log reduction in PJ than in OJ.

The combination of UST with heat (35–60 °C) at different wave amplitudes (71–107.1  $\mu\text{m}$ ), W  $\text{ml}^{-1}$  values (0.33–167.72) and treatment time (10–200 min), improves the inactivation of *S. cerevisiae* and fungi spores (*Aspergillus flavus* and *Penicillium digitatum*) getting smaller D-values (from 78.7 min to 2.0 min). The inactivation of fungi spores is even greater in the presence of vanillin (0.5 mg/ml) during thermo-UST, resulting in lower D-values (from 78.7 to <0.5 min) (Ciccolini, Taillandier, Wilhelm, Delmas, & Strehaiano, 1997; Guerrero et al., 2001a; López-Malo, Guerrero, & Alzamora, 1999; López-Malo et al., 2005b). Our results are in accordance with previous authors, because we obtained the lowest D-values in both juices when we combined 50 °C, CLEO and UST.

There are few data on inactivation of *S. cerevisiae* by thermo-UST in juices, because the most of the researches has been done in culture broth (Ciccolini et al., 1997; Guerrero et al., 2001a, 2005; Luo, Schmid, Grbin, & Jiranek, 2012; López-Malo et al., 1999, 2005b; Marx et al., 2011). The effect of UST combined with mild temperatures (20–44 °C) at different wave amplitudes (20–120  $\mu\text{m}$ ), acoustic energies (max. 600 W) and times (10–30 min) in juices inoculated with different strains of *S. cerevisiae* ( $10^5$ – $10^6$  log cfu  $\text{ml}^{-1}$ ) have been studied and log reductions ranged between 1 and 2.5 were achieved (López-Malo, Guerrero, Santiesteban, & Alzamora, 2005a; Zinoviadou et al., 2015). Bermúdez-Aguirre and Barbosa-Cánovas (2012) studied the inactivation of *S. cerevisiae* ( $10^7$  log cfu  $\text{ml}^{-1}$ ) under thermo-UST (24 kHz, 400 W, 120  $\mu\text{m}$ , 10 min; 40 °C, 50 °C, 60 °C) in commercial juices and obtained ~1.2 log reductions in continuously sonicated pineapple juice at 50 °C. Our results agree with previous authors: when we applied UST at 50 °C we obtained 2.30 and 1.59 log reductions in OJ and PJ respectively.

According with bibliography, the use of natural antimicrobials has been highly effective for enhancing the lethal UST effect on bacteria in juices. Ferrante, Guerrero, and Alzamora (2007) studied the combined use of UST (600 W, 20 kHz, 95.2  $\mu\text{m}$ ) at 45 °C and antimicrobials (vanillin and/or citral) to inactivate *Listeria monocytogenes* ( $\sim 10^6$  cfu  $\text{ml}^{-1}$ ) in OJ (pH3.5) and achieved ~2.8 log reductions in OJ treated by UST (30 min), ~3.4 log reductions by combination of UST and 1.5 mg/ml of vanillin (15 min) and ~6 log reductions by combination of UST + 0.1 mg/ml citral + 1.5 mg/ml vanillin (7 min). Our results agree with previous authors, because when we treated both juices with UST at 50 °C, we obtained 2.30 and 1.59 log reductions in OJ and PJ respectively, and when we applied in UST + 0.02 mg/ml of CLEO at 50 °C, we obtained 2.52 and 2.81 log reductions in OJ and PJ respectively. It is important to note that, unlike previous authors, the concentration of EO used in our study (0.02 mg/ml) has no negative sensorial effect on the juices.

Our results suggest that the combination of UST, mild temperature and CLEO would have a synergistic effect on the inactivation of *S. cerevisiae* in both juices. The mechanism of action of EOs and UST on microbial membrane and wall has been explained by different authors. The cell membrane is the primary target of bioactive compounds of plant extracts (Lanciotti et al., 2004), and phenolic compounds, which have a lipophilic nature, could accumulate in the lipid bilayer of the cell membrane, disturbing and sensitizing the membrane to UST action (Brul & Coote, 1999). Also the cavitation generated by UST could improve the antimicrobial action of EOs by weakening the microbial and yeast cell walls (Ferrante et al., 2007; Lanciotti et al., 2004).

The principal constituent of CLEO used in this study was eugenol (74.32% nominal value); a similar composition and percentage were found by Suhr and Nielsen (2003). The main antimicrobial activity of CLEO could be attributed to eugenol which has an aromatic nucleus and –OH group that are reactive with –SH groups in the active sites of enzymes, causing its inactivation (Sukatta,

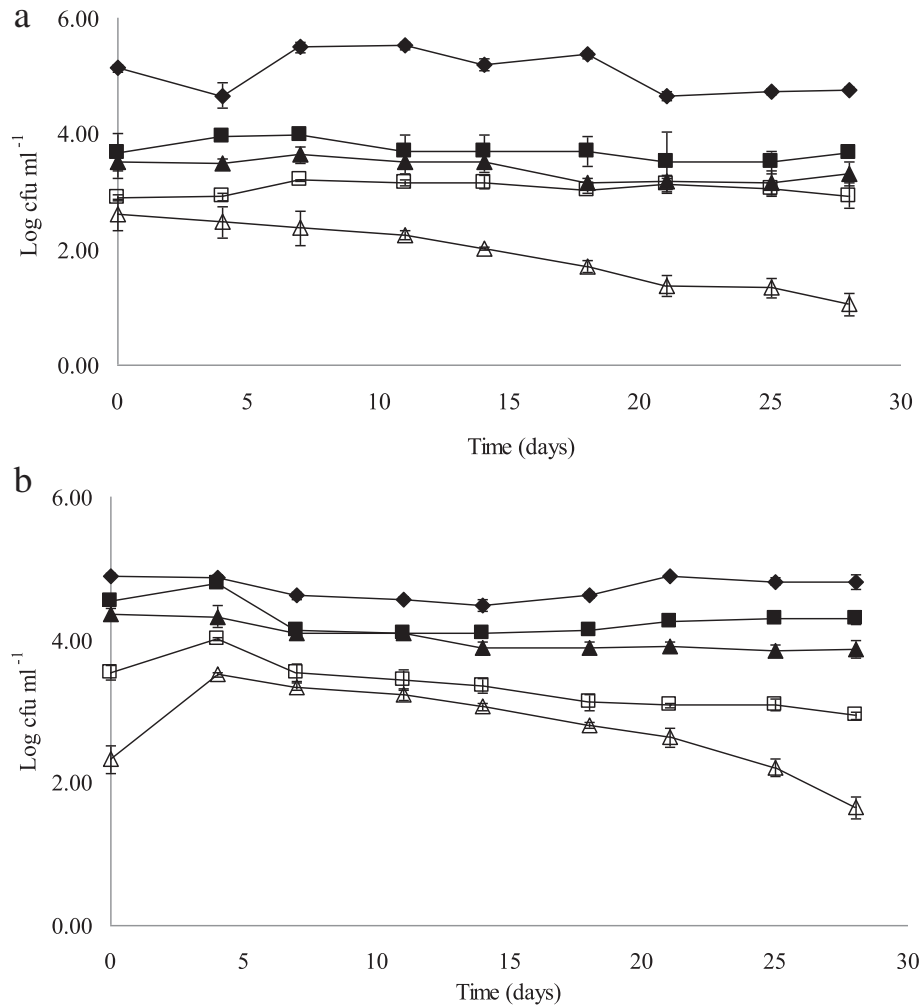
Haruthaithanasan, Chantarapanont, Dilokkunanant, & Suppakul, 2008). Other authors (Bennis, Chami, Chami, Bouchikhi, & Remmal, 2004) concluded that antifungal activity of eugenol involves alterations of both membrane and cell wall of *S. cerevisiae*. Darvishi, Omid, Bushehri, Golshani, and Smith, (2013) reported that eugenol interferes with transporters responsible for uptake of aromatic and branched-chain amino acids across the *S. cerevisiae* cytoplasmic membrane.

Zinoviadou et al. (2015) informed that the antimicrobial mechanism of action of UST is based on the formation of reactive species and free radicals, as well as on cavitation. The cavitation effect depends on liquid properties (vapour pressure, surface tension, viscosity) and can be diminished with larger amplitudes (Ciccolini et al. 1997; Luo et al., 2012; López-Malo et al., 1999); and an increase in temperature above 50 °C reduces the intensity of cavitation (López-Malo et al., 1999) affecting microbial inactivation (Ferrante et al., 2007). The lethality of UST depends on wave amplitude, intensity, power and temperature (Guerrero et al., 2001a; López-Malo et al., 1999; López-Malo et al., 2005b) and thermo-UST provoked wall rupture or fragmentation, and cytological disruption of organelles (Guerrero et al., 2001a, 2005). The inactivation effect of UST combined with antimicrobials has been reported to depend on the nature of antimicrobial agent and its concentration, culture media, pH, aw, amplitude, UST power and microorganism (Bevilacqua et al., 2014; Ferrante et al., 2007; Gastélum et al., 2012; Guerrero, Tognon, & Alzamora, 2001b; Guerrero et al., 2005; López-Malo et al., 2005a, 2005b).

Our results agree with the later authors because when we combined temperatures close to 50 °C, CLEO and UST, we obtained the highest log reduction in both juices, and we also detected that the inactivation depended on the composition and physico-chemical properties of both studied juices.

### 3.3. *S. cerevisiae* survival in treated juices during 28 days of storage at 5 °C

Fig. 2 shows the evolution of surviving cells along refrigerated storage (5 °C, 28 days) in controls and treated samples, which were kept under refrigeration after applying treatments. At “time 0” there are the counts obtained at the end of the different treatments applied in section 2.6 (Fig. 1). The two factors (UST, CLEO) and their combination (UST + CLEO) at 50 °C had a significant effect on *S. cerevisiae* survival in both juices. Control samples kept the yeast population without significant changes in the refrigerated storage for 28 days at 5 °C. The lowest counts were obtained in OJ (2a) and PJ (2b) samples treated by combination of UST and 0.02 mg/ml CLEO at 50 °C and kept at 5 °C. During this period, while samples S1, S2 and S3 kept similar levels of yeast population without significant changes in both juices, sample S4 treatment (50 °C + UST + 0.02 mg/ml CLEO) significantly decreased the population of yeast in the OJ throughout the entire storage period. But for PJ, the same effect was not observed, because there was an increase in the count of *S. cerevisiae* on day 4, followed by a decrease at the end of the refrigerated storage period. Concretely, the *S. cerevisiae* population in OJ and PJ samples, treated with UST and CLEO at 50 °C for 30 min, decreased  $1.55 \pm 0.19$  and  $0.68 \pm 0.16$  log respectively at the end of the refrigerated storage. The difference in *S. cerevisiae* population between the controls and the treated S4 samples was of 2.54 and 2.57 log in OJ and PJ respectively. Under our experimental conditions, the combination of 0.02 mg/ml of CLEO and UST at 50 °C had a significant effect on *S. cerevisiae* inactivation and survival in both juices. Few reports are available in the literature about the evolution of *S. cerevisiae* in juices with EOs treated by thermo-UST and kept under refrigerated storage. Ferrario et al. (2015) determined that the combination of UST + 20s pulsed light at  $44 \pm 1$  °C (10 min)



**Fig. 2.** Evolution of *S. cerevisiae* cells in orange (a) and pomegranate (b) juices kept under refrigeration (28 days, 5 °C) (◆ control; ■ S1: 50 °C; ▲ S2: 50 °C + 0.02 mg/ml CLEO; □ S3: 50 °C + US; △ S4: 50 °C + 0.02 mg/ml CLEO + US). Control 1 and Control 2 did not have any difference between them.

led to 3.6 log reductions of *S. cerevisiae* inoculated in apple juices, but after 15 days of storage at 5 °C, the population was able to recover 1.1 log-cycles. Valero et al. (2007) determined that refrigerated storage at 5 °C was not effective in controlling the growth of mesophilic aerobic and fungi up to 42 days of storage in OJ subjected to UST.

According with our results, the combination of CLEO, thermo-UST and composition of juices have a positive effect on control of *S. cerevisiae* during refrigerated storage. The bibliography shows that CLEO and UST would weak the membrane and wall cell (Brul & Coote, 1999; Ferrante et al., 2007) and CLEO active components could penetrate into cell and improve their antimicrobial action during refrigerated storage. Regarding bioactive components of juices, the bibliography shows that long storage at 5 °C of commercial PJs negatively affected the contents of anthocyanins with diminution of ~15% (Nuncio-Jáuregui et al., 2015) and that UST treatment (20 kHz, 100 W, 50% duty cycle, 15 min, <30 °C) and refrigerated storage (10 weeks, 4 °C) preserved the total phenolic and antioxidant activity of juices during storage respect to untreated or pasteurized control samples (Khandpur & Gogate, 2015). Differences in composition and stability of antimicrobial compounds, as anthocyanins, could explain that after treatments and at the end of the refrigerated storage, we obtained different counts in OJ and PJ samples subjected to different treatments (controls, S1, S2, S3 and S4) and kept at 5 °C for 28 days.

#### 4. Conclusions

In the treatments tested, we have achieved effective inactivation of *S. cerevisiae* with a concentration of CLEO in the juices (0.02 mg/ml) accepted by consumers. The highest inactivation of *S. cerevisiae* was achieved in samples treated by combination of UST + 0.02 mg/ml CLEO at 50 °C. Compared to the control treatment at 50 °C, the combined treatment of UST + CLEO + 50 °C obtained a D-value reduction of 75% for OJ and 97% for PJ. The surviving cells of *S. cerevisiae* in samples treated by combination of UST + 0.02 mg/ml CLEO at 50 °C decreased in comparison with the others treatments during refrigerated storage, which kept the survivor population without significant changes during this period. The *S. cerevisiae* inactivation rate in the juices and later survival in refrigeration could depend on pH and bioactive components, as anthocyanins and tannins, of the juices. Additional research is needed to understand the effect of bioactive components of juices in yeast inactivation and its survival during refrigerated storage.

#### References

- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2013). Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. *Food Control*, 32, 159–167.
- Bennis, S., Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., & Remmal, A. (2004). Surface

- alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 454–458.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108, 383–392.
- Bevilacqua, A., Speranza, B., Campaniello, D., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2014). Inactivation of spoiling yeasts of fruit juices by pulsed ultrasound. *Food and Bioprocess Technology*, 7(8), 2189–2197.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221–247.
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Cava-Roda, R. M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M. T., & Marín-Iniesta, F. (2012b). 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(6), 2120–2131.
- Cava-Roda, R. M., Taboada, A., Palop, A., López-Gómez, A., & Marín-Iniesta, F. (2012a). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim milk supplemented with vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 314–318.
- Chemat, F., Huma, Z., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835.
- Ciccolini, L., Taillandier, P., Wilhem, A. M., Delmas, H., & Strehaiano, P. (1997). Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and of ultrasonic power. *Chemical Engineering Journal*, 65, 145–149.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
- Darvishi, E., Omid, M., Bushehri, A. A. S., Golshani, A., & Smith, M. L. (2013). The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. *PLOS One*, 8(10), e76028. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076028>.
- Ferrante, S., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (2007). Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1850–1856.
- Ferrario, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, 46, 635–642.
- García-Viguera, C., & Bridle, P. (1999). Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 64, 21–26.
- Gastélum, G. G., Avila-Sosa, R., López-Malo, A., & Palou, E. (2012). *Listeria innocua* multi-target inactivation by thermo-sonication and vanillin. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 665–671.
- Guerrero, S., López-Malo, A., & Alzamora, S. M. (2001a). Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 31–39.
- Guerrero, S., Tognon, M., & Alzamora, S. M. (2005). Modeling the response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Food Control*, 16, 131–139.
- Guerrero, S., Tognon, M., & Alzamora, S. M. (2001b). *Ultrasound and natural antimicrobials: inactivation of Saccharomyces cerevisiae by the combined treatment*. New Orleans, USA: Institute of Food Technologists Annual Meeting.
- Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Wu, T., Hashim, M. M., Lei, S., et al. (2014). Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. *LWT – Food Science and Technology*, 55, 16–21.
- Khandpur, P., & Gogate, P. R. (2015). Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 125–136.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., & Giardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 201–208.
- Li, X., Wasila, H., Liu, L., Yuan, T., Gao, Z., Zhao, B., et al. (2015). Physicochemical characteristics, polyphenol compositions and antioxidant potential of pomegranate juices from 10 Chinese cultivars and the environmental factors analysis. *Food Chemistry*, 175, 575–584.
- López-Malo, A., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* thermal inactivation kinetics combined with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 62(10), 1215–1217.
- López-Malo, A., Guerrero, S. N., Santiesteban, A., & Alzamora, S. M. (2005a). Inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* and *Listeria monocytogenes* in apple juice processed by novel technologies. In *Proceedings of the 2nd Mercosur congress on chemical engineering. CD-ROM, E-papers* (p. 20). Servicios Editoriales. Available at: <http://www.e-papers.com.br>.
- López-Malo, A., Palou, E., Jiménez-Fernández, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2005b). Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and Antimicrobials. *Journal of Food Engineering*, 67, 87–93.
- Luo, H., Schmid, F., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2012). Viability of common wine spoilage organisms after exposure to high power ultrasonics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 415–420.
- Marx, G., Moody, A., & Bermúdez-Aguirre, D. (2011). A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermo-sonication. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 327–337.
- Nuncio-Jáuregui, N., Calín-Sánchez, Á., Vázquez-Araujo, L., Pérez-López, A. J., Frutos-Fernández, M. J., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2015). Processing pomegranates for juice and impact on bioactive components. In *Processing and impact on active components in food* (pp. 629–636). London, UK: Elsevier (Chapter 76) <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00076-7>.
- Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 207–216.
- Prakash, B., Singh, P., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2012). Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 183–191.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., et al. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494–507.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), 157–180.
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 323–331.
- Stinco, C. M., Baroni, M. V., Di Paola Naranjo, R. D., Wunderlin, D. A., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J., et al. (2015). Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 1–10.
- 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(4), 665–674.
- Sukatta, U., Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, W., Dilokkunanant, 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.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., & Cullen, P. J. (2009). Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 700–704.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2008). Color degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 1876–1883.
- Tournas, V., Stack, M. E., Mislivec, P. B., Koch, H. A., & Bandler, R. (1998). Yeasts, molds and mycotoxins. In R. I. Merker (Ed.), *Bacteriological analytical manual* (8th ed.). Silver Spring, MD, USA: FDA. Revision A. (Chapter 18) <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm>.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvolgyi, C., et al. (2011). Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 480–486.
- Türkyılmaz, M., Taği, Ş., Dereli, U., & Özkan, M. (2013). Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1810–1818.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3274–3280.
- Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., & Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80, 509–516.
- Valverde, M. T., Marín-Iniesta, F., & Calvo, L. (2010). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. *Journal of Food Engineering*, 98, 421–428.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2009). Shelf life and sensory evaluation of orange juice after exposure to thermosonication and pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 87, 102–107.
- Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M., Brncić, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M. J., et al. (2015). Fruit juice sonication: implications on food safety and physico-chemical and nutritional properties. *Food Research International*, 77(4), 743–752.