



Universidad
Politécnica
de Cartagena



**Máster Universitario en
Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario**

**Evaluación del efecto combinado de los
antimicrobianos naturales nisina, *D*-limoneno,
glucósido de steviol y citral sobre *Listeria
monocytogenes* en alimentos de origen vegetal**

Alumno:

Leonardo Emilio Payán Saldívar

Directora:

D^a. Paula M. Periago Bayonas

Cartagena, Julio de 2014



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

D^a. Paula M. Periago Bayonas

EN CALIDAD DE DIRECTORA INFORMA:

Que el trabajo titulado “**Evaluación del efecto combinado de los antimicrobianos naturales nisina, D-limoneno, glucósido de steviol y citral sobre *Listeria monocytogenes* en alimentos de origen vegetal**”, ha sido realizado por D. Leonardo Emilio Payán Saldívar, bajo dirección y supervisión mía y de D. Javier Maté Sánchez de Val y que se autoriza al alumno a la defensa del mismo.

En Cartagena, a 30 de Mayo de 2014

Fdo.: _____

INDICE

Contenido	Pág.
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción y objetivos	6
2. Materiales y métodos	13
2.1 Preparación del inóculo	14
2.2 Pruebas de halos de inhibición	14
2.3 Antimicrobianos	15
2.4 Elaboración de bebida formulada	16
2.5 Elaboración de curvas de crecimiento mediante recuento de células viables	16
2.6 Elaboración de curvas de crecimiento mediante lectura de densidad óptica	17
2.7 Evaluación de daño subletal	18
3. Resultados y discusión	19
3.1 Evaluación de halos de inhibición de los antimicrobianos	20
3.2 Curvas de crecimiento mediante lectura de densidad óptica	21
3.3 Curvas de crecimiento mediante recuento de células viables en TSB	28
3.4 Evaluación de daño subletal	32
3.5 Curvas de crecimiento en productos de origen vegetal	33
4. Conclusiones	38
5. Anexos	40
5.1 Legislación y datos sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	41
5.2 Reglamento (UE) No 1129/2011 de la Comisión Europea de 11 de noviembre de 2011 y Normas Alimentarias FAO/OMS Codex Alimentarius	42
6. Bibliografía	45

RESUMEN

La seguridad alimentaria es un tema primordial para la industria alimentaria; el consumidor actual cada vez demanda más productos procesados, inocuos y de alta calidad organoléptica, pero al mismo tiempo rechaza progresivamente los aditivos sintéticos debido a los efectos adversos para la salud que se atribuyen a éstos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de distintos antimicrobianos naturales contra el microorganismo *Listeria monocytogenes*. Este estudio muestra el efecto de estos antimicrobianos contra dicho microorganismo, tanto de manera independiente como combinada, en medio de cultivo TSB y en alimentos de origen vegetal; modificando además ciertos parámetros fisicoquímicos como el pH y la temperatura. Los resultados obtenidos evidenciaron un efecto sinérgico al combinar la nisina y el *D*-limoneno, el cual fue más notorio al disminuir el pH del medio. Dichos resultados muestran la inhibición del crecimiento microbiano al combinar 0.075 µM de nisina con 1 mM de *D*-limoneno cuando partimos de una concentración inicial del microorganismo de 10³ UFC/mL en TSB a pH 7, mientras que esta inhibición se obtuvo a concentraciones más bajas de los antimicrobianos a pH de 5.5 tanto en TSB como en los alimentos utilizados. Tras comprobar la efectividad de estos antimicrobianos al aplicarse de manera conjunta, sería interesante continuar realizando investigaciones con el objetivo de perfeccionar su aplicación en la industria alimentaria y así solventar los problemas planteados en la actualidad para su uso.

Palabras Claves:

Seguridad Alimentaria, efecto sinérgico, productos de origen vegetal, antimicrobianos naturales, *Listeria monocytogenes*, nisina, *D*-limoneno, citral, glucósido de steviol.

ABSTRACT

Food safety is a major issue for the food industry; today's consumer increasingly demand more processed, safe and high organoleptic quality products, but at the same time rejects gradually synthetic additives due to the adverse health effects that are attributed to these. The main objective of this study was to evaluate the effect of a variety of natural antimicrobials against the microorganism *Listeria monocytogenes*. This study shows the effect of these antimicrobials against *L. monocytogenes*, both separately and combined, in a TSB medium and in plant origin food; modifying in addition certain physicochemical properties, such as pH and treatment temperature. The results obtained indicate a synergistic effect by combining nisin and *D*-limonene, which was most noticeable by lowering the pH of the medium. These results show the microbial growth inhibition by combining 0.075 μ M of nisin with 1 mM of *D*-limonene when we have an initial concentration of microorganism of 10^3 CFU/mL in TSB at pH 7, while this inhibition was obtained at lower antimicrobials' concentrations in TSB and in food product both at pH 5.5. After proving the effectiveness of the application of these antimicrobials jointly, it would be interesting to continue conducting investigations with the aim of perfecting its application in the food industry and thus solve the problems raised actually for its use.

Keywords:

Food safety, synergistic effect, plant origin products, natural antimicrobials, *Listeria monocytogenes*, nisin, *D*-limonene, citral, steviol glycoside.

1. INTRODUCCION

La contaminación microbiana de los alimentos desde hace mucho tiempo ha presentado un problema de salud pública importante en todo el mundo, pues sigue siendo una fuente principal de enfermedades transmitidas por alimentos para los seres humanos y causa graves pérdidas económicas para la industria alimentaria [1]. Debido a esto, es primordial encontrar alternativas de desinfección y conservación de los alimentos que sean saludables, sostenibles y aceptadas por el consumidor. Tradicionalmente las empresas dedicadas a la producción de alimentos han solventado este problema mediante el uso de antimicrobianos de origen sintético además de otros tratamientos; sin embargo, desde hace tiempo se atribuye el aumento de la prevalencia de ciertas enfermedades y padecimientos al uso de estos aditivos.

Actualmente el uso de antimicrobianos es una práctica común en la industria alimentaria; los aditivos sintéticos o químicos son los más usados en la industria, generando rechazo por parte de los consumidores quienes demandan alimentos conservados naturalmente [2], por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda, se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural como sustitutos de los tradicionalmente utilizados. Algunos antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad [3].

Así pues, los antimicrobianos continúan estando entre los aditivos alimentarios más importantes. Actualmente, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente procesados, está aumentando el interés por los antimicrobianos de origen natural que puedan extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad para el consumidor [3]. De todos modos cabe mencionar que la mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos o fungistáticos, en lugar de bactericidas o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada. Por otra parte, debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, puede ser preferible utilizar una combinación de ellos [3]. En este estudio nos vamos a centrar en el

uso de antimicrobianos de origen natural contra *Listeria monocytogenes* como alternativa al uso de antimicrobianos sintetizados químicamente.

Se seleccionó el microorganismo *Listeria monocytogenes* debido a que es uno de los principales microorganismos patógenos presentes en alimentos y ha provocado un alto índice de hospitalización y de mortandad [4]. Este patógeno puede cursar con una amplia sintomatología en humanos, afectando principalmente a individuos inmunológicamente comprometidos, personas ancianas, mujeres embarazadas y neonatos [4]. En los Estados Unidos, se estima que cada año 1600 personas se enferman gravemente de listeriosis y 260 de ellas mueren [5]. Ha sido difícil conseguir la eliminación completa de *Listeria monocytogenes* de las instalaciones de procesado de alimentos debido a que este patógeno está ampliamente distribuido en la naturaleza y puede sobrevivir bajo condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad [6, 7]. La interacción entre microorganismos adheridos a superficies puede interferir o promover la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* y su desarrollo. Este microorganismo es generalmente susceptible a un amplio rango de antimicrobianos [8], es uno de los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos y se encuentra regulado en la legislación vigente del Reglamento U.E. 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables (**Ver Anexo 1**).

Muchos han sido los estudios orientados a la aplicación de antimicrobianos de origen natural contra este microorganismo, a las concentraciones más bajas efectivas y considerando otros factores que puedan contribuir al efecto de los mismos. Como antecedentes, podemos mencionar el trabajo de S. Burt (2004), quien demostró el efecto antibacteriano de un conjunto de aceites esenciales contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli O157:H7*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* [9]; “Takahashi et al. (2012)” estudiaron el efecto combinado de diferentes antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes* en productos marinos mínimamente procesados obteniendo importantes resultados mediante la combinación de nisina con ϵ -polilisisina y nisina con lisozima [10]; A. Palop et al. (2004) utilizaron funciones de distribución de frecuencia para predecir el número de células de *L. monocytogenes* sobrevivientes a tratamientos con carvacrol y cimene [11], así también podemos encontrar muchas otras investigaciones sobre este tema. Estos estudios son muy

importantes tomando en cuenta que *L. monocytogenes* puede crecer en un rango de temperaturas de entre 1°C y 45°C, pH's entre 4.6 y 9.6, en altas concentraciones de sal y puede sobrevivir en la superficie de los alimentos y los equipos de procesamiento de alimentos mediante la formación de biopelículas [12].

En este estudio se seleccionaron aquellos antimicrobianos naturales aceptados como sustancias GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras), seguidamente, se eligieron aquellos con resultados más esperanzadores tras la realización de una prueba de sensibilidad antimicrobiana con sensidiscos aplicando el método Kirby-Bauer y evaluando los halos de inhibición generados, para ello nos basamos en el protocolo de ensayo expuesto en el International Journal of Antimicrobial Agents (vol. 38) [13]. Luego, se realizaron recuento de supervivientes tratados con diferentes combinaciones de antimicrobianos buscando efecto sinérgico entre ellos. Esto nos ayudó a acotar nuestros experimentos y a decidir de una manera objetiva con cuales antimicrobianos debíamos empezar a realizar las curvas de crecimiento.

Ya terminados los primeros ensayos para seleccionar nuestros antimicrobianos naturales, empezamos a probar concentraciones de los mismos, tanto de manera individual como combinada: citral ($C_{10}H_{16}O$), *D*-limoneno ($C_{10}H_{16}$), nisina ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) y glucósido de steviol ($C_{38}H_{60}O_{18}$).

El citral es una mezcla de dos isómeros, geranial y neral, que son α -acíclicos, aldehídos monoterpenos β -insaturado de origen natural en muchos aceites esenciales de frutas cítricas o de otras hierbas o especias [14, 15]. Químicamente, el citral natural es una mezcla de isómeros, neral *cis* - isómero y geranial isómero-*trans* que tienen la misma fórmula molecular, $C_{10}H_{16}O$, pero diferentes estructuras. Este compuesto está presente en los aceites volátiles de varias plantas, como la citronella (hierba de limón) y la verbena [16]. Con un fuerte olor a limón, el citral es ampliamente utilizado en industrias de alimentos, cosméticos y detergentes como agente aromatizante [16]. Estos compuestos han sido reconocidos como GRAS por la FDA y su uso está permitido en la Unión Europea [17]. Tanto el citral como el *D*-limoneno, a bajas concentraciones afectan la actividad enzimática asociada generalmente con la producción de energía y a altas concentraciones dirige la desnaturalización de proteínas. También pueden afectar la permeabilidad de la

membrana citoplasmática, permitiendo la pérdida de macromoléculas desde dentro de la célula, alterar la función de la membrana citoplasmática (transporte de electrones, la absorción de nutrientes, proteínas y nucleótidos, síntesis y actividad enzimática) e interactuar con las proteínas transmembrana, causando deformación de la estructura [17].

El *D*-limoneno es un monoterpene monocíclico obtenido de naranja, pomelo y limón. Presenta una gran variedad de propiedades, incluyendo actividades antioxidantes, anti-inflamatorias y anticancerígenas [18]. Sin embargo, debido a la naturaleza hidrófoba de *D*-limoneno y a dificultades para lograr una dispersión uniforme en agua, el uso de *D*-limoneno requiere la aplicación de concentraciones elevadas con el fin de lograr equivalentes antimicrobianos eficientes en alimentos [1]. Además, *D*-limoneno es susceptible a la degradación oxidativa que resulta en pérdida de actividad [1]. Estos compuestos han sido reconocidos como GRAS por la FDA y su uso está permitido en la Unión Europea [17].

En el caso del glucósido de steviol, o extractos de stevia, comúnmente se obtienen mediante extracción acuosa o disolvente de las hojas de la planta [19]. *Stevia rebaudiana* sp. es un arbusto perenne perteneciente a la familia Asteraceae, que crece en las zonas tropicales y subtropicales de América del Sur, donde sus hojas han sido tradicionalmente utilizadas como edulcorante desde hace cientos de años [20]. La stevia es usada en alimentos en países como Francia, España y Estados Unidos entre otros, debido a su contenido de glucósidos de steviol, el cual contiene bajo o ningún ingrediente calórico y es de 100 a 300 veces más dulce que la sacarosa [19]. Además, las hojas de stevia deshidratadas contienen minerales, vitaminas, compuestos fenólicos, flavonoides [19], otros compuestos antimicrobianos [21] y propiedades antioxidantes [22]. Se decidió trabajar con el glucósido de steviol debido a que los resultados obtenidos con la infusión de stevia no fueron los esperados y a su mayor grado de pureza con respecto a ésta.

Todos los antimicrobianos anteriormente definidos fueron combinados entre sí y también con nisina, la cual es una bacteriocina (proteínas o péptidos producidos por algunas bacterias y que poseen actividad antimicrobiana, letal o inhibidora, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los que las producen) de peso molecular bajo producida por el microorganismo *Lactococcus lactis* sp. [17]. La nisina afecta las células

mediante la formación de poros en la membrana, reduciendo el potencial transmembrana y el gradiente de pH, lo que resulta en la fuga de materiales celulares [23]. Aparte de numerosos trabajos de investigación sobre la nisina, han sido publicados varios artículos tales como los llevados a cabo por Hurst (1981,1983), Delves-Broughton (1990), Ray (1992), Hurst y Hoover (1993), de Vuyst y Vandamme (1994), Delves-Broughton y Gasson (1994), Delves-Broughton et al. (1996), Thomas et al. (2000) y Thomas y Delves Broughton (2001) [24]. Los resultados de las pruebas de toxicidad que demuestran su seguridad para el consumo humano se publicaron en 1962 (Frazer et al, 1962; Hara et al 1962). La nisina fue aprobada para su uso en alimentos en 1969 por la Organización Conjunta para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO / OMS). Fue incluida en el listado de sustancias “Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS)” en los Estados Unidos en 1988 (FDA, 1988) [24], además, sigue siendo la única bacteriocina permitida en los alimentos como un conservante añadido. Se ha demostrado que es eficaz contra *Listeria monocytogenes*.

Se decidió realizar pruebas de las combinaciones que resulten más efectivas en una bebida formulada de zumo de frutas con leche de avena cuyo pH resultante fue de 4.6, luego aplicamos estos antimicrobianos a dos cremas de verdura frescas sin aditivos químicos con pH's de 5.0 y 5.5. Se seleccionaron estos alimentos para llevar a la práctica los tratamientos evaluados en TSB puesto que estos productos son susceptibles a contaminación por *Listeria monocytogenes* debido a su alta actividad de agua, sus pH's (tomando en cuenta que la adaptación de este microorganismo a los medios ácidos mejora su supervivencia en productos acidificados de consumo diario [1]) y su contenido de azúcares, grasas y proteínas, los cuales son factores que favorecen el desarrollo de este microorganismo. Además, existe una legislación que limita la presencia de este patógeno en frutas, verduras y sus subproductos (zumos, cremas y otros).

Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano, a varias concentraciones, de una serie de antimicrobianos naturales sobre *Listeria monocytogenes*, tanto de forma individualizada como por medio de combinaciones entre los mismos. Además se evaluó el efecto sinérgico que pudieran tener otros factores adicionales como el pH y la temperatura de incubación. Como objetivos parciales se propuso evaluar el efecto combinado de la aplicación de los antimicrobianos naturales seleccionados con tratamiento térmico moderado y reducción de pH del medio para asegurar la prolongación de la fase de latencia del patógeno (o inhibir completamente su crecimiento). Por otro lado también se evaluó la posible aplicación de estos antimicrobianos naturales en la industria alimentaria.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Preparación del inóculo

En los siguientes experimentos se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* CECT 4032. Fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las células se hicieron crecer a 37°C en caldo TSB (Scharlau Chemie S. A., Barcelona, España) complementado con 0,5% de glucosa (p/v). Los cultivos se mantuvieron a -80°C en glicerol al 30% como crioprotector. Para preparar los inóculos se hacía crecer el microorganismo durante toda la noche en TSB a 37°C.

2.2 Pruebas de halos de inhibición (Método Kirby-Bauer)

Se realizó una siembra en masa del microorganismo inoculando 100µL de *Listeria monocytogenes* con concentración inicial de 10⁵ UFC/mL en una placa petri con 15 mL de agar Mueller Hilton (Scharlau, Charlab, S.L., Reactivos para diagnósticos S.L., España.). Posteriormente y tras la solidificación del medio, fueron aplicados 15 µL de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos sobre sensidiscos y se distribuyeron equidistantemente en las placas. En cada placa se colocó un control de eritromicina y finalmente fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Esta prueba fue realizada por triplicado.

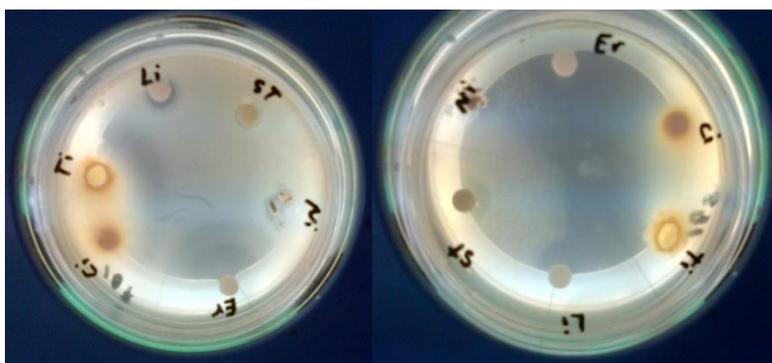


FIGURA1. PLACAS PETRI CONTENIENDO LOS ANTIMICROBIANOS NISINA, CITRAL, D-LIMOMENO, TIMOL, GLUCOSIDO DE STEVIOL, CARVACROL, CIMENO, INFUSION DE STEVIA Y UN CONTROL DE ERITROMICINA CON 15 mL DE AGAR MUELLER HILTON INOCULADO CON 100µL DEL INOCULO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10⁵UFC/mL). AQUÍ SE MUESTRAN LOS HALOS DE INHIBICION GENERADOS POR LOS ANTIMICROBIANOS PROBADOS A LAS 24 HORAS A UNA TEMPERATURA DE INCUBACION DE 37°C.

El tamaño del halo de inhibición de desarrollo variará según los siguientes parámetros o variables: la concentración del antimicrobiano, sensibilidad bacteriana,

coeficiente de difusión del antimicrobiano en el agar, tiempo y temperatura de incubación, pH y composición del medio. Se usan preparados comerciales que den resultados reproducibles, por ejemplo agar Müller-Hinton. Estos son medios de cultivos aceptados por el comité de la OMS para la normalización de las pruebas de susceptibilidad. La profundidad del medio en las placas está estandarizada: se emplean placas de 9 cm de diámetro y se agrega siempre el mismo volumen de medio de cultivo, 15 mL por placa. De esta manera las placas poseen siempre la misma altura de agar. El tamaño del inóculo debe estar estandarizado ya que si éste es muy pequeño dará una sensibilidad mayor a la real, por el contrario, si el inóculo es muy denso pueden aparecer mutantes resistentes.

2.3 Antimicrobianos

Después de obtener los resultados de las pruebas de halos de inhibición, se realizaron experimentos a varias concentraciones de los siguientes antimicrobianos, tanto de manera individual como en combinación: citral, *D*-limoneno, nisina y glucósido de steviol.

La nisina se obtuvo de Sigma Aldrich Chemie, (Steinheim, Alemania) y fue disuelta en etanol al 50% (v/v) (Panreac, Barcelona, España) obteniendo una solución de trabajo a una concentración final de 30 μ M. A su vez, el citral (Sigma-Aldrich, product of United Kingdom), *D*-limoneno (Sigma-Aldrich, product of United Kingdom), timol (Panreac Quimica S.A., Barcelona, España), carvacrol (Panreac Quimica S.A., Barcelona, España), glucósido de steviol (Stevia Germany GMBH, Alemania) y cimenol (Panreac Quimica S.A., Barcelona, España) fueron disueltos en etanol al 95% (v/v) (Panreac, Barcelona, España) para conseguir soluciones de trabajo con una concentración final de 100 mM para cada antimicrobiano. Todas estas soluciones fueron almacenadas en oscuridad y en condiciones de refrigeración hasta su uso. Se evaluaron las concentraciones de etanol empleadas para la elaboración de las soluciones anteriormente descritas con el objetivo de evitar falsos positivos.

Los antimicrobianos seleccionados fueron buscados en las Normas Alimentarias FAO/OMS Codex Alimentarius y en el Reglamento (UE) No. 1129/2011 de la Comisión

Europea del 11 de noviembre de 2011 para asegurarnos de no exceder los límites permitidos para ninguno de estos (**Ver anexo 2**).

Luego de llevar a cabo los primeros experimentos con antimicrobianos naturales en TSB a pH 7, se realizaron ajustes de pH del medio y tratamientos térmicos moderados. Para la aplicación de los tratamientos térmicos, se procedió a calentar las muestras a 60° C durante 10 minutos antes y después de la aplicación de los antimicrobianos (no se encontró diferencias apreciables en cuanto al orden de aplicación de los antimicrobianos y el tratamiento térmico). Para el ajuste de pH del medio, se adicionó a éste una solución madre de ácido clorhídrico (HCl) al 3.4%. Se eligió esta concentración de HCl debido a que concentraciones más bajas requerían mayor cantidad de esta solución madre al medio de cultivo para alcanzar los niveles de pH deseados, con lo cual a su vez, diluíamos mucho el medio reduciendo su concentración de nutrientes. Esta solución madre de HCl se preparó mezclando 10 mL de agua destilada con 1 mL de HCl al 37%. Elegimos un pH de 5.5 como límite inferior debido a que pH's más bajo provocaban inhibición del crecimiento del microorganismo.

2.4 Elaboración de bebida formulada

Elaboramos una bebida formulada con la siguiente composición: agua mineral embotellada (35%), leche de avena UHT (35%), zumo de naranja (4.5%), zumo de papaya (19.5%) y zumo de mango (6%). Esta bebida resultó con un pH de 4.9. Observamos que, debido a que el pH de la bebida era un factor limitante del crecimiento del microorganismo, no se evidenciaba el crecimiento del mismo en el producto.

2.5 Elaboración de curvas de crecimiento mediante recuento de células viables

Las células viables son aquellas capaces de dividirse y originar descendencia. Se cuentan las células de una muestra que son capaces de formar colonias cuando se inoculan en un medio de cultivo sólido adecuado. La modalidad de siembra en profundidad (siembra por vertido en placa) consiste en mezclar la muestra con el medio de cultivo vertiéndose ambos en una placa estéril. En la mayoría de los casos antes de realizar la siembra, las muestras tienen que diluirse (diluciones seriadas). Una vez que la placa es inoculada, se

incuba a la temperatura adecuada para contarse las colonias al transcurrir un tiempo determinado (24 horas, 48 horas, etc.). Normalmente los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) [27].

Se utilizó el medio de cultivo *Agar Trypticase Soya* (Eur. Pharm., Scharlau, Charlab, S.L., España) como medio de cultivo sólido; la temperatura y el tiempo de incubación fueron 37° C durante 24 horas, respectivamente. Estas pruebas se realizaron por triplicado, excepto para las concentraciones que fueron descartadas en la primera o segunda prueba.

2.6 Elaboración de curvas de crecimiento mediante lectura de densidad óptica

La absorción de luz por parte de una sustancia es una propiedad característica de ella, que puede ser utilizada para su identificación y cuantificación. Todas las sustancias absorben luz en alguna región del espectro electromagnético. Todo método espectrofotométrico se basa en la comparación de la absorbancia de una sustancia de concentración desconocida con la de una solución de la misma sustancia cuya concentración se conoce y a la cual se denomina solución patrón o estándar. El término es frecuentemente intercambiable con densidad óptica, si bien este último se refiere a la absorbancia por unidad de longitud [25].

Las primeras lecturas de densidad óptica (D.O.₆₆₀) se realizaron mediante el uso de un espectrofotómetro (ZUZI 4110RS, Auxilab, Beriaín, España) con el fin de identificar aquellas condiciones que nos resultarían más prometedoras para la realización de curvas de crecimiento. Para estas pruebas, el equipo fue calibrado con un blanco de TSB, luego se prepararon muestras de 4 mL para cada condición combinando TSB, antimicrobiano y microorganismo a una concentración inicial conocida. Las lecturas de densidad óptica de estos experimentos fueron realizadas por duplicado.

Ya seleccionados los tratamientos con mejores resultados, el crecimiento en presencia de los antimicrobianos fue determinado mediante lectura de absorbancia en un Bioscreen C (Lab Systems, Helsinki, Finlandia). Se partió de tubos con 4 mL de caldo TSB con los antimicrobianos a las concentraciones de prueba y luego se adicionó 100 µL del inóculo de *Listeria monocytogenes* a concentraciones conocidas. Seguidamente se pipetearon 400 µL de las muestras de los tubos en los pocillos de la microplaca del

Bioscreen. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, midiéndose densidades ópticas en intervalos de 15 minutos a un rango de longitudes de onda de 420-580 nm (wideband).

2.7 Evaluación de daño subletal

Para la realización de esta prueba, los tratamientos con antimicrobianos aplicados al microorganismo fueron llevados a cabo en el medio de cultivo TSB y posteriormente se realizó la recuperación en tres tipos de medios de cultivo diferentemente suplementados: *Agar Trypticase Soya* (TSA), TSA con adición del 5% de NaCl (TSA-NaCl) y Sales Biliares (TSA-S.B.). Todos los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24h. El número de células con daños en su membrana plasmática corresponde a la diferencia entre los recuentos de supervivientes (UFC/mL) obtenidos en TSA y TSA-NaCl; y el número de células con daños en su membrana celular externa corresponde a la diferencia entre los recuentos de supervivientes (UFC/mL) obtenidos en TSA y S.B. Así, se estimó la proporción de células dañadas subletalmente a nivel de membrana plasmática y de membrana externa, como la diferencia de \log_{10} de U.F.C/mL obtenidas en medios no selectivos y selectivos [26].

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Evaluación de halos de inhibición de los antimicrobianos

La tabla 1 muestra los diámetros de halos de inhibición generados por los antimicrobianos inicialmente seleccionados en medio de cultivo Mueller Hilton inoculado con *Listeria monocytogenes* (10^5 UFC/mL) incubado a 37°C durante 24 horas:

TABLA 1. DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm) GENERADOS POR LOS ANTIMICROBIANOS EVALUADOS, SU MEDIA Y DESVIACION ESTANDAR. ADEMAS, SE CLASIFICAN LOS ANTIMICROBIANOS POR CATEGORIA SEGÚN SE EXPONE EN LA SIGUIENTE TABLA.

ANTIMICROBIANO	DIÁMETRO DEL HALO (mm.)					
	A	B	C	MEDIA	D.E.	CATEGORÍA
CONTROL ERITROMICINA	32	28	38	32.67	5.03	ES
CITRAL	25	21	19	21.67	3.06	ES
D-LIMONENO	12	16	14	14.00	2.00	S
TIMOL	21	23	20	21.33	1.53	ES
CARVACROL	17	17	20	18.00	1.73	VS
CIMENO	12	15	11	12.67	2.08	S
NISINA	11	9	9	9.67	1.15	S
STEVIA INFUSIÓN 8,33%	<9	<9	<9			NS
GLUCOSIDO DE STEVIOL 2.5%	<9	<9	<9			NS

ESCALA DE CATEGORÍAS	DIÁMETRO HALO (mm.)
EXTRAMADAMENTE SENSIBLE (ES)	> 20
MUY SENSIBLE (VS)	15 – 19
SENSIBLE (S)	9 – 14
NO SENSIBLE (NS)	< 9

Se evaluó la efectividad de estos antimicrobianos contra el microorganismo de interés. Timol y citral fueron los antimicrobianos que presentaron mejores resultados en estas pruebas, no obstante, el timol fue descartado junto con otros antimicrobianos porque no se ajustaban organolépticamente a uno de los productos evaluados (zumo de frutas) y porque no se evidenció el efecto sinérgico deseado tras las pruebas de recuento en placa. Iniciamos nuestros experimentos probando concentraciones de los antimicrobianos citral, D-limoneno, nisina y glucósido de steviol.

3.2 Curvas de crecimiento mediante lectura de densidad óptica

El lector de cinética de crecimiento microbiano, Bioscreen C, es un instrumento completamente automatizado desarrollado para realizar cinéticamente medidas de hasta 200 condiciones usando el principio de fotometría vertical. Este sistema consiste en un analizador (que es un incubador) y una unidad de medida integrada por un ordenador, software, impresora y consumibles. La temperatura de incubación está entre 1 y 60°C, con intervalos de 0,1°C. Todas las funciones son controladas por el software del ordenador de acuerdo con los parámetros introducidos por el usuario. El Bioscreen C permite supervisar el crecimiento de cultivos de microorganismos puros y mixtos y comprobar el efecto de parámetros solos o combinados como la temperatura o la presencia de diferentes sustancias químicas [28].

En los gráficos A.1, A.2, A.3 y A.4 se muestra el efecto de los antimicrobianos seleccionados sobre *Listeria monocytogenes* incubada a 37°C en TSB a pH 7 mediante lectura de densidad óptica (D.O.) en Bioscreen C de manera individual con una concentración inicial del microorganismo de 10^3 UFC/mL.

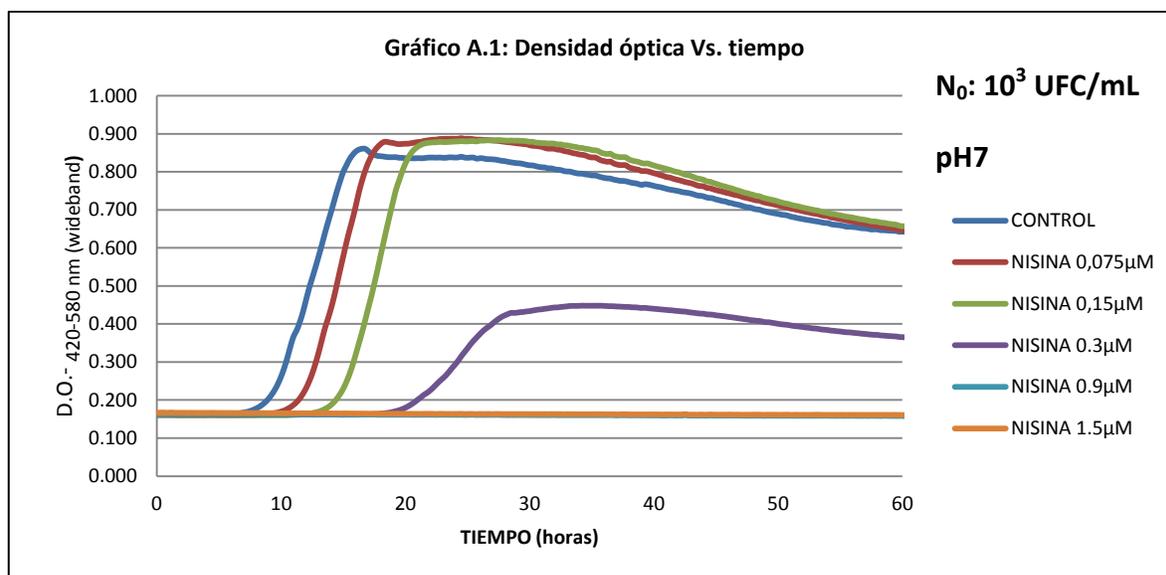


GRÁFICO A.1. CURVA DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NISINA (0,075 μM A 1,5 μM) A 37°C EN TSB A pH 7.

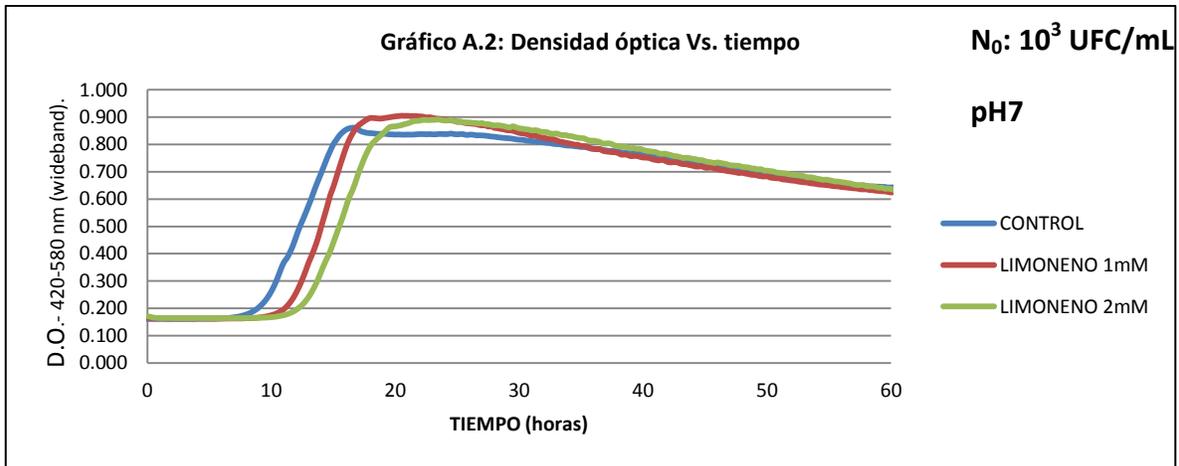


GRÁFICO A.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A D-LIMONENO (1 mM Y 2 mM) A 37°C EN TSB A pH 7.

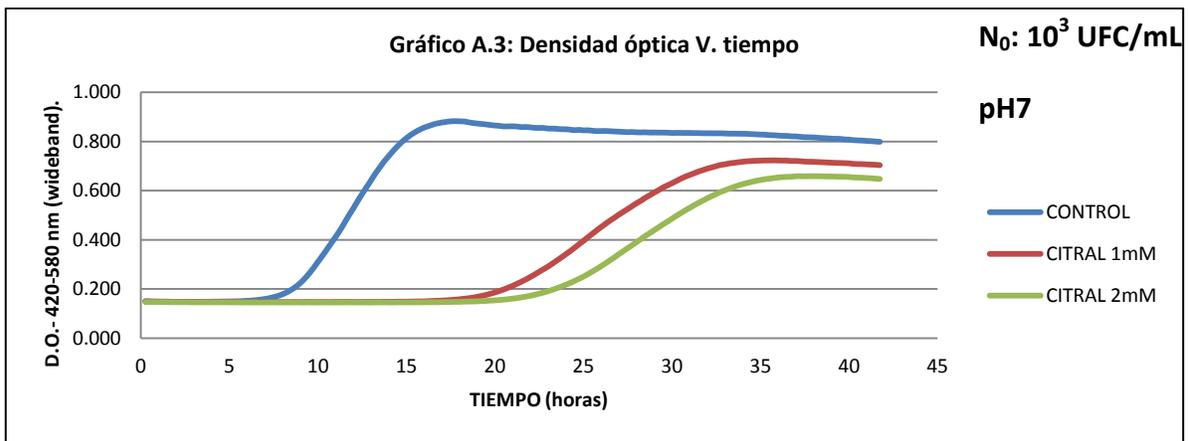


GRÁFICO A.3. CURVA DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A CITRAL (1 mM Y 2 mM) A 37°C EN TSB A pH 7.

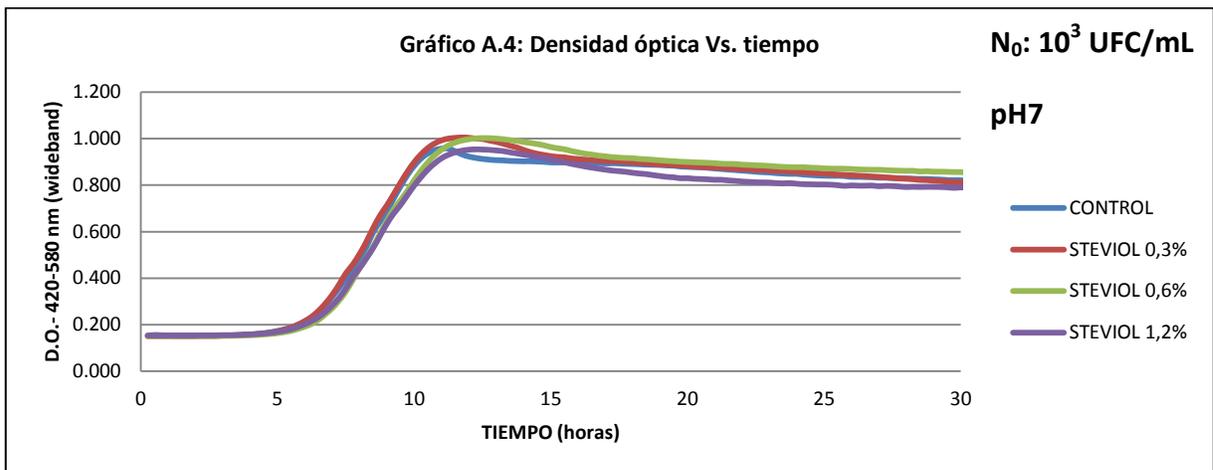


GRÁFICO A.4. CURVA DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A VARIAS CONCENTRACIONES GLUCOSIDO DE STEVIOL (0.3% A 1.2%) A 37°C EN TSB A pH 7.

En este primer bloque de graficas de curvas de crecimiento, podemos observar que concentraciones de nisina superiores a 1.5 μM son suficientes para inhibir el crecimiento del microorganismo cuando partimos de una concentración inicial de 10^3 UFC/mL (ver gráfico A.1). Además, a las concentraciones de glucósido de steviol probadas, no se encontraron diferencias en el desarrollo microbiano con respecto al control (ver gráfico A.4).

Posteriormente, en los gráficos B.1, B.2, B.3, B.4, B.5 y B.6, se expone el efecto combinado de los antimicrobianos ensayados sobre *Listeria monocytogenes* incubada a 37°C mediante densidad óptica (D.O.) en Bioscreen C con una concentración inicial del microorganismo de 10^3 UFC/mL en TSB a pH 7.0.

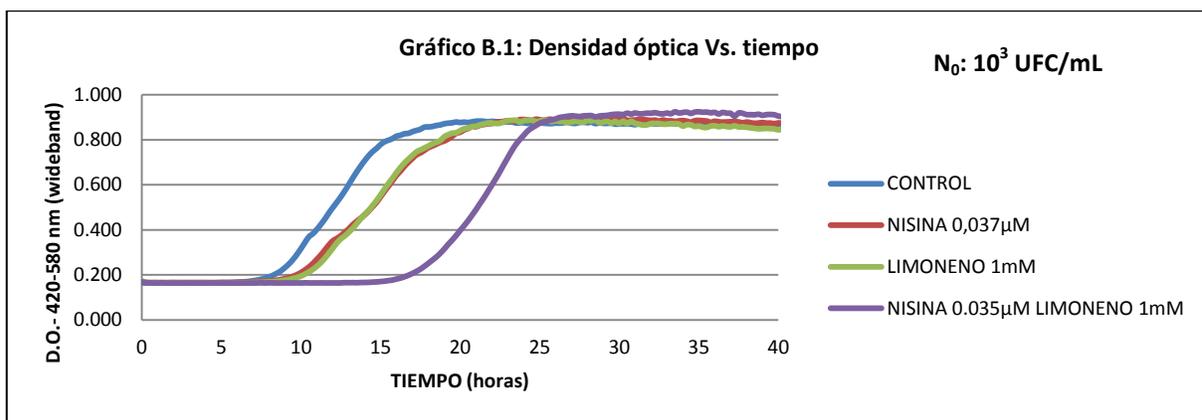


GRÁFICO B.1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A 0.037 μM DE NISINA, 1 mM DE D-LIMONENO Y SU COMBINACION A 37°C EN TSB A pH 7.

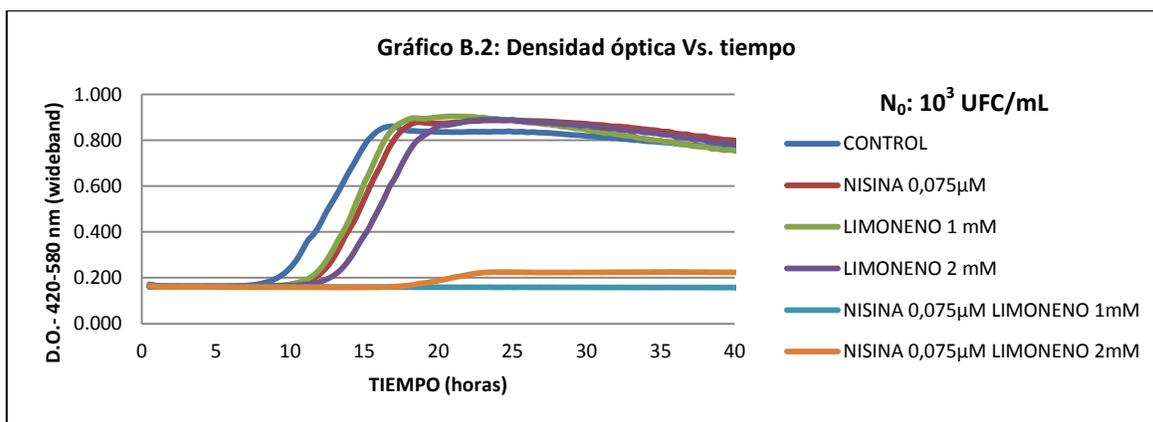


GRÁFICO B.2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A 0.075 μM DE NISINA, D-LIMONENO (1 mM Y 2 mM) Y SU COMBINACION A 37°C EN TSB A pH 7.

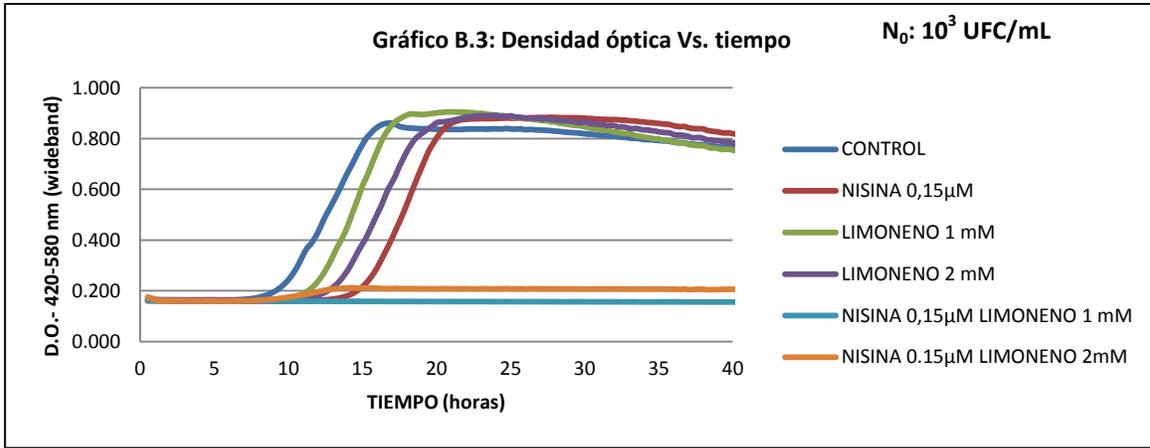


GRÁFICO B.3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A $0.15 \mu\text{M}$ DE NISINA, D-LIMONENO (1 mM Y 2 mM) Y SU COMBINACION A 37°C EN TSB A pH 7.

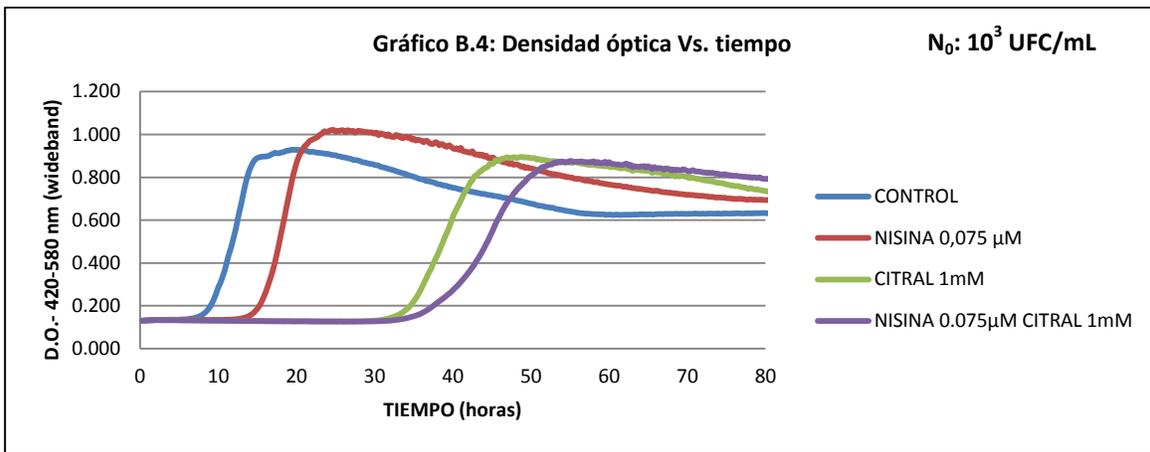


GRÁFICO B.4. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A $0.075 \mu\text{M}$ DE NISINA, 1 mM DE CITRAL Y SU COMBINACION A 37°C EN TSB A pH 7.

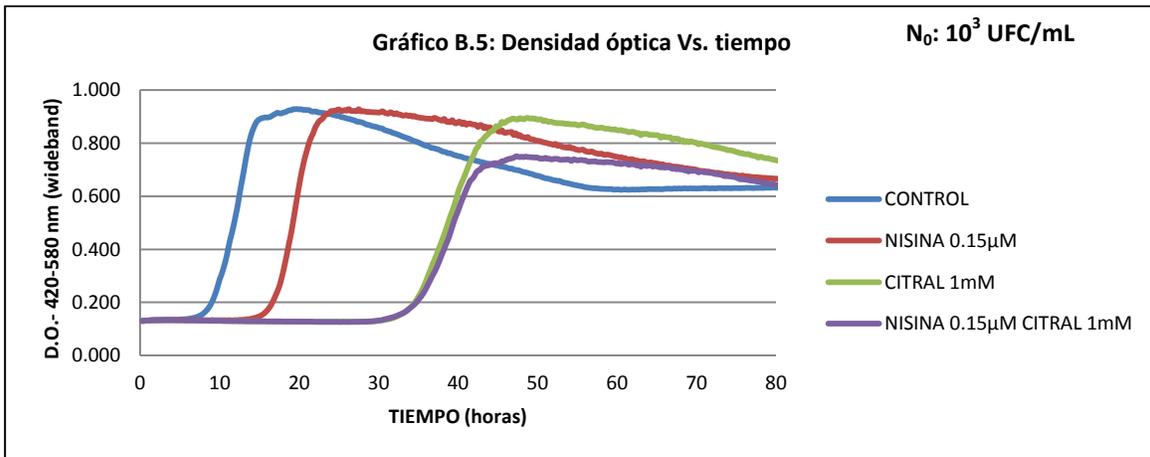


GRÁFICO B.5. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A $0.15 \mu\text{M}$ DE NISINA, 1 mM DE CITRAL Y SU COMBINACION A 37°C EN TSB A pH 7.

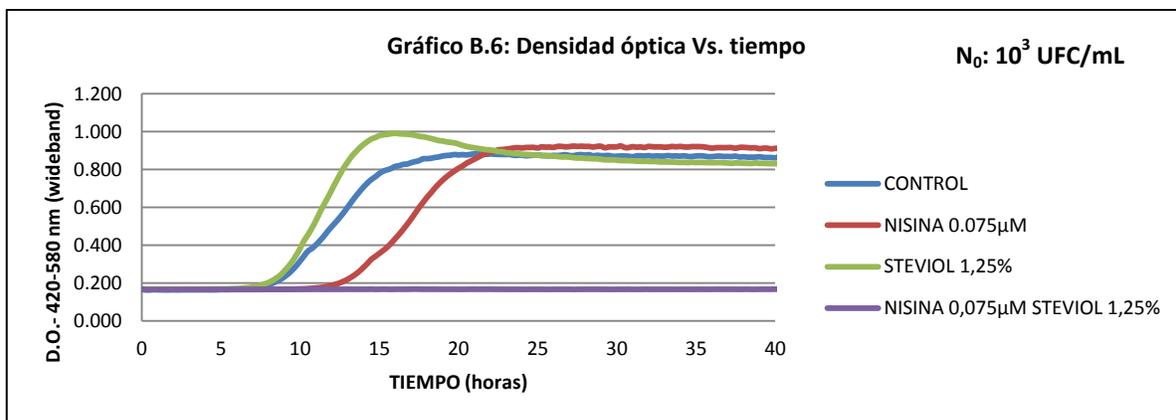


GRÁFICO B.6. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A $0.075 \mu\text{M}$ DE NISINA, 1,25% DE GLUCOSIDO DE STEVIOL Y SU COMBINACION A 37°C EN TSB A pH 7

En el segundo bloque de gráficas de curvas de crecimiento (bloque B), podemos hacer algunas observaciones. En primer lugar, se evidencia que el citral a 1 mM y a 2 mM tienen efectos similares y pueden retrasar la fase de latencia del microorganismo alrededor de 15 horas respecto al control cuando partimos de una concentración microbiana inicial de 10^3 UFC/mL, no obstante, en combinación con $0.075 \mu\text{M}$ de nisina no se encontró el efecto sinérgico deseado (ver gráficos B.4 y B.5), esto nos sugirió que de los antimicrobianos seleccionados, era posible que el citral no fuera el más indicado para alcanzar nuestros propósitos.

Si comparamos los gráficos A.2 y A.4, del bloque A y B.1 y B.6, del bloque B, podemos confirmar que no existe un retraso significativo en la fase de latencia del microorganismo al partir de una concentración microbiana inicial de 10^3 UFC/mL con concentraciones de *D*-limoneno de 2 mM ni con glucósido de steviol al 1.2% respecto al control, sin embargo, al combinar $0.075 \mu\text{M}$ de nisina con 1 mM de *D*-limoneno o con glucósido de steviol al 1.2%, se observa la inhibición del crecimiento microbiano. Estos resultados sirvieron para confirmar el efecto sinérgico existente entre estas combinaciones de antimicrobianos, a raíz de esto, se decidió continuar experimentando con nisina, glucósido de steviol y *D*-limoneno cambiando algunos parámetros fisicoquímicos, como el pH y la temperatura de tratamiento (TTO), además de la concentración inicial del

microorganismo. Otros estudios han demostrado efecto aditivo o sinérgico al combinar nisina y *D*-limoneno [1].

Finalmente, en las gráficas C.1, C.2, C.3, C.4 y C.5, mediante lecturas de densidad óptica (D.O) se expone el efecto de aquellas combinaciones de antimicrobianos que mostraron un efecto sinérgico contra *Listeria monocytogenes* estudiando diversos factores, como concentración inicial del microorganismo (el cual fue incrementado de 10^3 UFC/mL a 10^5 UFC/mL), pH (se compararon tratamientos a pH 5.5 y pH 7.0) y aplicación o no de tratamiento térmico (TTO) en TSB a 37°C.

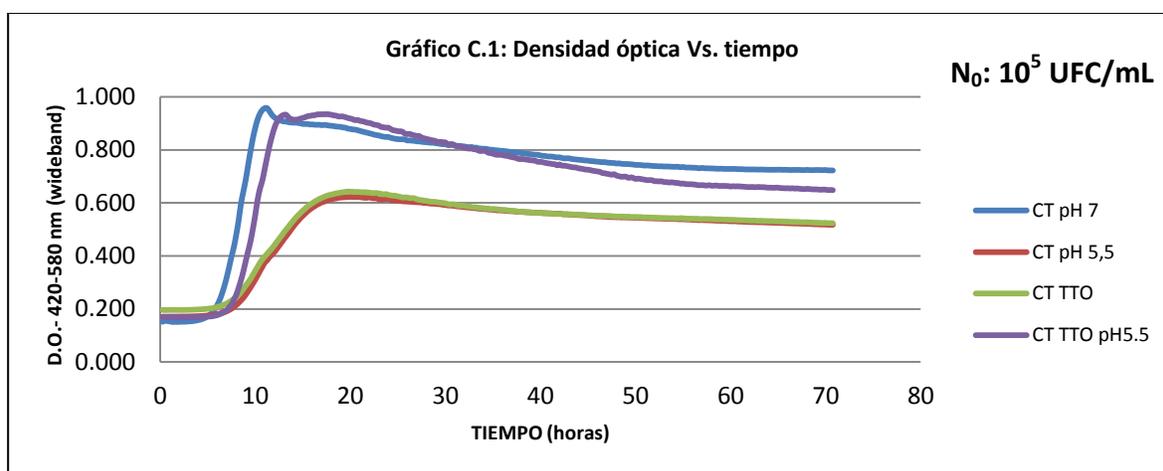


GRÁFICO C.1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^5 UFC/mL) A 37°C EN TSB A DIFERENTES pH (pH 7 Y pH 5.5) CON Y SIN TRATAMIENTO TERMICO.

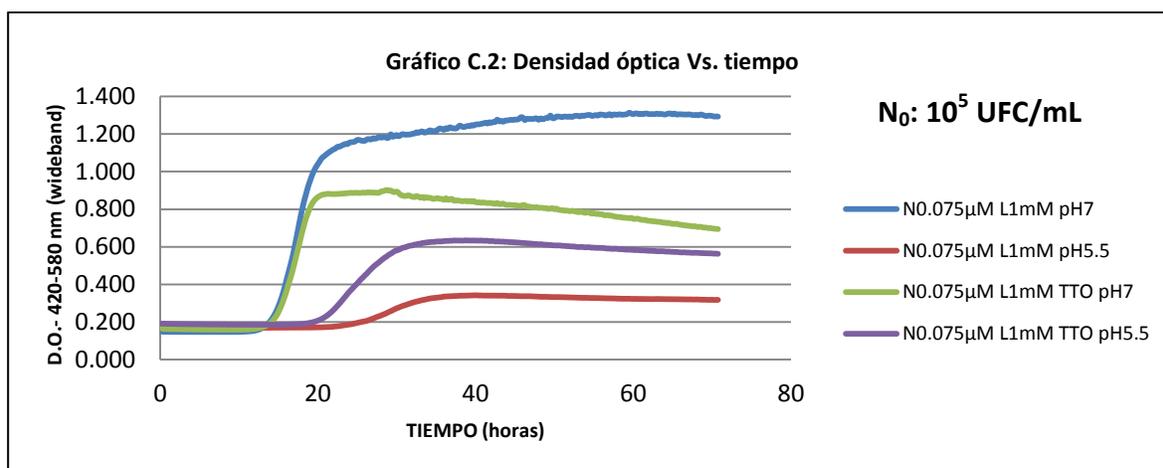


GRÁFICO C.2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^5 UFC/mL) EXPUESTA A 0.075 μM DE NISINA COMBINADA CON 1 mM DE D-LIMONENO EN TSB A DIFERENTES pH (pH 7 Y pH 5.5) CON Y SIN TRATAMIENTO TERMICO E INCUBADA A 37°C.

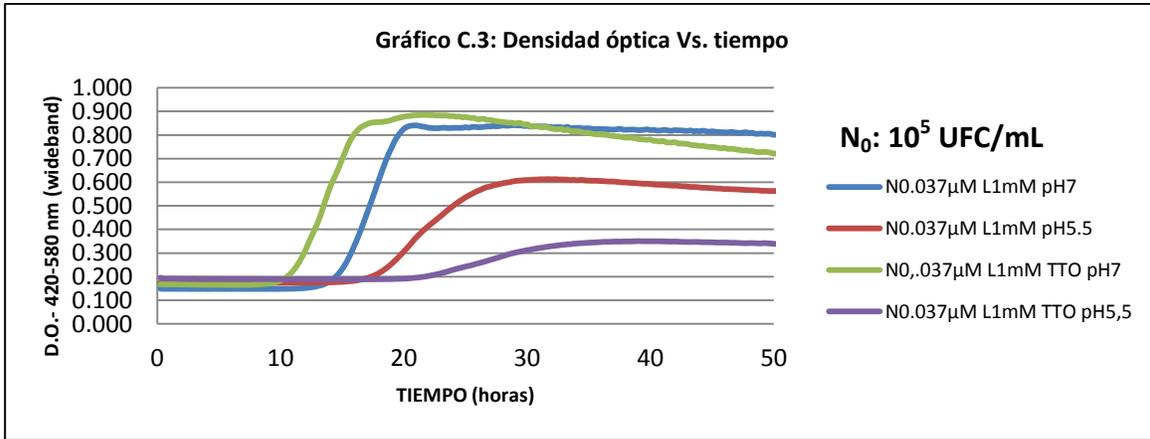


GRÁFICO C.3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^5 UFC/mL) EXPUESTA A 0.037 µM DE NISINA COMBINADA CON 1 mM DE D-LIMONENO EN TSB A DIFERENTES pH (pH 7 y pH 5.5) CON Y SIN TRATAMIENTO TERMICO E INCUBADA A 37°C.

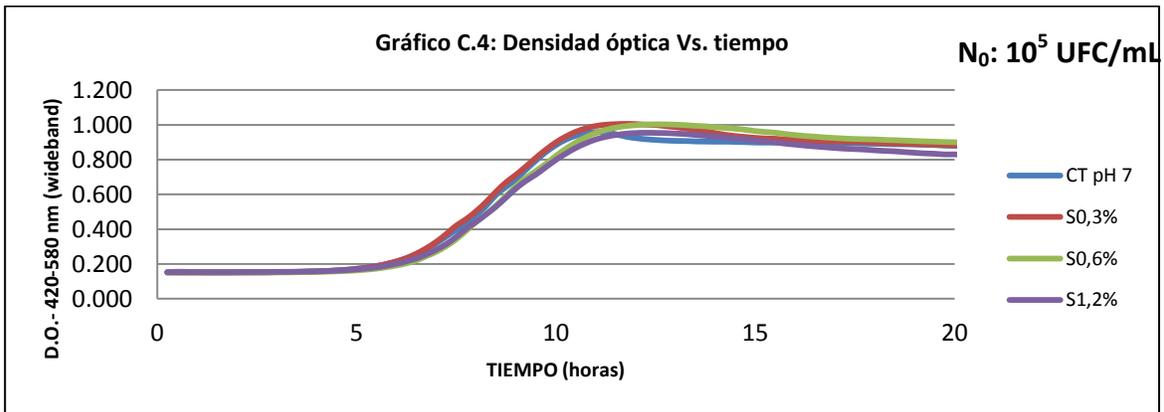


GRÁFICO C.4. CURVA DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^5 UFC/mL) EXPUESTA A VARIAS CONCENTRACIONES GLUCOSIDO DE STEVIOL (0.3% A 1.2%) A 37°C EN TSB A pH 7.

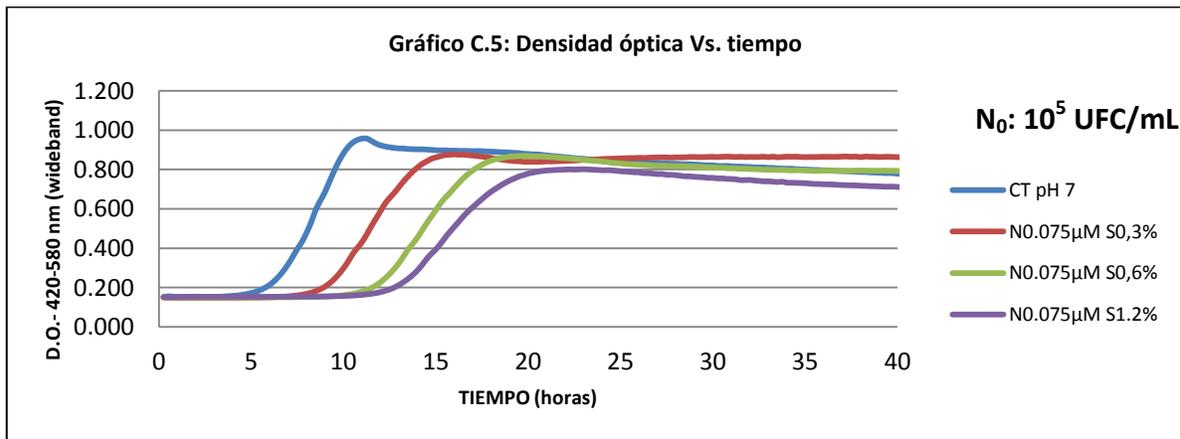


GRÁFICO C.5. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^5 UFC/mL) EXPUESTA A 0.075 µM DE NISINA COMBINADA CON GLUCOSIDO DE STEVIOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES (0.3% A 1.2%) A 37°C EN TSB A pH 7.

En este último bloque de gráficas de curvas de crecimiento (bloque C), podemos observar que el tratamiento térmico aplicado (60°C durante 10 minutos) y la reducción de pH del medio a 5.5 puede ralentizar la fase exponencial del crecimiento del microorganismo, pero no reduce su fase de latencia (ver gráfico C.1); no obstante, al adicionar 0.037 μM de nisina con 1 mM de *D*-limoneno conseguimos la inhibición del crecimiento del microorganismo (concentración 10^5 UFC/mL) (ver gráfico C.3). Sin embargo, no observó una notable reducción de la fase de latencia del microorganismo al combinar el tratamiento térmico con la nisina, esto puede deberse a que cierta proporción de nisina puede perderse durante dicho tratamiento, tal como se reporta en otros estudios [24]. En este mismo orden, en 2013 J.P. Huertas et al. [17] confirmó un aumento en la termoresistencia de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* al aplicar antimicrobianos lipídicos como el *D*-limoneno, además, mencionó que muchos autores reportan un aumento en la termoresistencia de microorganismos en presencia de materia oleosa.

Cabe mencionar que al combinar 0.037 μM de nisina, ya sea con *D*-limoneno a 1 mM o glucósido de steviol a 1.2% en TSB a pH 7, encontramos una frontera de inhibición, es decir, existe la probabilidad de que el microorganismo (concentración inicial de 10^3 UFC/mL) se desarrolle o no, es por esto que decidimos no disminuir la concentración de nisina a valores inferiores de 0.075 μM en TSB en experimentos posteriores. Por otro lado, en los gráficos C.4 y C.5 se evidencia la efectividad antimicrobiana de la combinación de nisina 0.075 μM y el glucósido de steviol a las concentraciones probadas aun cuando aumentamos la carga microbiana inicial a 10^5 UFC/mL.

3.3 Curvas de crecimiento mediante recuento de células viables en TSB

En la tabla 2 se presentan los resultados de recuento de células viables de *Listeria monocytogenes* expresados como la media del logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra \pm la desviación estándar [MEDIA log (UFC/mL) \pm D.E. log (UFC/mL)] para un número inicial del microorganismo de 10^3 UFC/mL en caldo TSB a pH 7 incubada a 37°C. Con los valores numéricos del recuento en placa quedan contrastados los datos de densidades ópticas obtenidos en el equipo de Bioscreen C.

TABLA 2. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A LOS ANTIMICROBIANOS NISINA (N), D-LIMONENO (L), CITRAL (C) Y DE GLUCOSIDO DE STEVIO (S) A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN MEDIO DE CULTIVO TSB A 37°C DURANTE 48 HORAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (HORAS)		
	0	24	48
Control pH 7	3,675 ± 0,068	8,835 ± 0,131	
N 0,037 µM	3,971 ± 0,295	9,145 ± 0,602	
N 0,075 µM	3,785 ± 1,054	8,724 ± 0,213	
N 0,15 µM	4,308 ± 0,644	8,630 ± 0,016	
N 0,3 µM	3,953 ± 0,077	8,564 ± 0,390	
N 0,9 µM	3,079 ± 0,471	1,614 ± 0,235	0,000 ± 0,000
N 1,5 µM	3,725 ± 0,216	0,000 ± 0,000	
L 1 mM	3,525 ± 0,356	8,852 ± 0,171	
L 2 mM	3,979 ± 0,600	3,558 ± 0,230	0,000 ± 0,000
C 1 mM	3,732 ± 0,837	8,543 ± 0,278	
C 2 mM	4,035 ± 0,588	2,302 ± 0,386	0,000 ± 0,000
S 0,3%	3,890 ± 0,693	8,558 ± 0,439	
S 0,6%	3,707 ± 0,436	9,160 ± 0,510	
S 1,2%	4,095 ± 0,586	9,085 ± 0,836	
N 0,037 µM + L 1 mM	4,218 ± 0,445	5,851 ± 0,091	8,529 ± 0,392
N 0,075 µM + L 1 mM	3,493 ± 0,682	0,000 ± 0,000	
N 0,15 µM + L 1 mM	4,247 ± 0,377	0,000 ± 0,000	
N 0,075 µM + C 1 mM	4,839 ± 0,044	8,638 ± 0,175	
N 0,15 µM + C 1 mM	3,555 ± 0,415	5,487 ± 0,316	8,585 ± 1,141
N 0,037 µM + S 0,3%	3,658 ± 0,896	8,630 ± 0,118	
N 0,075 µM + S 0,3%	3,877 ± 0,714	8,698 ± 0,182	
N 0,15 µM + S 0,3%	4,202 ± 0,929	8,456 ± 0,280	
N 0,037 µM + S 0,6%	3,868 ± 0,392	8,557 ± 0,384	
N 0,075 µM + S 0,6%	3,992 ± 0,184	8,759 ± 0,054	
N 0,15 µM + S 0,6%	3,973 ± 0,287	8,752 ± 0,338	
N 0,037 µM + S 1,2%	3,697 ± 0,049	8,690 ± 0,224	
N 0,075 µM + S 1,2%	3,990 ± 0,704	2,996 ± 0,795	0,000 ± 0,000
N 0,15 µM + S 1,2%	4,152 ± 0,694	1,793 ± 0,583	0,000 ± 0,000

Con los datos de la Tabla 2 podemos concluir que concentraciones de 0.9 µM (p:v) de nisina son suficientes para inhibir el crecimiento del microorganismo cuando se parte de una concentración inicial de 10^3 UFC/mL; además, podemos conseguir esta inhibición reduciendo la concentración de nisina a 0.075 µM y combinándola con 1 mM de D-limoneno o con 1.2% de glucósido de steviol (lo cual concuerda con curvas de crecimiento mediante lectura de densidades ópticas expuestas anteriormente). En el caso

del glucósido de steviol, no se aprecia el efecto antimicrobiano al emplearlo de manera individual a concentraciones iguales o inferiores a 1.2%; en cuanto al citral, no se obtuvieron los resultados deseados.

Se realizaron muestras en TSB de tratamientos que resultaron más prometedores a temperaturas de refrigeración de 7°C y a temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo de 37°C para evaluar que tanto podríamos prolongar su fase de latencia a estas temperaturas. Resultó de interés evaluar la evolución del desarrollo de este microorganismo a temperaturas de refrigeración bajo diferentes condiciones, pues en 1995 Russell et al. [24] reportó que *Listeria monocytogenes* puede adaptarse al crecimiento a bajas temperaturas mediante el incremento de la fluidez de su membrana, lo cual puede aumentar la sensibilidad de este microorganismo a la nisina. En adición a esto, estudios de Delves-Broughton (1990) y Hirsch (1951) evidencian que la estabilidad de la nisina es mayor a bajas temperaturas.

En la tabla 3 se presentan los resultados de las muestras de TSB a pH 7 inoculadas con una concentración inicial del microorganismo (M.O.) de 10^2 UFC/mL y 10^4 UFC/mL y almacenadas a temperatura de refrigeración de 7°C. Estos resultados están expresados en logaritmos de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra y abarcan un período de tiempo de 5 semanas. Los tratamientos fueron realizados aplicando los antimicrobianos nisina (N), *D*-limoneno (L) y glucósido de steviol (S).

La tabla 3 nos muestra las combinaciones efectivas tanto para el retraso en el crecimiento del microorganismo como para su inactivación en TSB a temperaturas de refrigeración y pH's de 7.0 y 5.5 con una concentración microbiana inicial de 10^3 y de 10^5 UFC/mL.

TABLA 3. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (MO) A DIFERENTES CONCENTRACIONES MICROBIANAS INICIALES (10^2 UFC/mL Y 10^4 UFC/mL) EXPUESTA A 0.075 μ M DE NISINA (N), 1 mM DE D-LIMONENO (L), 1.2% DE GLUCOSIDO DE STEVIO (S) Y SUS COMBINACIONES A 7°C EN MEDIO DE CULTIVO TSB DURANTE 5 SEMANAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (SEMANAS)					
	0	1	2	3	4	5
Control MO 10^2 pH7	3.89	3.60	8.18			
Control MO 10^4 pH7	4.00	7.43	8.93			
N 0.075 μ M MO 10^2 pH7	<30 UFC/mL	3.08	6.38	8.99		
L 1 mM MO 10^2 pH7	2.73	4.59	8.83			
N 0.075 μ M L1 mM MO 10^2 pH7	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
N 0.075 μ M L1 mM MO 10^2 pH5.5	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
N 0.075 μ M L1 mM MO 10^4 pH5.5	2.34	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	2.36	4.45	5.51
N 0.075 μ M S1.25% MO 10^2 pH7	1.78	1.60	3.60	4.68	6.08	
N 0.075 μ M S1.25% L1 mM MO 10^2 pH7	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL

Seguidamente, en la tabla 4 se presentan los resultados de las muestras de TSB a pH 7 y pH 5.5 conteniendo los antimicrobianos nisina (N), *D*-limoneno (L) y glucósido de steviol (S), inoculadas con una concentración inicial del microorganismo de 10^3 UFC/mL y almacenadas a temperatura de 37°C, la cual es óptima para el crecimiento del microorganismo. Estos resultados están expresados en logaritmos de UFC/mL y abarcan un período de tiempo de 9 días.

En la tabla 4 vemos las combinaciones efectivas para la inactivación del microorganismo probadas a temperatura de refrigeración que siguen siendo efectivas a temperatura de 37°C. Además, observamos que a pH 5.5 podemos conseguir la inactivación del microorganismo a una concentración inicial de 10^3 UFC/mL aplicando 0,075 μ M de nisina o 1 mM de *D*-limoneno sin necesidad de combinarlos entre sí ni con otros factores. También se observa que el glucósido de steviol 1.2% y el *D*-limoneno 1 mM son efectivos para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* combinados con nisina 0.075 μ M, pero no son efectivos combinados entre sí, esto puede deberse a la capacidad que tiene la nisina de crear poros en la membrana celular y facilitar la penetración de los antimicrobianos. Estos resultados coinciden con los estudios de Rayman et al. (1981), así como los de Scott and Taylor (1981), quienes reportaron que la efectividad de la nisina

decae al aumentar la temperatura de almacenamiento, el tamaño del inóculo y el pH del medio [24].

TABLA 4. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A 0.075 μ M DE NISINA (N), 1mM DE D-LIMONENO (L), SUS COMBINACIONES Y 0.075 μ M DE NISINA CON GLUCOSIDO DE STEVIO (S) A VARIAS CONCENTRACIONES (0.3% A 1.25%) EN TSB A 37°C DURANTE 9 DIAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (DIAS)			
	0	2	6	9
Control pH7	3.20	8.48		
Control pH5.5	3.23	8.48		
N 0.075 μ M pH7	0.00	3.58	7.51	
N 0.075 μ M pH5.5	1.48	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
L 1 mM pH7	2.84	5.48	8.15	
L 1mM pH5.5	2.74	1.00	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
N 0.075 μ M L1 mM pH7	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
N 0.075 μ M S0.3% pH7	2.00	2.92	7.48	8.79
N 0.075 μ M S0.6% pH7	1.00	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	4.48
N 0.075 μ M S0.9% pH7	1.00	<30 UFC/mL	6.48	8.87
N 0.075 μ M S1.25% pH7	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
L1 mM S1.25% pH7	2.11	6.48	7.48	8.66

Al ver los resultados de las curvas de crecimiento mediante Bioscreen y los resultados de recuento de supervivientes, se concluyó que la combinación de nisina y citral no producía el efecto esperado a las concentraciones tratadas. En el caso del glucósido de steviol, lográbamos efectividad en su aplicación contra *Listeria monocytogenes* sólo utilizando concentraciones que excedían las regulaciones de la UE (**ver anexo 2**). Debido a esto, se prefirió continuar con los antimicrobianos nisina y *D*-limoneno en los experimentos posteriores.

3.4 Evaluación de daño subletal

En tabla 5 se observan los resultados de la prueba de daño subletal de *Listeria monocytogenes* al ser tratada con 0.037 μ M de nisina, 1 mM de *D*-limoneno y su combinación y ser incubada a 37°C. Los tratamientos fueron aplicados en el medio de cultivo TSB y posteriormente se realizó la recuperación en 3 medios diferentes, los cuales fueron TSA (TSA), TSA con 5% de cloruro sódico (TSA-NaCl) y sales biliares (TSA-

S.B.). Los resultados en TSA están expresados como el logaritmo de la concentración del microorganismo y los resultados en TSA-NaCl y TSA-S.B. están expresados como el logaritmo de la diferencia de la concentración del microorganismo respecto al medio TSA. La diferencia entre el número de sobrevivientes recuperados en TSA y TSA-NaCl corresponde a la cantidad de células dañadas subletalmente en su membrana plasmática y la diferencia entre el número de sobrevivientes recuperados en TSA y TSA-S.B. corresponde a la cantidad de células dañadas subletalmente en su membrana celular externa.

TABLA 5. DAÑO SUBLETAL DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EXPUESTA A 0.037 μ M DE NISINA, 1 mM DE D-LIMONENO Y SU COMBINACION EN MEDIO DE CULTIVO TSB Y RECUPERADA EN TSA (TSA), TSA CON CLORURO SÓDICO (TSA-NaCl) Y TSA CON SALES BILIARES (TSA-S.B.) A DIFERENTES TIEMPOS (0, 30, 60 Y 90 MINUTOS). LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN ESTE EXPERIMENTO FUE DE 37°C.

TRATAMIENTOS	TIEMPO (MINUTOS)											
	0			30			60			90		
	TSA	TSA - NaCl	TSA - S.B.	TSA	TSA - NaCl	TSA - S.B.	TSA	TSA - NaCl	TSA - S.B.	TSA	TSA - NaCl	TSA - S.B.
Nisina 0.037 μ M	2.70	0.70	2.70	3.42	0.09	3.42	3.20	0.07	3.20	3.09	0.00	3.09
D-limoneno 1 mM	6.27	1.04	3.37	5.66	1.66	5.66	5.05	1.71	5.05	4.84	2.27	4.84
Nisina 0.037 μ M + D-limoneno 1 mM	2.78	0.08	0.30	1.48	0.00	1.48	1.85	0.15	1.85	1.34	0.02	1.34

Este experimento muestra que todas las células resultan dañadas en su membrana celular externa al ser tratadas tanto con nisina como con *D*-limoneno a las concentraciones ensayadas, sin embargo, se evidencia que la aplicación de 1 mM de *D*-limoneno requiere más tiempo para producir este efecto que los otros 2 tratamientos, no obstante, también produce el mayor daño a la membrana plasmática. Los datos de la tabla 5 sugieren que existe la probabilidad de que combinando nisina y *D*-limoneno en TSB a pH 7 a estas concentraciones, algunas células de *Listeria monocytogenes* dañadas en su membrana plasmática puedan prevalecer y sean capaces de reproducirse posteriormente.

Estos resultados concuerdan con los estudios de C. A. Murdock et al. 2007 [23], donde se explica el modo de acción de la nisina mencionado anteriormente. Sumado a esto, estudios comprueban que los principales mecanismos de acción de *D*-limoneno actúan sobre las membranas citoplasmáticas de los microorganismos, provocando una pérdida de

su integridad y la inhibición de las enzimas respiratorias (Rhayour et al., 2003; Sun, 2007; Sikkema, De-Bont, & Poolman, 1995) [1].

3.5 Curvas de crecimiento en productos de origen vegetal

A continuación, se muestran los resultados de enumeración de células viables a las 0, 24 y 48 horas en la bebida elaborada a base de zumo de frutas y leche de avena inoculada con una concentración inicial del microorganismo de 10^3 UFC/mL e incubada a 37°C (tabla 6) y 7°C (tabla 7). El pH resultante de esta bebida fue de 4.9. Los resultados están expresados como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro.

TABLA 6. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A 2 CONCENTRACIONES DE NISINA (N, 0.037 μ M Y 0.075 μ M), 2 CONCENTRACIONES DE D-LIMONENO (L, 1 mM Y 0.5 mM) Y SUS COMBINACIONES EN UNA BEBIDA ELABORADA A BASE DE FRUTAS Y LECHE DE AVENA CON pH 4.9 A 37°C DURANTE 48 HORAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (HORAS)		
	0	24	48
Control	2.65	3.99	2.69
N 0.075 μ M	2.20	2.80	<30 UFC/mL
L 1 mM	2.90	1.30	<30 UFC/mL
N 0.075 μ M L1 mM	1.95	1.77	<30 UFC/mL
N 0.037 μ M	2.46	1.28	<30 UFC/mL
L 0.5 mM	2.58	1.94	<30 UFC/mL
N 0.037 μ M L0.5 mM	2.08	2.41	<30 UFC/mL

TABLA 7. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A 2 CONCENTRACIONES DE NISINA (N, 0.037 μ M Y 0.075 μ M), 2 CONCENTRACIONES DE D-LIMONENO (L, 1 mM Y 0.5 mM) Y SUS COMBINACIONES EN UNA BEBIDA ELABORADA A BASE DE FRUTAS Y LECHE DE AVENA CON pH 4.9 A 7°C DURANTE 48 HORAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (HORAS)		
	0	24	48
Control	4.49	3.64	2.13
N 0.075 μ M	4.57	2.75	<30 UFC/mL
L 1 mM	4.63	1.52	<30 UFC/mL
N 0.075 μ M L1 mM	4.48	1.69	<30 UFC/mL
N 0.037 μ M	4.52	1.46	<30 UFC/mL
L 0.5 mM	4.54	1.30	<30 UFC/mL
N 0.037 μ M L0.5 mM	4.58	1.77	<30 UFC/mL

Según los resultados expuestos en las tablas 6 y 7, el pH de esta bebida mostró ser suficientemente restrictivo para inhibir el desarrollo del microorganismo utilizado en estos experimentos.

Ya probada la combinación de nisina y *D*-limoneno en esta bebida elaborada, se procedió a realizar pruebas en cremas de verduras, las cuales forman parte de otra categoría de alimentos de origen vegetal con composiciones y propiedades diferentes. Seguidamente, se muestran los resultados de enumeración de células viables a las 0, 24 y 48 horas de 2 cremas de verduras con diferentes pH's (5.0 y 5.5) inoculadas con una concentración inicial del microorganismo de 10^3 UFC/mL y almacenadas a temperaturas de incubación de 37°C (tablas 8 y 9) y 7°C (tabla 10). Los resultados están expresados como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro.

TABLA 8. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A NISINA (N), *D*-LIMONENO (L) Y SUS COMBINACIONES A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN CREMA DE VERDURAS CON pH 5.0 A 37°C DURANTE 48 HORAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (HORAS)		
	0	24	48
Control negativo	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
Control positivo	2.92	7.55	-
N 0.019 μ M	3.66	8.77	-
N 0.037 μ M	2.38	4.48	8.28
N 0.075 μM	2.20	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
L 0.25 mM	2.34	7.59	-
L 0.5 mM	3.83	7.65	9.28
N 0.019 μ M L0.25 mM	2.75	7.34	-
N 0.019 μ M L0.5 mM	2.41	7.74	-
N 0.037 μ M L0.25 mM	3.54	6.64	8.00
N 0.037 μM L0.5 mM	1.95	1.70	<30 UFC/mL
N 0.075 μM L0.25 mM	3.37	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
N 0.075 μM L0.5 mM	2.95	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL

TABLA 9. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A NISINA (N), D-LIMONENO (L) Y SUS COMBINACIONES A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN CREMA DE VERDURAS CON pH 5.5 A 37°C DURANTE 48 HORAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (HORAS)		
	0	24	48
Control negativo	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
Control positivo	2.91	8.66	-
N 0.019 μ M	2.66	8.95	-
N 0.037 μ M	2.38	5.72	8.80
N 0.075 μM	1.78	2.30	1.28
L 0.25 mM	2.67	8.49	-
L 0.5 mM	3.06	5.60	8.41
N 0.019 μ M L0.25 mM	2.32	7.66	-
N 0.019 μ M L0.5 mM	2.49	8.75	-
N 0.037 μ M L0.25 mM	2.41	7.34	-
N 0.037 μ M L0.5 mM	1.90	3.55	8.57
N 0.075 μ M L0.25 mM	1.78	5.65	8.47
N 0.075 μM L0.5 mM	1.70	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL

Los resultados de estos experimentos (tablas 8 y 9) demuestran la efectividad de la combinación de nisina y *D*-limoneno en cremas de verduras. Se observa que una concentración de 0.075 μ M de nisina es suficiente para inhibir el crecimiento del microorganismo en la crema de verduras de pH 5.0, pero es posible obtener el mismo efecto inhibitorio reduciendo la concentración de nisina a 0.037 μ M si lo combinamos con 0.5 mM de *D*-limoneno. Para conseguir la inhibición del crecimiento del microorganismo en la crema de verduras de pH 5.5 fue necesario combinar 0.075 μ M de nisina con 0.5 mM de *D*-limoneno. Estos resultados sugieren que la disminución del pH del alimento tiene un efecto positivo en la efectividad de estos antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, tanto de manera individual como combinados, lo cual concuerda con los estudios citados anteriormente. En 2012, L. Espina et al. [29] también reportó la efectividad de *D*-limoneno contra este microorganismo en alimentos de origen vegetal en combinación con otros tratamientos.

En la tabla 10 se exponen los resultados de recuento de células viables en las cremas de verduras (pH's 5.0 y 5.5) inoculadas con una concentración inicial de *Listeria monocytógenes* de 10^3 UFC/mL y almacenadas durante 2 semanas a una temperatura de 7°C. Estos resultados están expresados como \log_{10} [UFC/mL].

TABLA 10. RECUENTO DE SUPERVIVIENTES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (10^3 UFC/mL) EXPUESTA A 0.037 μ M DE NISINA (N), 0.5 mM DE D-LIMONENO (L) Y SUS COMBINACIONES EN CREMA DE VERDURAS CON DIFERENTES pH's (5.0 Y 5.5) A 7°C DURANTE 2 SEMANAS.

TRATAMIENTO	TIEMPO (DIAS)			
	0	1	7	14
Control positivo crema pH 5.0	2.92	3.09	3.32	4.12
N 0.037 μM crema pH 5.0	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
L 0.5 mM crema pH 5.0	2.56	2.92	3.29	4.13
N 0.037 μ M L0.5 mM crema pH 5.0	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL
Control positivo crema pH 5.5	2.91	3.29	4.51	5.44
N 0.037 μM crema pH 5.5	2.38	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	3.38
L 0.5 mM crema pH 5.5	2.68	3.06	4.53	5.71
N 0.037 μM L0.5 mM crema pH 5.5	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL	<30 UFC/mL

Los resultados expuestos en la tabla 10 sugieren que a una temperatura de 7°C, 0.037 μ M de nisina es capaz de retrasar por sí sola la fase de latencia del microorganismo en al menos 2 semanas para una crema de verduras con pH de 5.0, mientras que para la crema de verduras con pH 5.5 el retraso en la fase de latencia es menor aun cuando combinamos los 0.037 μ M de nisina con 0.5 mM de *D*-limoneno. En esta prueba realizada en un producto alimenticio confirmamos nuevamente un aumento en la sensibilidad del microorganismo en temperaturas de refrigeración, lo cual en 1995 Russell et al. [24] relacionó con el aumento en la fluidez de su membrana.

4. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un notable efecto sinérgico contra *Listeria monocytogenes* combinando nisina con *D*-limoneno y nisina con glucósido de steviol a las concentraciones ensayadas en alimentos de origen vegetal y en medio de cultivo TSB a diferentes pH's. La efectividad de estas combinaciones de antimicrobianos resultó mayor que la suma de sus efectos por separado, lo cual nos permite aplicarlos a concentraciones menores.
2. De las combinaciones de antimicrobianos evaluadas, nisina y *D*-limoneno fue la más efectiva a las concentraciones más bajas contra el microorganismo.
3. Se demostró que la combinación de nisina y *D*-limoneno produjo daños en la membrana externa de todas las células de *Listeria monocytogenes*, esto debido a que la nisina forma poros en la membrana resultando en la pérdida de materiales celulares; sumado a esto, los principales mecanismos de acción del *D*-limoneno actúan sobre la membrana citoplasmática del microorganismo.
4. Cuando se aplicó nisina y *D*-limoneno en alimentos de origen vegetal contra *Listeria monocytogenes*, se ratificó el efecto sinérgico de esta combinación y se evidenció que el efecto de estos antimicrobianos está condicionado por las características del alimento.
5. En este estudio también se confirmó que podíamos combinar los antimicrobianos nisina, *D*-limoneno y glucósido de steviol a concentraciones más bajas al aplicarlos en medios ácidos y almacenarlos a temperaturas de refrigeración, obteniendo resultados efectivos contra el microorganismo.
6. Se confirmó que el efecto antimicrobiano de la nisina depende del pH del medio, la temperatura de incubación y el tamaño del inóculo.
7. No obstante, la naturaleza hidrófoba del *D*-limoneno dificulta su dispersión homogénea en el agua, debido a esto se están realizando estudios con nanoemulsiones de *D*-limoneno para solventar este inconveniente. Hasta el momento, los primeros experimentos realizados en combinación con la nisina han resultado prometedores.

5. ANEXOS

5.1 Anexo 1

LEGILACION Y DATOS SOBRE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Alimentos	Legislación o Recomendación	Microorganismo	Otros límites. Comentarios.
Caldos, consomés, sopas y cremas (listos para el consumo, deshidratados, condensados, congelados o concentrados de aplicación a fabricantes y en el producto terminado y listo para el consumo)	Como referencia RD 2452/98 BOE 24/11/98	<i>Salmonella</i> n=5, c=0, Aus./25 g	Los criterios microbiológicos del R.D. 2452/1998 han sido derogados por R.D. 135/2010 B.O.E. 25/02/2010.
	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007	<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0, Ausencia en 25g	De aplicación sólo si pueden favorecer el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y en la fase anterior a la que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido. Considerar que no puede favorecer el crecimiento si $a_w \leq 0,92$.
<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0 100 UFC/ g		Fase de aplicación del criterio: productos comercializados durante su vida útil.	
Frutas y hortalizas troceadas (Listas para el consumo).	Reglamento CE 2073/2005 modificado por el Reglamento 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007	<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0 Aus/25 g	Fase de aplicación del criterio: antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido.
		<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0 100 UFC/g	Fase de aplicación del criterio: Productos comercializados durante su vida útil.
Zumos de frutas y hortalizas no pasterizados (Listos para el consumo).	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E. 22/12/2005 modificado por el Reglamento CE 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007	<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0 Aus/25 g	De aplicación sólo si puede favorecer el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> ; y en la fase anterior a la que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido. Considerar que no puede favorecer el crecimiento si el $pH \leq 4,4$ o vida útil < 5 días.
		<i>Listeria monocytogenes</i> n=5 c=0 100 u.f.c/g	Fase de aplicación del criterio: productos comercializados durante su vida útil.

Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>				
Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir, pero no crecer
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1,5 a +3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad de agua (a_w)	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	12 a 16	≥20
Atmósfera	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado a vacío o atmósfera modificada			

Adaptada de (FSAI, 2003) (UE, 2004, 2008).

5.2 Anexo 2

Reglamento (UE) No. 1129/2011 de la Comisión Europea de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no. 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión

Número E	Denominación	Dosis máxima (mg/l o mg/kg)
E234	Nisina	✓ 12.5 para queso fundido
		✓ 10.0 para natas y queso fresco
		✓ 6.25 para huevos y ovoproductos elaborados
		✓ 3.0 para postres de semolina, tapioca y productos similares
		✓ Zumos de frutas: no reglamentado.
	Citral	✓ BPF
	<i>D</i> -Limoneno	✓ BPF
	Stevia o steviol	✓ BPF

Normas Alimentarias FAO/OMS Codex Alimentarius

Disposiciones de la GSFA para nisina

Número	Categoría de alimentos	Nivel máximo
01.4.3	Nata (crema) cuajada (natural)	10 mg/kg
06.5	Postres a base de cereales y almidón (p. ej., pudines de arroz, pudines de mandioca)	3 mg/kg
01.6.5	Productos análogos al queso	12 mg/kg
01.6.6	Queso de proteínas del suero	12 mg/kg
01.6.2	Queso madurado	12 mg/kg

Disposiciones de la GSFA para *D*-limoneno

Recomendación de la Secretaría sobre las medidas que se requieren	Usos actuales en el Codex	Nivel máximo
Ninguna medida, al no haber ningún uso especificado en las actuales normas del Codex	Ninguno especificado	0-1.5 (Ingesta diaria admisible (IDA) vigente en mg/kg de peso corporal)

Disposiciones de la GSFA para citral

Incluido en el listado "B"	La lista B del Codex de Aditivos Alimentarios contiene las sustancias por las que han mostrado interés los Estados Miembros o la industria, y cuya evaluación por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) está pendiente.
-----------------------------------	--

Disposiciones de la GSFA para glucósidos de steviol

Número	Categoría de alimentos	Nivel máximo
14.1.4	Bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas	200 mg/kg
06.8.1	Bebidas a base de soja	200 mg/kg
14.2.7	Bebidas alcohólicas aromatizadas (p. ej., cerveza, vino y bebidas con licor tipo bebida gaseosa, bebidas refrescantes con bajo contenido de alcohol)	200 mg/kg
12.7	Ensaladas (p. ej., la ensalada de macarrones, la ensalada de patatas (papas)) y productos para untar en emparedados, excluidos los productos para untar a base de cacao y nueces de las categorías de alimentos 04.2.2.5 y 05.1.3	115 mg/kg
04.1.2.12	Frutas cocidas o fritas	40 mg/kg
04.1.2.7	Frutas confitadas	40 mg/kg
04.1.2.4	Frutas en conserva, enlatadas o en frascos (pasteurizadas)	330 mg/kg
04.1.2.3	Frutas en vinagre, aceite o salmuera	100 mg/kg
14.1.3	Néctares de frutas y hortalizas	200 mg/kg
12.9.2.3	Otras salsas de soja	165 mg/kg
04.1.2.9	Postres a base de fruta, incluidos los postres a base de agua con aromas de fruta	350 mg/kg
04.1.2.8	Preparados a base de fruta, incluida la pulpa, los purés, los revestimientos de fruta y la leche de coco	330 mg/kg
04.1.2.10	Productos de fruta fermentada	115 mg/kg
04.1.2.6	Productos para untar a base de fruta (p. ej., el "chutney"), excluidos los productos de la categoría de alimentos 04.1.2.5	330 mg/kg
04.2.2.6	Pulpas y preparados de hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas marinas y nueces y semillas (como los postres y las salsas a base de hortalizas y hortalizas confitadas) distintos de los indicados en la categoría de alimentos 04.2.2.5	165 mg/kg
04.2.2.5	Purés y preparados para untar elaborados con hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), algas	330 mg/kg

Número	Categoría de alimentos	Nivel máximo
	marinas y nueces y semillas (p. ej., la mantequilla de maní (cacahuete))	
04.1.2.11	Rellenos de fruta para pastelería	330 mg/kg
12.9.2.1	Salsa de soja fermentada	30 mg/kg
12.9.2.2	Salsa de soja no fermentada	165 mg/kg

6. Bibliografía

[1] Z. Zhang et al., 2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of *D*-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, Vol. 150, Pag. 307–312.

[2] S. Rangel et al., 2007. Aplicación del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) como antimicrobiano contra patógenos alimenticios, México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Nutrición y Alimentos. Tel/Fax/ (844) 4110319. Saltillo, Coahuila. labsara7@hotmail.com.

[3] R. Ximhai, 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas, México. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, Vol. 7, Número 1, pag. 153-170.

[4] D. Gómez et al., 2014, Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment, España. Universidad de Zaragoza, Departamento de Producción Animal y Ciencias Alimentarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, *Food Microbiology* 42 (2014) 61e65.

[5] <http://www.cdc.gov/spanish/listeria/statistics.html> (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. Gobierno de los Estados Unidos).

[6] Y. Huang, 2011. Putative role of the alternative sigma factor, SIGB, in survival of *Listeria monocytogenes* 568 during desiccation on stainless steel surfaces, Canada. Dalhousie University. URI: <http://hdl.handle.net/10222/14377>.

[7] J. Jaana R. et al., 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 65 (4), pag. 321–327.

[8] E. Charpentier & P. Courvalin, 1999. Antibiotic resistance in *Listeria spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 43 (9), pag. 2103–2108.

[9] S. Burt, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential.

applications in foods—a review, The Netherlands. Department of Public Health and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht.

[10] H. Takahashi et al., 2012. Effect of paired antimicrobial combinations on *Listeria monocytogenes* growth inhibition in ready-to-eat seafood products, Japan. Department of Food Science and Technology, Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology.

[11] P. Periago et al., 2004. Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions, España. Journal of Food Protection, Number 7, pag. 1328-1547, pag. 1408-1416(9).

[12] E. Abdollahzadeh et al., 2013. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat.

[13] G. Kronvall et al., 2011. International Journal of Antimicrobial Agents, vol. 38 (2011), pag. 281-290.

[14] M. Friedman, et al., 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, pag. 6042–6048.

[15] N. Tzortzakis & C. Economakis, 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. Innovative Food Science and Emerging Technologies, Vol. 8, pag. 253–258.

[16] D.L.J. Opdyke, 1979. Citral. Food Chem. Toxicol., Vol. 17, pag. 259–266.

[17] J.P. Huertas et al., 2014. Combined effect of natural antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores, España. Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena. Food Control 35 (2014) 73e78.

- [18] R. Murali, et al., 2013. Protective effects of *D*-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Vol. 112 (3), pages 175–181. DOI: 10.1111/bcpt.12010.
- [19] M. Puri et al., 2011. Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*. Vol. 29 (6), pag. 781–791.
- [20] V. Sai et al., 2011. Diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Molecules*, Vol. 16 (5), pag. 3552-3562.
- [21] F. J.Barba et al., 2014. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food Chemistry*, Vol. 148, pag. 261–267.
- [22] M.N. Criado et al., 2014. Effect of *Stevia rebaudiana* on oxidative enzyme activity and its correlation with antioxidant capacity and bioactive compounds. *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 7 (5), pag. 1518-1525.
- [23] C. A. Murdock, et al., 2007. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 44 (3), pag. 255–261.
- [24] P. M. Davidson et al., 2010. *Antimicrobials in Food*, Third Edition, Chapter 7, pag 239-262.
- [25] B. Robert, 1991. *Bioquímica*, 5ª Edición, Addison-Wesley, Iberoamericana.
- [26] E. Cantán, 2013. Estudio preliminar sobre la influencia de los genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB* en la resistencia al calor de *Escherichia coli*, España. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Área de Tecnología de Alimentos.
- [27]http://www.unex.es/investigacion/grupos/camiali/estructura/equipos/pagina_equipo?idequipo=312 (M.G. Alberto, 2013. Universidad de Extremadura).

[28]<http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/recuento-de-bacterias-viables/recuento-text> (Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada).

[29] L. Espina et al., 2012. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices, España. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 161, pag 23-30.