



Universidad
Politécnica
de Cartagena



**Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica**



**Grado en Ingeniería Agroalimentaria
y de Sistemas Biológicos**

Optimización de la letalidad de los tratamientos
térmicos aplicados en caldo de cultivo y alimentos
mediante la adición de nanoemulsiones de
compuestos microbianos naturales.

Autor: D. Carlos Manuel Leal Bolarin

Dirección: D. Alfredo Palop Gómez

Cartagena, junio de 2021

Optimización de la letalidad de los tratamientos térmicos aplicados en caldo de cultivo y alimentos mediante la adición de nanoemulsiones de compuestos microbianos naturales.

por CARLOS MANUEL LEAL BOLARIN

Fecha de entrega: 16-jun-2021 01:55p.m. (UTC+0200)

Identificador de la entrega: 1607449809

Nombre del archivo:

47711_CARLOS_MANUEL_LEAL_BOLARIN_TFG_Carlos_Leal_Bolarin_227379_952730138.pdf (1.03M)

Total de palabras: 15401

Total de caracteres: 80002

TFG Carlos Leal Bolarín

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Politécnica de Cartagena Trabajo del estudiante	1%
2	repositorio.upct.es Fuente de Internet	1%
3	tesisenxarxa.net Fuente de Internet	<1%
4	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1%
5	CLARA MIRACLE BELDA GALBIS. "APLICACIÓN CONJUNTA DE INGREDIENTES NATURALES Y TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS", Universitat Politècnica de Valencia, 2017 Publicación	<1%
6	www.theses.fr Fuente de Internet	<1%
7	revista.isciii.es Fuente de Internet	

<1 %

8

www.losandes.com.ar

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas Activo

Excluir coincidencias < 25 words

Excluir bibliografía Activo

Mis Agradecimientos:

A mi tutor, el Dr. Alfredo Palop Gómez, por su indescriptible apoyo, constancia y atención durante todo el proceso de investigación y desarrollo del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, que pese a las circunstancias han estado allí para ayudarme y tenderme una mano en cualquier momento en que lo he necesitado.

A mis compañeros de clase, ya que es un camino que hemos recorrido todos juntos, y sin ellos no hubiera sido lo mismo.

A todo el grupo docente que ha establecido las bases para que hoy en día pueda llegar a escribir esto.

Y, por último, a mi familia, amigos y pareja, que han sabido estar ahí, animarme a no detenerme y creer que podía desde el principio.

INDICE

Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción	2
1.1. Microorganismos patógenos	2
1.1.1. Salmonella	3
1.1.2 Listeria	5
1.2 Conservación de alimentos mediante tratamientos térmicos	6
1.3. Cinética de inactivación microbiana. D_T y Z.	8
1.4. Aceites esenciales	12
1.4.1 Citral	13
1.4.2 Nanoemulsiones	13
2. Justificación y objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1 Microorganismos utilizados	15
3.2 Medios utilizados para la investigación	15
3.3 Elaboración de nanoemulsión de Citral	15
3.4 Preparación de los cultivos	16
3.5 Tratamiento térmico	16
3.6 Recuento de microorganismos	19
3.7 Análisis de datos	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. Efecto de la adición de citral al agua de peptona tamponada en la resistencia al calor de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Senftenberg</i>	21
4.2 Efecto de la adición de citral al caldo de carne en la resistencia al calor de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Senftenberg</i>.	30
4.3. Optimización del tratamiento térmico mediante la adición de nanoemulsión de citral. 36	
5. Conclusiones	42
6. Bibliografía	43
7. Anexos	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Gráfica de supervivencia de los microorganismos. Fuente: (Palop, 2007).

Figura 1.2: Gráfica de termodestrucción del microorganismo. Fuente: (Palop,2007).

Figura 3.1: Termorresistómetro Mastia.

Figura 3.2: Jeringuilla Hamilton.

Figura 3.3: Contador de placas automático.

Figura 4.1: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* (A) y *Salmonella* Senftenberg (B) en agua de peptona tamponada con (●) y sin (●) citral 0,5 mM a 57,5°C.

Figura 4.2: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* a 52,5°C (A) y a 57,5°C (B) en agua de peptona tamponada con (●) y sin (●) una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

Figura 4.3: Gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg a 55,0°C (A) y a 60,0°C (B) en agua de peptona tamponada con (●) y sin (●) una nanoemulsión citra 0,5 mM.

Figura 4.4. Gráficas de termodestrucción de *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada, con (●) y sin (●) una nanoemulsión citral de 0,5 mM..

Figura 4.5: Gráficas de termodestrucción de *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada, con (●) y sin (●) una nanoemulsión citral 0,5 mM.

Figura 4.6: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* a 57,5 °C en agua de peptona tamponada (A) y en caldo de carne (B) con (●) y sin (●) una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

Figura 4.7: Gráficas de supervivencia de *Salmonella Senftenberg* a 60,0°C en agua de peptona tamponada (A) y en caldo de carne (B) con (●) y sin (●) citral.

Figura 4.8: Imagen del caldo antes (izquierda) y después (derecha) de ser homogeneizado.

Figura 4.9: Imágenes comparativas a microscopio entre el caldo antes (izquierda), y después (derecha), de ser homogeneizado.

Figura 4.10: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo de carne a 57,5°C sin homogeneizar (A) y homogeneizado (B) con (●) y sin (●) citral.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Taxonomía de *Salmonella* en género, especie, subespecie y serotipos. Fuente: (Lopez y Bueno, 2019).

Tabla 4.1: Valores D_t , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada a diferentes temperaturas.

Tabla 4.2: Valores D_t , Intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada a diferentes temperaturas, en presencia de una nanoemulsión de citral, 0,5 mM.

Tabla 4.3: Valores D_t , Intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada tratados a diferentes temperaturas.

Tabla 4.4: Valores D_t , Intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada a diferentes temperaturas en presencia de una nanoemulsión de citral 0,5 mM

Tabla 4.5: Valores z , intervalos de confianza para el 95%, coeficiente de correlación (r) y ecuación de la recta de regresión de la gráfica de termodestrucción, para *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada, con 0,5 mM y sin citral.

Tabla 4.6: Valores z , intervalos de confianza para el 95%, coeficientes de correlación (r) y ecuaciones de las rectas de regresión de las gráficas de termodestrucción para *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada con 0,5 mM y sin citral.

Tabla 4.7: Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo de carne a 57,5°C en distintas condiciones.

Tabla 4.8: Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg en caldo de carne a 60,0°C en presencia o no de una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

Resumen

Desde hace ya muchos años, en la industria alimentaria, el tratamiento térmico ha sido el método de inactivación microbiana más utilizado debido a la efectividad del tratamiento, el coste y la facilidad para realizarlo. Sin embargo, Los tratamientos térmicos que se realizan son muy intensos, lo que supone un coste económico y un impacto en la calidad final elevados. Esto ha llevado a que, en busca de alternativas para poder reducir el tiempo de estos tratamientos, se haya propuesto el uso de aceites esenciales. Sin embargo, el ser inmiscible en el agua ha resultado ser un inconveniente, por lo que se ha empezado a utilizar en forma de nanoemulsión.

Por eso, en este trabajo se ha estudiado la termorresistencia de dos microorganismos, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Senftenberg. Para ello, se introdujo el medio y los microorganismos en el termorresistómetro Mastia a distintos tiempos y temperaturas. Se comprobó que, sobre todo en *L. monocytogenes*, la nanoemulsión de citral causaba muy buenos resultados, dando una reducción de $D_{52,5^{\circ}\text{C}}$ de 35,5 a 3,68 minutos, es decir, 9 veces. En *Salmonella*, aunque menor, redujo su resistencia al calor, con un D_{55} de 25,63 a 13,56 minutos. En caldo de carne, por otro lado, los resultados no fueron tan pronunciados. En *L. monocytogenes* el $D_{57,5}$ se redujo de 0,966 a 0,581 minutos, mientras que en *S. Senftenberg* el $D_{60,0}$ fue de 3,90 a 3,63 minutos. La disminución de la termorresistencia en presencia de la nanoemulsión de citral permitiría optimizar los tratamientos térmicos aplicados, reduciendo el tiempo y/o la temperatura de tratamiento y manteniendo los mismos niveles de seguridad alimentaria para estos microorganismos. Estas reducciones podrían llegar hasta un 40% del tiempo de tratamiento a una temperatura de $57,5^{\circ}\text{C}$ en el caso de *L. monocytogenes* en caldo de carne y serían incluso muy superiores si se considera el efecto de la nanoemulsión de citral en la termorresistencia en agua de peptona tamponada. Estos resultados ponen de manifiesto un posible uso de los aceites esenciales, en forma de nanoemulsión, para reducir la intensidad de los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos.

Abstract

Since many years, the heat treatments applied in the food industry have been the most used microbial inactivation method due to the effectivity of the treatment, the cost and the facility to make apply it. However, the heat treatments that are necessary to apply in order to ensure food safety and to provide self-stable foods are too severe, which means expensiveness and major quality. In search of alternatives to reduce the intensity of heat treatments, essential oils had been found to be useful against microorganism. However, essential oils are hydrophobic, so it use is in form of nanoemulsions has been proposed.

The objective in this research is to study the effect of the addition of nanoemulsioned citral to the heating médium in the heat resistance of two microorganisms, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Senftenberg. The experiments were performed in the thermoresistometer Mastia at different temperatures and sampling times. The results showed a great effect in *L. monocytogenes*, with a reduction of $D_{57,5}$ value from 1,74 to 0.196 minutes. In *Salmonella*, the reduction effect is lower, but the D_{60} value was still reduced from to 3,90 to 3,63 minutes. The reduction of the thermoresistance with the nanoemulsion it makes possible the optimization of the heat treatment with the same levels of security. It's posible to reach a 40% of reduction with *L. monocytogenes* with a temperatura of $57,5^{\circ}\text{C}$ with the meat broth, and in buffered peptone water would be even

better. In meat broth, the results weren't as good than in buffered peptone water. In *L. monocytogenes* the $D_{57,5}$ value was reduced from 0,966 minutes to 0.581 minutes. S. Senftenberg, the D_{60} value was reduced from 3.90 minutes to 3.63 minutes. The results shows that essential oils might be used, in form of nanoemulsión, to reduced the intensity of heat treatments applied to the aliments.

1. Introducción

1.1. Microorganismos patógenos

Se entiende por microorganismo patógeno, a todo microorganismo que puede causar enfermedades en el ser humano. Entre estos microorganismos se pueden encontrar bacterias, virus, hongos, protozoos y priones. Estos microorganismos patógenos, y las toxinas que producen, son los responsables de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA), (FAO, 2020). Los microorganismos pueden aparecer a lo largo de toda la cadena alimentaria, (Espinosa *et al.*, 2015). Las ETA se pueden dividir a su vez en tres tipos:

- Infección: se produce al consumir alimentos con el microorganismo patógeno vivo, multiplicándose en el tubo digestivo, de manera que el alimento solamente actúa como portador del microorganismo. (Ros y Bustillo, 2009).
- Intoxicación: la intoxicación se debe al consumo de un alimento que presenta toxinas producidas por los microorganismos patógenos. Estas pueden causar enfermedad sin la necesidad de que el microorganismo esté presente (Ros y Bustillo, 2009).
- Toxiinfección: son aquellas que son transmitidas por alimentos y son causadas por microorganismos patógenos, de manera que se desarrollan en el tubo digestivo del hospedador y allí producen sus toxinas. (Durich, 2002).

Cuando son producidas por alimentos de origen animal se denominan “zoonosis de transmisión alimentaria”.

Estas enfermedades pueden producirse tanto por bacterias, como por virus, o incluso parásitos y suponen una gran problemática a nivel global debido a su gran impacto a nivel económico y social (Kopper, 2009).

Normalmente estas enfermedades suelen manifestar síntomas gastrointestinales, sin embargo, de manera menos común también pueden aparecer síntomas neurológicos, inmunológicos, etc. Se estima que aproximadamente una de cada diez personas contrae una enfermedad de transmisión alimentaria cada año, enfermando 550 millones de personas, siendo 220 millones niños menores de 5 años (OMS, 2021).

Hay varios organismos encargados de regular la seguridad alimentaria (Gestion y Calidad, 2020), estableciendo distintas pautas de actuación con una serie de normas o requisitos que las distintas empresas o establecimientos deben asegurar para su correcto funcionamiento:

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO): la FAO es una agencia internacional a la que pertenecen más de 130 países, que tiene por objetivo establecer una seguridad alimentaria común y poner fin al hambre.
- Organización Mundial de la Salud (OMS): la OMS es una organización internacional que tiene como objetivo luchar contra las distintas enfermedades que atacan a los seres humanos y se fundó en 1948.
- European Food Safety Authority (EFSA): la EFSA es una agencia que fue fundada por la Unión Europea, pero que opera independientemente de su legislación y sus instituciones ejecutivas. Fue fundada en 2002 debido a una serie de crisis alimentarias ocurridas en los noventa, y tiene como objetivo prevenir riesgos de nivel alimentario (EFSA).
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición: (AESAN): la AESAN es un organismo autónomo que está adscrito a los ministerios de Consumo, de Sanidad y de agricultura y Alimentación con el objetivo de promover la seguridad alimentaria en España mediante la información sobre el sector agroalimentario y educando sobre la nutrición (*Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*).

Entre las bacterias patógenas más comunes, se encuentran *Salmonella* y *Listeria*.

1.1.1. *Salmonella*

Salmonella se describe por primera vez ya a principios del 1800, cuando, investigando las causas de muerte de pacientes por lesiones gastrointestinales, se hablaba de la fiebre tifoidea. Pero no sería hasta 1860, cuando Karl Joseph Eberth (1835-1926), descubrió e identificó por primera vez la enfermedad, conociéndola por *Eberthella Typha* (Dunlop, R.H; Williams, D.I, 1996). Fueron Daniel Elmer Salmon (1850-1914), y Theobald smith (1859-1934), los que la describirían por primera vez como *Salmonella typhi* (Ledermann D., 2003). No obstante, fue finalmente el bacteriólogo francés Joseph León Marcel Lignières (1868-1933) el que propuso unar a todas estas bacterias como *Salmonella* (Dunlop, R.H., Williams 1996).

Salmonella es una bacteria que entra dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae*, está constituida por bacilos gramnegativos anaerobios facultativos. Hay dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, los cuales presentan a su vez más de 2500 serotipos. A su vez, *S. enterica* está compuesta por seis subespecies (tabla1.1):

Taxonomía (forma de escritura) y nomenclatura				
Género (Mayúscula e Itálica)	Especie (Itálica)	Subespecie (itálica)	Serotipo (o serovariedad) Mayúscula sin itálica	Números de serotipos en cada especie o subespecie
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	Choleraesuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhi, Typhimurium	1586
		<i>salamae</i> (II)		522
		<i>arizonae</i> (IIIa)		102
		<i>diarizonae</i> (IIIb)		338
		<i>houtenae</i> (IV)		76
		<i>indica</i> (VI)		13
	<i>bongori</i>			22

Tabla 1.1: Taxonomía de *Salmonella* en género, especies, subespecies y serotipos. Fuente: (Lopez y Bueno, 2019).

La salmonelosis es la enfermedad provocada por *Salmonella*. El periodo de incubación es por lo general entre 12 y 36 horas, durando la enfermedad entre 2 y 7 días. Los síntomas a menudo son leves y no requiere de tratamiento específico. Sin embargo, en niños pequeños y ancianos, estos síntomas podrían agravarse (OMS, 2021). Entre los síntomas se encuentran dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces, vómitos. En la mayor parte de los casos se trata de síntomas leves, pero en niños y ancianos pueden llegar a ser bastante graves.

Están presentes en las aves de corral, los huevos, porcino y vacunos. Sin embargo, sin los controles e higiene necesarios, pueden llegar a aparecer en productos procesados o establecimientos de comida (OMS, 2021).

Según la EFSA, en 2019 se notificaron 87,923 casos de salmonelosis en seres humanos en Europa, igualándose los números a 2018. Estos números han sido constantes durante los últimos cinco años, desde 2015. Es la segunda infección gastrointestinal que más afecta a seres humanos en Europa, después de la campylobacteriosis (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2021).

Para prevenir contaminaciones por *Salmonella*, es importante mantener unas medidas de higiene adecuadas, como asegurarse de cocinar bien los alimentos antes de la ingesta, higiene de manos y, sobre todo, evitar contaminaciones cruzadas mezclando distintos tipos de alimentos o usando los mismos utensilios para cortar dos alimentos diferentes. En la actualidad, se están implantando medidas a nivel de producción primaria, dada la importancia que ha cobrado el control de la población de gallinas portadoras de *Salmonella* y asintomáticas en la transmisión de la enfermedad (EFSA, 2021).

1.1.2 *Listeria*

El descubrimiento de *Listeria* se remonta a 1924, cuando, investigando sobre la muerte en extrañas circunstancias de conejos y cerdos de Guinea, Murray et al descubrieron que la bacteria que los causaba todavía no había sido descrita, por lo que la bautizaron como *Bacterium monocytogenes*, (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2016). Casi al mismo tiempo, James Pirie describió lo mismo en un roedor en estado febril en Kenia, y llamó al bacilo *Listerella hepatolytica* (Olivares, 2009). No fue hasta 1957 cuando esta confusión fue resuelta por el taxónomo alemán Heinz Seeliger, que propuso el nombre de *Listeria monocytogenes*, en honor a Joseph Lister, considerado uno de los padres de la microbiología (Olivares, 2009).

Listeria es una bacteria que entra dentro de la familia *Listeriaceae*, constituida por bacilos gram-positivos, en forma de varilla. Son anaerobios facultativos y no producen endosporas (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2016). La especie más conocida es *L.monocytogenes*, patógeno causante de la listeriosis. Sin embargo, *Listeria* se divide a su vez en 16 especies, 6 de las cuales están incluidas en el grupo de *L.monocytogenes*, (Jones y Seeliger, 1986). Las 17 especies que constituyen el género *Listeria* son: *L. monocytogenes*, *L. cornellensis*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L.innocua*, *L. marthii*, *L. fleishchmannii*, *L. aquatica*, *L. rocourtiae*, *L. newyorkensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. ivanovii*, *L. floride* y *L. grandensis*. Sin embargo, las únicas especies de *Listeria* invasivas identificadas hasta la fecha son *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.

La listeriosis es considerada una de las enfermedades transmitida por los alimentos más graves a pesar de ser poco común (0,1 a 10 casos anuales por millón de personas, variando esta cifra en función del país y la región). La razón es que, a pesar de ser relativamente rara, la tasa de mortalidad es elevada. Hay dos tipos de listeriosis con distinta sintomatología:

- Listeriosis no invasiva: entre los síntomas más comunes se encuentran la fiebre, la diarrea, dolor de cabeza y dolor muscular. Tiene un periodo de incubación corto y proviene de la ingesta de alimentos con *L. monocytogenes* (OMS, 2021).
- Listeriosis invasiva: es una forma más severa que afecta a diferentes grupos de riesgo como pueden ser personas inmunodeprimidas, niños, ancianos o mujeres embarazadas. En estos grupos, la mortalidad asciende al 20-30%. Los síntomas son fiebre, mialgia, meningitis, etc (OMS, 2021).

Aproximadamente se notifican en España entre 300-400 casos anuales de listeriosis, produciéndose aproximadamente un 9% de defunciones. Suelen ser casos esporádicos, de pequeños brotes intrafamiliares, o transmisión vertical (de madre a recién nacido). La mayoría de casos notificados rondan los 65-70 años de edad (Ministerio de sanidad, 2019).

1.2 Conservación de alimentos mediante tratamientos térmicos

En el procesado de alimentos, es necesario asegurar la calidad y trazabilidad alimentaria de manera que los alimentos puedan ser conservados durante más tiempo, en las mejores condiciones posibles. Aunque existen una diversa cantidad de técnicas de procesado de los alimentos, el tratamiento térmico es una de las estrategias más efectivas debido a los excelentes resultados que consigue en periodos relativamente cortos de tiempo (IAA, 2020).

Los tratamientos térmicos se producen mediante la transferencia de calor, proceso mediante el cual un cuerpo transmite su energía a otro cuerpo de menor temperatura (Perez Reyes et al, 2013).

Existen tres medios de transferencia de calor:

Conducción: la transferencia de calor por conducción se debe al movimiento de las moléculas sin que exista un movimiento del material en sí. (Young, Freedman, 2008). En la conducción intervienen dos cuerpos a distinta temperatura, apareciendo un gradiente entre estas y desplazándose la energía desde el cuerpo que posee más (Perez Reyes et al, 2013), de manera que la conducción se produce como un intercambio de energía cinética entre las moléculas de ambos cuerpos (Iguaz, 2020).

Convección: la convección se produce cuando existe un desplazamiento de masa entre dos puntos (Young, Freedman, 2008). Se da en mayor medida cuando las moléculas están mezcladas unas con otras y en régimen turbulento (Iguaz, 2020)

La convección puede ser natural, cuando el movimiento del fluido resulta de la diferencia de temperatura, que a su vez provoca una diferencia de densidad; o forzada, cuando el movimiento es provocado por un equipo mecánico como un agitador (Iguaz, 2020)

Radiación: la transferencia de calor por radiación se produce cuando interviene radiación electromagnética (Young, Freedman, 2008). Al producirse radiación desde un foco, otro distinto absorbe parte de esa radiación, lo que provoca un aumento en su temperatura (Iguaz, 2020).

Cualquier cuerpo que recibe una energía radiante tiene la capacidad de reflejarla, transmitirla y absorberla, lo que se conoce como reflectividad, transmitividad y absorptividad.

Dentro de los tratamientos térmicos, existen cuatro tipos que son los más importantes debido a su uso frecuente en la industria alimentaria:

- Escaldado o blanqueado: es una técnica muy empleada en hortalizas y frutas, ya que se obtienen muy buenos resultados en cuanto a la inactivación enzimática, que propicia cambios en las propiedades organolépticas del alimento en cuestión.

Consiste en un tratamiento térmico suave, que ronda en torno a los 70-100°C y su duración puede variar entre 1 a 15 minutos en función del tipo de alimento, el tamaño y el volumen del producto (Castro Ríos, 2012).

Cabe destacar que esta técnica suele ir previa a un segundo tratamiento y que no alarga la vida útil de los alimentos, su objetivo no es la inactivación microbiana. Además, se utiliza muchas veces para facilitar el pelado, como en el caso de los pimientos (Ros & Bustillo, 2019).

- Cocción: la cocción es un proceso mediante el cual no se destruye la actividad microbiana, sino que se pretende actuar sobre las propiedades del alimento en sí, como variaciones en la terneza de la carne o del color en las frutas y hortalizas (Casp Vanaclocha and Abril Requena, 2003).
- Pasteurización: la pasteurización es un proceso mediante el cual se produce la inactivación microbiana de un alimento mediante la exposición de este a altas temperaturas. El tiempo de exposición y las temperaturas variarán en función del microorganismo que se quiera eliminar (Castro Ríos, 2012).

El rango de temperaturas más común es de unos 72°C si se desea una pasteurización rápida (15-20 segundos); para la cual se utilizan intercambiadores de calor, o 63°C, para una pasteurización lenta (30 minutos); para la cual son necesarios tanques de pasteurización (Castro Ríos, 2012)

- Esterilización: la esterilización es un proceso térmico mediante el cual se exponen alimentos a muy altas temperaturas con el objetivo de eliminar aquellos microorganismos que son más resistentes, como pueden ser bacterias esporuladas (Casp Vanaclocha and Abril Requena, 2003).

Después de la esterilización, se envasan los alimentos en ambientes estériles o asépticos con el fin de evitar contaminaciones posteriores. Son utilizadas temperaturas que oscilan en un rango de 135-150°C mediante la acción de vapor en estado de saturación seco. Más tarde, se debe realizar un enfriamiento rápido aprovechando el intercambiador de calor en un intercambio regenerativo (Castro Ríos, 2012).

Aunque la aplicación de tratamientos térmicos a los productos alimentarios aporta una gran variedad de ventajas, sobre todo en cuanto a seguridad alimentaria se refiere por la inactivación de los microorganismos, el uso de estos tratamientos puede afectar en gran medida a la calidad de los alimentos. Por este motivo se busca utilizar tecnologías emergentes que puedan ser alternativas a los tratamientos térmicos, como las altas presiones, las microondas o los tratamientos combinados, con el fin de reducir la intensidad de los tratamientos térmicos y reducir el impacto en las propiedades organolépticas de los productos.

1.3. Cinética de inactivación microbiana. D_T y Z .

A lo largo de los años, se han desarrollado multitud de técnicas asociadas a la inactivación de los microorganismos con el fin de asegurar la inocuidad de los alimentos. De esta manera, no solo han aparecido nuevas técnicas emergentes alternativas de los métodos más clásicos, sino que se han optimizado los métodos más tradicionales para reducir su coste, tiempo y efectos adversos.

Para lograr esta mejora en la efectividad de los tratamientos, no solo ha sido necesaria la investigación y mejora de estas técnicas, ya que el estudio de los microorganismos y sus parámetros cinéticos han servido para poder afinar los procesos. (Coronel, Aguilera et al, 2009). La encargada del estudio y desarrollo de los modelos matemáticos que permiten predecir el comportamiento de los microorganismos cuando son sometidos a la acción de un agente letal es la microbiología predictiva, haciendo un uso combinado de la biología, las matemáticas y la estadística (Samuel Lima, 2017)

En principio, para poder hacer una descripción del comportamiento de estos microorganismos frente a los diferentes tratamientos, se utilizaban modelos lineales, como la cinética de primer orden, que establece que la resistencia de los microorganismos se puede modelizar según una relación exponencial entre el número de microorganismos supervivientes y el tiempo del tratamiento aplicado (Coronel, Aguilera et al, 2009).

La ecuación 1.1 representa la destrucción de los microorganismos siguiendo una cinética de primer orden:

$$N = N_0 \cdot e^{-kt} \text{ (ec 1.1)}$$

Dónde:

N = Número de microorganismos que siguen vivos tras un tiempo “ t ” de tratamiento mientras se mantiene una temperatura constante.

N_0 = Número de microorganismos vivos antes de comenzar el tratamiento.

k = Constante de inactivación microbiana.

t = Tiempo de tratamiento.

La cinética de primer orden establece que existe una proporcionalidad entre el logaritmo de los microorganismos que sobreviven y el tiempo al que están expuestos al tratamiento.

Por lo tanto, si se aplican logaritmos a esa misma ecuación y se representan gráficamente, se podría observar esa proporcionalidad, obteniéndose la gráfica de supervivencia, la cual es una línea recta (figura 1.1):

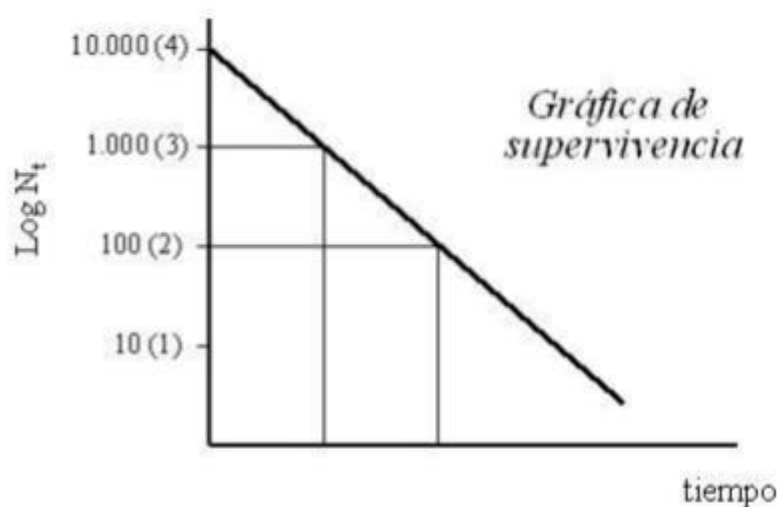


Figura 1.1: Gráfica de supervivencia de los microorganismos. Fuente: (Palop, 2007).

Aplicando logaritmos neperianos a la ecuación 1.1, esta quedaría así (Ecuación 1.2):

$$\ln N = \ln N_0 - kt \quad (\text{ec 1.2})$$

Por tanto, con esta ecuación se puede representar el número de microorganismos que resisten a un tiempo dado conociendo el número inicial de microorganismos presente y su constante de inactivación. Esta inactivación microbiana se realiza de manera progresiva a lo largo del tiempo.

El hecho de que la cinética de inactivación microbiana por calor siga una cinética de primer orden implica que, al menos matemáticamente no es posible inactivar completamente una población de microorganismos, ya que esta cinética tiende a cero, pero nunca llega, es decir, en la gráfica no se puede representar un valor de $N=0$.

Como no es posible representar el tiempo en el que se da la inactivación microbiana completa, ya que se está representando en forma logarítmica, se utiliza el concepto de “tiempo de reducción decimal” (D_T) como sustitución. El D_T establece cual es el tiempo necesario, a una temperatura constante, para que el número de microorganismos supervivientes caiga en un 10% del valor inicial, o lo que es lo mismo, en una unidad logarítmica.

El tiempo de reducción puede calcularse como en la ecuación 1.3:

$$D_T = \frac{t}{\log\left(\frac{N_0}{N_t}\right)} \quad \text{ó; } \log\left(\frac{N_0}{N_t}\right) = \frac{t}{D_T} \quad (\text{ec 1.3})$$

Donde:

N_0 = Número inicial de microorganismos.

$N(t)$ = Número de microorganismos a tiempo t.

$$D_T = \frac{2.303}{k} \quad (\text{ec 1.4})$$

Ecuación resultante al realizar la conversión de los logaritmos neperianos a los logaritmos decimales.

De la misma manera, para conocer la temperatura necesaria para poder reducir D_T una décima parte, es decir, una reducción logarítmica, se emplea el valor z, el cual se puede calcular de la siguiente forma (Ecuación 1.5):

$$z = \frac{\Delta T}{\log D_{T_2} - \log D_{T_1}} \quad (\text{Ec 1.5})$$

Donde:

ΔT es la diferencia entre las temperaturas T_1 y T_2 .

$\log D_{T_1}$ es el logaritmo del valor D a la temperatura 1.

$\log D_{T_2}$ es el logaritmo del valor D a la temperatura 2.

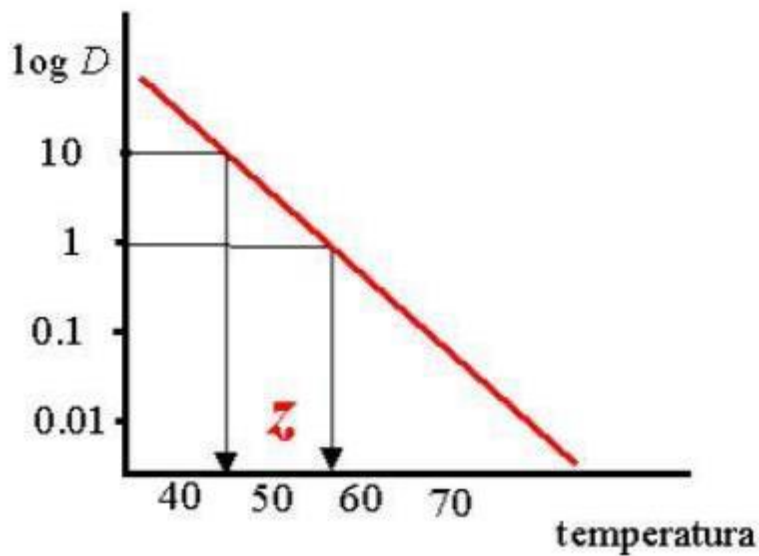


Figura 1.2: Gráfica de termodestrucción del microorganismo. Fuente: (Palop,2007).

El valor z se puede hallar conociendo la pendiente de la gráfica de termodestrucción (figura 1.2), ya que es igual a la inversa de esta.

Estos valores no son estáticos, es decir, cada microorganismo posee sus propios valores D_T y z en función de la resistencia que tengan ellos en los diferentes tratamientos, y los medios en los que se cultiven. Por ejemplo, la resistencia de un microorganismo esporulado es mucho mayor que la de una bacteria vegetativa. Incluso entre microorganismos semejantes las resistencias pueden variar bastante. Como por ejemplo con los gramnegativos, los cuales son menos resistentes al calor que los grampositivos.

1.4. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) cada vez tienen más importancia en la industria, debido a su origen puramente natural, que se ve incentivado por la preferencia actual de los consumidores por aquellos productos que tienen un origen más natural, frente a los aditivos sintéticos y a la gran variedad de aplicaciones que se les puede dar. (Campezo, 2016)

Los AEs son metabolitos secundarios producidos como respuesta al mecanismo de defensa de las plantas. Los AEs han sido utilizados durante muchos años para diferentes fines, ya sea como productos cosméticos, ya empleados en antiguas civilizaciones como los egipcios, o para evitar el crecimiento de microorganismos como, bacterias y hongos en alimentos procesados (Aljaafari *et al.*, 2019)

Los AEs están presentes en una gran multitud de plantas, pudiendo llegar a aislarse desde diferentes partes de esta: en las raíces (azafrán, cúrcuma), en las hojas (albahaca, eucalipto), en el fruto (limón, mandarina), en el tallo (canela), etc, (Martinez M, 2001).

Hace 500 años, ya existían métodos para extraer los aceites esenciales de las plantas. Sin embargo, a lo largo de los años se han ido refinando las distintas técnicas para la obtención de los AEs de una forma más rápida y eficaz. Una de estas técnicas consiste en la hidrodestilación (Aljaafari *et al.*, 2019).

Los AEs generalmente son volátiles, se denominan aceites pese por su carácter liposoluble, poseen un sabor y olor llamativo, generalmente agradable, lo cual hace que se utilicen como sustancias aromatizantes (Maté, 2016). Presentan un estado líquido a temperatura ambiente y presentan un color ligeramente amarillento al extraerse. Son liposolubles, pero se pueden solubilizar en alcohol o disolventes orgánicos.

El carácter antimicrobiano de estos AEs proviene sobre todo de la presencia de compuestos volátiles bioactivos, siendo estos el 90-95% de su composición, como monoterpenos, hidrocarburos sesquiterpénicos, alcoholes, ésteres, aldehídos, etc. El otro 5% restante corresponde a los compuestos no volátiles, como las cetonas, hidrocarburos, esteroides, carotenoides, etc, pudiendo variar entre cada aceite esencial o incluso en qué parte de la planta se encuentre. (Maté, 2016). Debido al carácter hidrofóbico de los AEs, estos parece que tienen un mayor efecto en Grampositivas que en Gramnegativas. Esto se debe a que los AEs son capaces de interactuar con la membrana de las células. Sin embargo, las Gramnegativas poseen una pared celular hidrofílica que impide esta interacción (Somrani, 2020).

1.4.1 Citral

El citral es un aldehído monoterpenoide acíclico que se puede encontrar de manera natural en algunas hojas y frutos de algunas plantas como pueden ser el limonero o el naranjo. Está constituido por dos isómeros, que son el neral y el geranial, responsables del característico aroma a limón, que se utiliza en algunos casos como saborizante. Es por esto que es considerado como un aditivo seguro, ya que no presenta riesgo alguno para el consumidor. Además, es muy conocido por su gran efecto antimicrobiano al combinarlo con otros tratamientos (Somolinos *et al.*, 2010).

El citral es uno de los compuestos aromatizantes más utilizado en la industria, ya que está presente en alimentos, cosméticos, cremas dentales, chicles, etc. El citral se suele extraer generalmente de hierba luisa o jengibre y posee un intenso aroma a limón. El citral ha sido objeto de estudio en numerosas ocasiones como antimicrobiano natural, como antioxidante y como conservante de alimentos (Tafur, 2019).

El aceite esencial en concreto que se ha usado para este trabajo es (3,7- Dimethyl- 2,6-octadienal, siendo una mezcla entre los dos isómeros, neral y gerania. Tiene ligero tono amarillento y presenta un estado líquido.

1.4.2 Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles, ya sean agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W) y son termodinámicamente inestables. (Singh *et al.*, 2017). Una nanoemulsión presenta un tamaño de partícula por debajo de los 200nm, por lo tanto, aquellas que presentan gotas con el tamaño suficiente para sedimentar se les considera emulsiones (Alvarado López y Medina Lezama, 2019).

Al tener un tamaño de gota tan pequeño, las nanoemulsiones se vuelven transparentes o translúcidas. Entre las propiedades de las nanoemulsiones se encuentran la alta estabilidad cinética, que viene dada por la formulación fisicoquímica, la composición y la distribución y tamaño de gota (Maté, 2016).

Para la obtención de las nanoemulsiones se requieren altas cantidades de energía, ya que las mezclas de líquidos inmiscibles son sistemas termodinámicamente inestables. La energía puede ser suministrada por distintos métodos:

- Métodos de dispersión: Son los métodos que utilizan la energía cinética, por lo que dependen del tiempo y la energía que se aplique. Se suelen utilizar equipos de ultrasonidos o de homogeneización de alta presión.
- Métodos fisicoquímicos: Estos métodos consisten en cambiar el equilibrio termodinámico entre un sistema modificando ciertas variables del sistema con el objetivo de crear un desequilibrio con la energía suficiente para que se produzcan transiciones de fase que produzcan emulsiones con tamaños de gota reducidos. Un método que se utiliza es el de Temperatura de Inversión de Fase. (Maté, 2016).

Se tiene constancia de que los aceites esenciales tienen un mayor efecto antimicrobiano cuando se utilizan en forma de nanoemulsión, debido a la capacidad de estas de penetrar debido al tamaño de gota así como la reducción de las alteraciones en las propiedades organolépticas con respecto al aceite esencial puro.

2. Justificación y objetivos

Cada vez son más las empresas e industrias agroalimentarias que apuestan por dar productos más seguros con el mínimo procesado posible. Esto se debe a que hay un aumento en la demanda de productos naturales por parte de los consumidores. Esta tendencia ha originado que la industria agroalimentaria busque formas alternativas de procesar los alimentos que alteren lo mínimo posible el producto.

Para garantizar la conservación e inocuidad de un alimento se deben inactivar aquellos microorganismos que puedan causar algún tipo de alteración a las propiedades del alimento, así como comprometer su inocuidad. El método más común realizado hoy en día es el tratamiento térmico, debido a sus buenos resultados en periodos de tiempo relativamente cortos. El problema de estos tratamientos es que, a pesar de ser relativamente cortos, las altas temperaturas a las que son sometidos estos alimentos alteran sus características organolépticas, lo cual puede repercutir en un detrimento notable en la calidad del producto.

Por esta misma razón la industria alimentaria necesita de diferentes alternativas que puedan bien sustituir los tratamientos térmicos por otros tipos de procesado que tengan un efecto menor sobre la calidad del alimento, o bien reducir el tiempo de exposición del producto al tratamiento térmico, o ambas. Este trabajo se enmarca dentro de los estudios que pretenden reducir la intensidad de los tratamientos térmicos, estudiando el uso de citral combinado con un tratamiento térmico y observando así el impacto que tiene en la resistencia microbiana al calor. Debido al carácter hidrofóbico de los aceites esenciales, que dificulta su distribución homogénea en medios acuosos, se propone el uso de citral en forma de nanoemulsión.

Así pues, el objetivo principal de este trabajo es tratar de reducir la intensidad de los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos mediante la adición de citral en forma de nanoemulsión, manteniendo las mismas garantías de seguridad alimentaria.

Este objetivo principal se desglosa en los siguientes objetivos parciales.

- Conocer el efecto de la adición de la nanoemulsión de citral en la resistencia de dos microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, *Salmonella* Senftenberg y *Listeria monocytogenes*, utilizando un medio de cultivo preparado en el laboratorio (agua de peptonada tamponada).
- Conocer el efecto de la adición de la nanoemulsión de citral en la resistencia de esos dos mismos microorganismos en un caldo de carne.
- Optimizar el tratamiento térmico en base a los resultados obtenidos.

3. Materiales y métodos

3.1 Microorganismos utilizados

Estos experimentos se han realizado con dos microorganismos, *Listeria monocytogenes* CECT 4032 y *Salmonella enterica* serovariedad Senftenberg CECT 4565 proporcionados por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). Ambos microorganismos se mantuvieron en criopreservación en tubos Eppendorf con un 30% de glicerol como crioprotector a una temperatura de -80°C con el fin de poder mantenerlos en correctas condiciones hasta su posterior uso.

3.2 Medios utilizados para la investigación

Para realizar los experimentos han sido necesarios distintos medios de cultivo y reactivos para realizar las distintas actividades en las que estaban compuestas:

- Agua de peptona tamponada (APT). (Scharlab, Barcelona, España.)
- Agar de tripton y soja (Tryptone Soy Agar, TSA). (Scharlab, Barcelona, España).
- Aceite esencial de citral (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania).
- Lecitina de soja (Korott, Alicante, España).
- Caldo de tripton y soja (Tryptone Soy Broth) (Scharlab, Barcelona, España).
- Caldo casero de carne (Gallina blanca, Barcelona, España).

3.3 Elaboración de nanoemulsión de Citral

El ultraturrax es el equipo mediante el cual se preparan las nanoemulsiones. La manera de preparar la nanoemulsión es mediante el método de homogeneización. El gran rango de velocidades que alcanza el ultraturrax consigue romper las gotas de aceite en otras más pequeñas gracias a la fuerza de cizalla.

Lo primero a realizar para la elaboración de la nanoemulsión de citral es hidratarla lecitina de soja, debido a que esta viene deshidratada y en forma de gránulo. Para ello, se deben pesar 10 gramos de lecitina, a los que se le añade 20 mL de agua destilada. Después se introduce la mezcla de un baño de agua a 50°C y se mantiene a una temperatura durante una hora.

El siguiente paso consiste en mezclar homogéneamente la disolución de lecitina, lo que se realiza con el ultraturrax durante cinco minutos.

Para preparar 20 mL de una disolución de 1 M de citral en un tubo falcon, se añaden 2,5 gramos de la disolución de lecitina de soja, 3,61 ml de citral y se enrasa a 20 mL con agua destilada. Esta mezcla es llevada una vez más al ultraturrax, esta vez durante 15 minutos, donde queda formada definitivamente la nanoemulsión, que es almacenada a 4°C hasta su uso.

La nanoemulsión se mantuvo estable, sin observarse separación de fases, durante todo el tiempo que duró la investigación.

3.4 Preparación de los cultivos

Los cultivos con los que se ha trabajado en el laboratorio estaban en crioconservación a -80°C. Se recogieron las dos muestras conservadas en tubos Eppendorf y se sembraron con asas de siembra en estría por agotamiento, en placas con TSA. Después, se dejaron crecer en una estufa a 37°C durante 24h para obtener colonias aisladas sin evidencia de crecimientos anómalos o de otros microorganismos. Para asegurar que los cultivos no se estropeaban, se volvían a sembrar cada semana en placas distintas por el mismo método descrito anteriormente.

Del cultivo se cogía una colonia aislada que era inoculada en tubos de 5mL de TSB, los cuales se incubaban en la estufa durante 24h a 37°C con el fin de que alcanzara el crecimiento estacionario y una concentración aproximada de 10^9 UFC/mL para la realización del experimento al día siguiente.

3.5 Tratamiento térmico

Los experimentos se realizaron mediante un termorresistómetro Mastia (Conesa *et al.*, 2009); (figura 3.1) el cual es un equipo que ha sido diseñado y patentado por la propia Universidad Politécnica de Cartagena (Patente española 2003025259). El equipo consiste en un pequeño vaso de aproximadamente medio litro de capacidad al cual se le añade el medio de calentamiento junto al microorganismo que se inocula. Antes de inocular el microorganismo, se programa el tratamiento térmico deseado con diferentes curvas si así se quisiera. Después, se pueden sacar muestras manualmente o programarlas para el estudio de resistencia del microorganismo (UPCT, 2020).



Figura 3.1: Termorresistómetro Mastia. (Conesa *et al.*, 2009).

El termorresistómetro varía su temperatura gracias a una resistencia que existe en el interior para calentarse y a un serpentín de refrigeración para disminuir su temperatura. Además, cuenta con una hélice para homogeneizar el medio, una sonda de nivel para evitar que el vaso se vacíe completamente, un tubo de muestras para su extracción y una sonda para registrar la temperatura. Al estar presurizado el equipo, se pueden tomar muestras por debajo de los 100°C, con una temperatura máxima de hasta 150°C.

En primer lugar, antes de comenzar un experimento, se debía limpiar correctamente el depósito, tanto por el exterior como por el interior. Después, se retiraba desenroscando y se añadía agua destilada que se esterilizaba a 130°C durante dos minutos. Para ello, se encendía el termorresistómetro. A continuación, se seleccionaba la temperatura deseada, se encendía el motor, se activaban los sistemas de calentamiento y enfriamiento, y se pulsaba el botón “run”, para iniciar el programa. Una vez completada la esterilización, se pulsaba el botón de extracción de muestras para esterilizar el tubo de extracción y se bajaba a 30°C, seleccionando el programa.

Con el equipo adecuadamente esterilizado y la temperatura ya a 30°C, se apaga el termorresistómetro, se desenrosca el depósito y se repite el mismo proceso salvo que se añade esta vez el medio a investigar, en este caso agua de peptona tamponada o caldo de carne. Cuando se utiliza agua de peptona tamponada, se vuelve a esterilizar el medio y, al bajar la temperatura, ya estaría preparado el equipo para la realización del experimento. En el caso de caldo de carne no hace falta esterilizar el medio.

Si se añadía citral, era necesario añadirlo antes del microorganismo mediante una jeringuilla de insulina. En todos los experimentos con citral, se utilizó una concentración de 0,5 mM, por lo que se añadían 0,2 mL de la nanoemulsión 1M que habíamos preparado previamente (apartado 3.3).

Para realizar el experimento, es necesario una jeringuilla Hamilton (figura 3.2) para inocular el microorganismo, a una cantidad de 200 μL . Una vez se inocula el microorganismo, se empiezan a sacar muestras en tubos de ensayo estériles del tiempo cero hasta el tiempo final, con unos tiempos de muestreo que ya se habían planteado previamente teniendo en cuenta ciertas variables como la temperatura a la que era sometido el microorganismo, el tiempo durante el que iba a estar, el microorganismo o la presencia o no de citral.



Figura 3.2: Jeringuilla Hamilton.

Finalmente, se preparaban las diluciones que se requerían de cada muestra en agua de peptona para facilitar el recuento, se sembraban en TSA mediante la técnica de homogeneización en masa y se incubaban en posición invertida en una estufa a 37°C durante unas 24 horas, tras lo cual se procedía al recuento de supervivientes.

3.6 Recuento de microorganismos

Tras la incubación, se debe realizar el recuento de colonias existente en las placas para poder comprobar del número de supervivientes. Para ello se contó con un contador de colonias (figura 3.3).

El recuento se hacía en la dilución más adecuada en función del número de colonias que aparecieran en las placas.



Figura 3.3: Contador de colonias automático.

3.7 Análisis de datos

Una vez se dispone de los resultados del recuento de colonias de los experimentos realizados el día anterior, se pueden representar los datos en una hoja Excel. Para ello se representan el logaritmo del número de supervivientes ($\log n$) frente a los distintos tiempos. De esta manera se obtienen las gráficas de supervivencia del microorganismo a distintas temperaturas. Teniendo estas gráficas también se puede obtener el D_T , teniendo la ecuación de la recta de la gráfica, sus intervalos de confianza para el 95% y los coeficientes de correlación r , mediante la herramienta análisis de datos en la hoja Excel.

Para la obtención de las gráficas de termodestrucción se representó en una hoja Excel los valores D_T en función de las distintas temperaturas utilizadas. A partir de estas gráficas de termodestrucción se calcularon los correspondientes valores z , sus intervalos de confianza para el 95% y los coeficientes de correlación de las rectas de regresión.

Las ecuaciones de las rectas de regresión permiten también calcular los valores D_T con mayor precisión en cada una de las condiciones (con y sin citral), pues tienen en cuenta todos los valores D_T utilizados en la gráfica de termodestrucción. Así pues, estas ecuaciones se utilizaron para realizar los cálculos relativos a la optimización de los tratamientos térmicos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron experimentos con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Senftenberg a diferentes temperaturas en agua de peptona tamponada para caracterizar la resistencia de ambos microorganismos. Las temperaturas escogidas fueron:

- 52,5°C, 55,0°C, 57,5°C y 60,0°C para *Listeria*.
- 55,0°C, 57,5°C, 60,0°C y 62,5°C para *Salmonella*.

Para cada temperatura se realizaron al menos dos repeticiones, tanto para los experimentos de control como para los experimentos con la nanoemulsión de citral. Adicionalmente, se quiso estudiar el efecto que tenía la nanoemulsión cuando se utilizaba en un caldo de carne, para lo cual se realizaron experimentos, a 55,0°C en *Listeria* y a 57,5°C en *Salmonella*.

Al comprobar que en caldo de carne el efecto de la nanoemulsión de citral era mucho menos pronunciado que en agua de peptona, se pensó homogeneizar el caldo de carne en el ultraturrax, de manera semejante a como se hacía para la preparación de la nanoemulsión, para evaluar si esta acción tenía algún efecto interesante sobre la resistencia microbiana al calor de *L. monocytogenes*. Una vez homogeneizado el caldo, se realizó un experimento de muestra control y otro aplicando citral.

4.1. Efecto de la adición de citral al agua de peptona tamponada en la resistencia al calor de *L. monocytogenes* y *S. Senftenberg*

La figura 4.1, muestra las gráficas de supervivencia de *L.monocytogenes* (fig 4.1A) y *S. Senftenberg* (fig 4.1 B), en agua de peptona tamponada a 57,5°C, en presencia o no de una nanoemulsión de citral de concentración 0,5 mM. En ella se puede observar cómo se modifica la resistencia al calor cuando se añade citral en cada uno de los microorganismos.

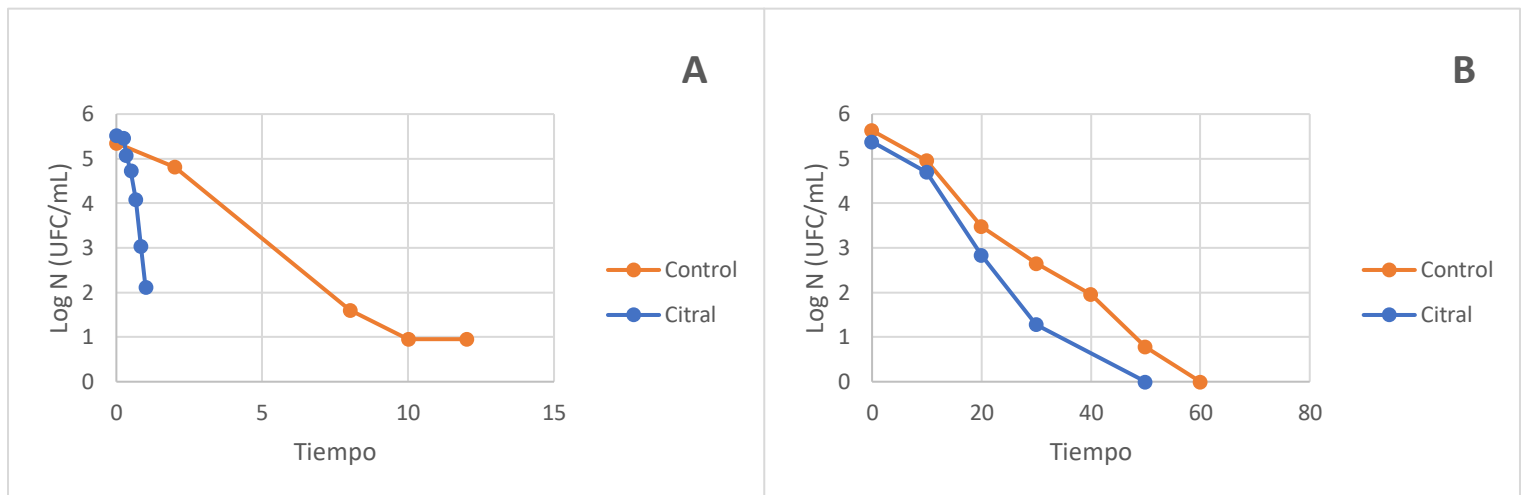


Figura 4.1: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* (A) y *Salmonella Senftenberg* (B) en agua de peptona tamponada con (●) y sin (○) citral 0,5 mM a 57,5°C.

Aunque en ambos casos se puede percibir un aumento del efecto del tratamiento térmico cuando se añade la nanoemulsión de citral, es en *L. monocytogenes* dónde más impacto causa el aceite esencial. Se puede observar que, mientras en la muestra de control se requiere de unos 10 minutos para reducir 4 ciclos logarítmicos, en la muestra con nanoemulsión apenas harían falta dos minutos. En cambio, en *S. Senftenberg*, para reducir 4 ciclos logarítmicos en la muestra de control se necesitan unos 40 minutos, mientras que en la muestra en presencia de citral serían necesarios unos 30 minutos. Por lo tanto, al añadir citral, el tratamiento se reduce a una quinta parte en *L. monocytogenes*, mientras que en *S. Senftenberg* sería tan solo un 25%. Es bien conocido que los microorganismos Gram negativos como *Salmonella* son, en general, más resistentes a los agentes químicos, como los aceites esenciales, que los Gram positivos, como *Listeria monocytogenes* (Somrani, 2020) Esta mayor resistencia se ha atribuido tradicionalmente a la presencia en la pared celular de las bacterias Gram negativas de la membrana externa de naturaleza lipoproteica recubriendo al peptidoglicano. (Willey, 2020).

En las siguientes tablas se muestran los resultados en todos los experimentos, su valor D_T , y los intervalos de confianza para el 95% superior e inferior, así como el coeficiente de correlación r . En el anexo, se incluyen todas las gráficas de supervivencia a partir de las cuales se han calculado estos valores. La tabla 4.1, corresponde a los experimentos realizados con *L. monocytogenes* en agua de peptona tamponada a los que no se les añadió citral. La tabla 4.2 muestra los resultados de los experimentos de *L. monocytogenes* en agua de peptona tamponada en presencia de la nanoemulsión de citral 0,5 mM. La tabla 4.3, muestra los resultados de los experimentos para *S. Senftenberg* cuando no se le hubo añadido la nanoemulsión. La tabla 4.4, corresponde a los experimentos de *S. Senftenberg* en presencia de citral 0,5 mM.

Tabla 4.1: Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Valor D_T (min)	I.C. 95% (-) (min)	I.C. 95% (+) (min)	r
52,5	19,3	13,7	32,7	0,991
52,5	24,3	18,3	36,0	0,994
55,0	17,0	14,5	20,4	0,989
55,0	13,5	8,55	31,5	0,983
57,5	2,43	1,80	3,75	0,982
57,5	1,88	1,32	3,26	0,974
57,5	1,88	1,34	3,13	0,983
60,0	0,771	0,397	12,8	0,956
60,0	0,233	0,113	1,27	0,933
60,0	0,143	0,099	0,256	0,972

Tabla 4.2: Valores D_T , Intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada a diferentes temperaturas, en presencia de una nanoemulsión de citral, 0,5 mM.

Temperatura (°C)	Valor D_T	I.C. 95% (-) (min)	I.C. 95% (+) (min)	r
52,5	3,76	2,95	5,16	0,992
52,5	3,64	2,44	7,12	0,996
55,0	0,802	0,554	1,45	0,972
55,0	0,654	0,449	1,21	0,970
57,5	0,191	0,111	0,748	0,927
57,5	0,155	0,102	0,324	0,962
57,5	0,282	0,207	0,444	0,953
60,0	0,0499	0,0459	0,0546	0,999
60,0	0,0273	0,00492	-0,00769	0,942
60,0	0,0279	0,0133	-0,276	0,996

Estos resultados indican un buen efecto en la destrucción de *L. monocytogenes* cuando se aplican tratamientos combinados de calor y adición de la nanoemulsión de citral a cualquiera de las temperaturas de tratamiento investigadas. Los efectos observados a 57,5°C se mantienen aproximadamente constantes a todas las temperaturas de tratamiento investigadas, observándose diferencias estadísticamente significativas a todas ellas (los intervalos de confianza para el 95% a cada una de las temperaturas, con y sin citral, no se solapan). Cabe destacar los valores negativos de los intervalos de confianza a 60,0°C en presencia de citral, debidos a su gran amplitud, por tratarse de gráficas de supervivencia en las que se observaba una inactivación muy rápida (ver Anexo) y que se trazaron con muy pocos valores. Aunque estas gráficas no cumplirían los requisitos mínimos para ser consideradas como válidas, decidimos mantenerlas para reforzar los resultados obtenidos, ya que resultó imposible conseguir replicas mejores.

Tabla 4.3: Valores D_T , Intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada tratamientos a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Valor D_T	I.C. 95% (-) (min)	I.C. 95% (+) (min)	r
55,0	17,1	14,5	20,7	0,988
55,0	31,8	26,0	40,8	0,982
55,0	20,3	18,3	22,8	0,997
57,5	13,2	12,2	14,5	0,998
57,5	10,5	9,53	11,6	0,996
57,5	10,1	8,38	12,7	0,984
60,0	2,30	1,67	3,60	0,953
60,0	2,40	1,63	4,57	0,968
60,0	4,04	3,58	4,65	0,994
62,5	1,31	1,13	1,56	0,990
62,5	1,02	0,640	2,52	0,981

Tabla 4.4: Valores D_T , Intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada a diferentes temperaturas en presencia de una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

Temperatura (°C)	Valor D_T	I.C. 95% (-) (min)	I.C. 95% (+) (min)	r
55,0	10,6	8,46	14,1	0,997
55,0	9,61	7,86	12,4	0,993
55,0	12,3	9,64	17,0	0,981
57,5	9,61	6,88	16,0	0,978
57,5	8,70	6,30	14,1	0,979
57,5	7,10	4,56	16,02	0,957
60,0	1,53	1,07	2,72	0,990
60,0	2,23	1,74	3,12	0,996
60,0	2,60	2,04	3,60	0,973
62,5	0,940	0,514	5,51	0,965
62,5	1,10	0,883	1,46	0,991
62,5	0,974	0,802	1,24	0,998

Estos resultados muestran un efecto mucho más discreto en el caso de *S. Senftenberg*, Mientras que a bajas temperaturas la nanoemulsión de citral todavía fue capaz de reducir el valor D_T aproximadamente a la mitad, conforme la temperatura se incrementa el efecto del citral se ve disminuido, llegando prácticamente a desaparecer a 62,5°C.

La figura 4.2, muestra las gráficas de supervivencia realizadas para *L.monocytogenes* a 52,5°C (fig 4.2A) y a 57,5°C (fig 4.2 B), ambas en agua de peptona tamponada, en presencia o no de una nanoemulsión de citral de concentración 0,5 mM.

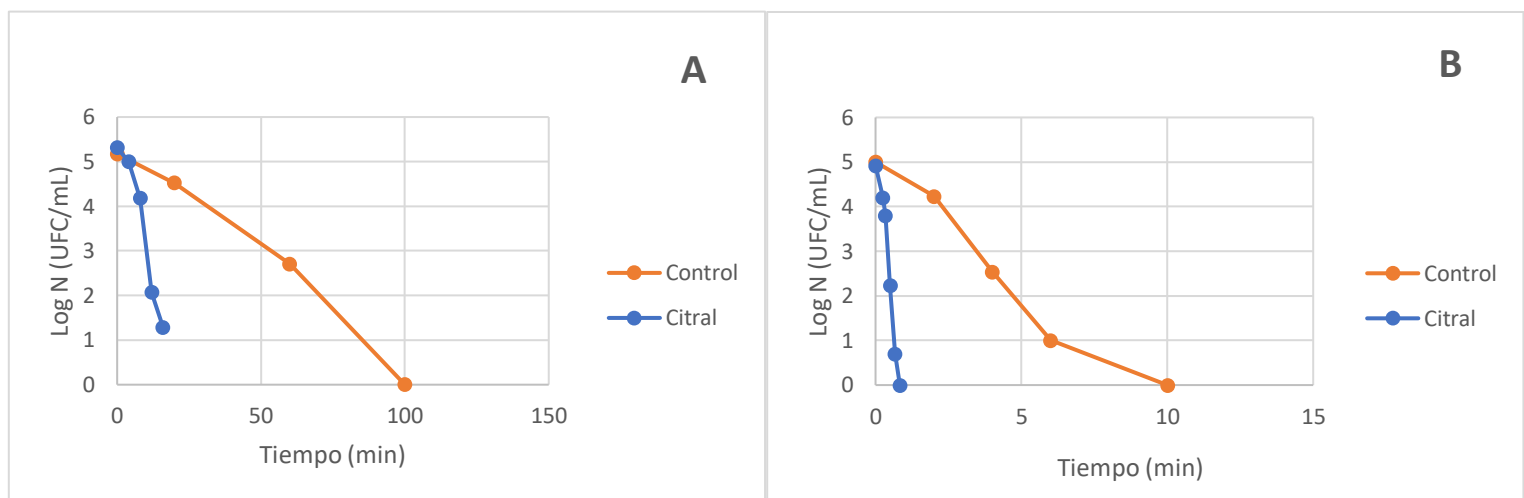


Figura 4.2: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* a 52,5°C (A) y a 57,5°C (B) en agua de peptona tamponada con (●) y sin (●) una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

Como se puede observar en estas dos gráficas, el efecto de la nanoemulsión de citral sigue siendo elevado conforme se incrementa la temperatura del tratamiento térmico.

La figura 4.3, muestra las gráficas de supervivencia realizadas para *Salmonella* a 55,0°C (fig 4.3A) y 60,0°C (fig 4.3B), en agua de peptona tamponada, con y sin una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

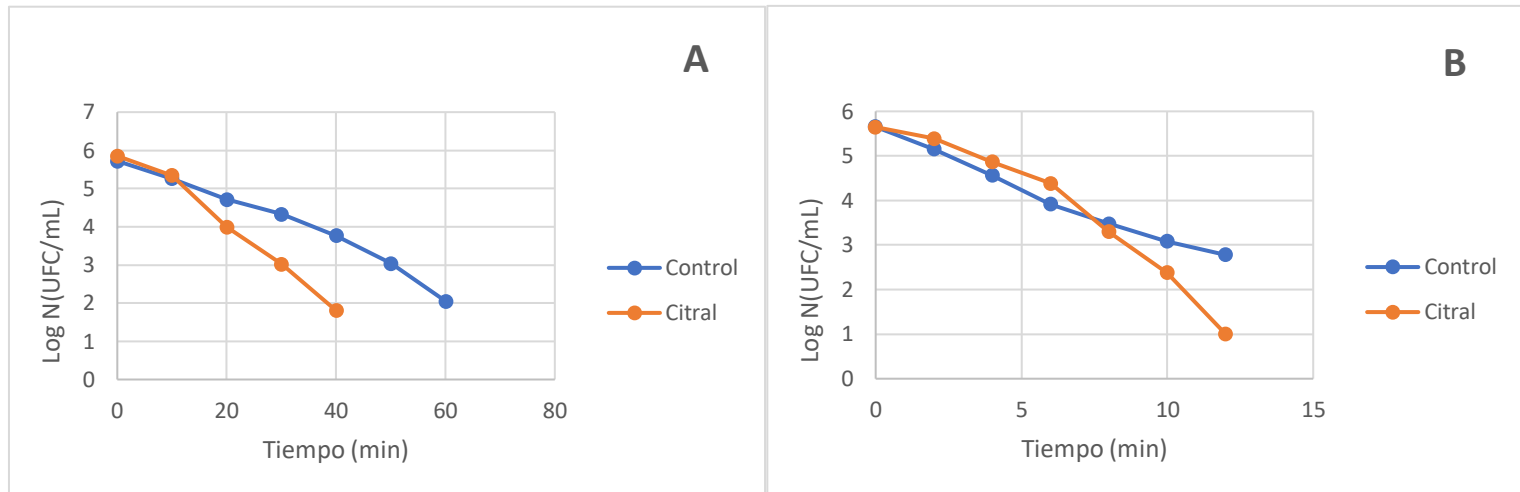


Figura 4.3: Gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg a 55,0°C (A) y a 60°C (B) en agua de peptona tamponada con (●) y sin (●) una nanoemulsión citra 0,5 mM.

Como se puede observar en estas dos gráficas, aunque el efecto de la nanoemulsión de citral se observa claramente para la temperatura de 55,0°C, al aumentar la temperatura de tratamiento hasta 60°C el efecto disminuye de forma considerable.

Las siguientes figuras (4.4 y 4.5), muestran las gráficas de termodestrucción de *L. monocytogenes* y *S. Senftenberg* tanto para los experimentos de control, como para los realizados cuando se les añadió la nanoemulsión de citral:

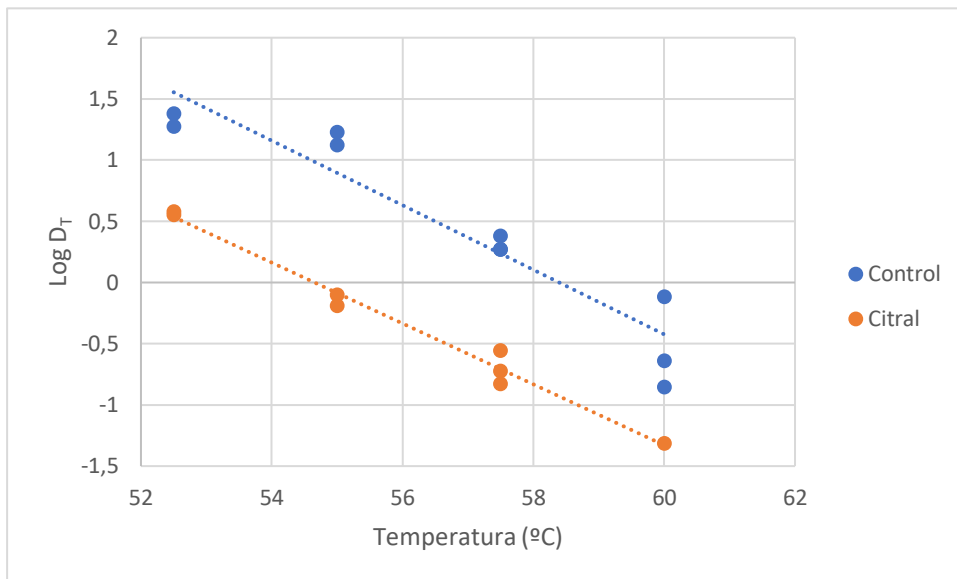


Figura 4.4. Gráficas de termodestrucción de *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada, con (●) y sin (●) una nanoemulsión citral de 0,5 mM.

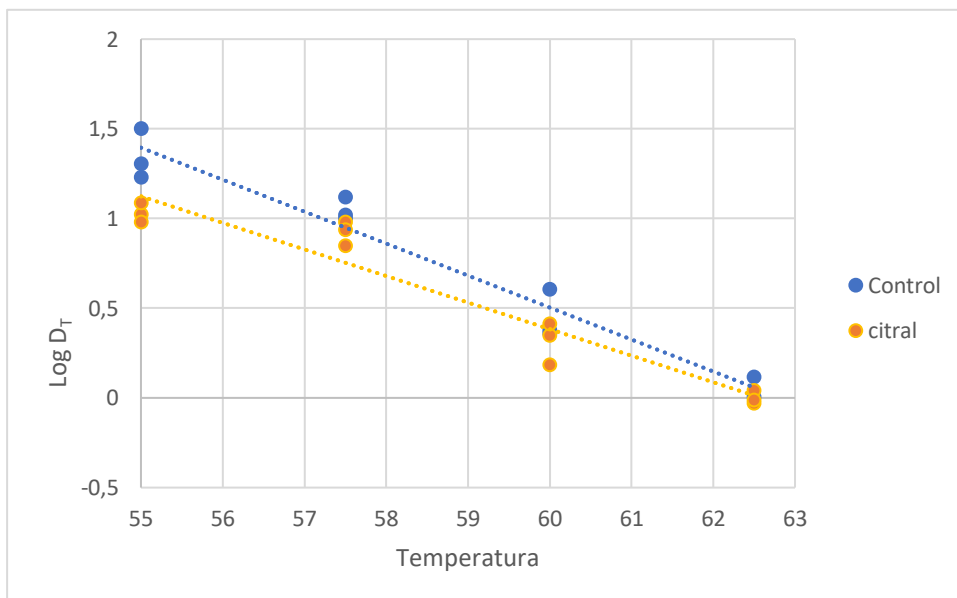


Figura 4.5: Gráficas de termodestrucción de *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada, con (●) y sin (●) una nanoemulsión citral 0,5 mM.

En *Listeria* (Figura 4.4), las gráficas de termodestrucción en presencia o no de citral se mantienen paralelas y bastante distantes, lo cual es un indicativo del efecto que tiene la nanoemulsión sobre la resistencia del microorganismo a cualquier temperatura de tratamiento. En cambio, en *Salmonella*, ambas gráficas se sitúan mucho más próximas, sobre todo a altas temperaturas, a las que llegan prácticamente a coincidir, indicativo de que el efecto de la nanoemulsión es menor.

La tabla 4.5 muestra los valores z , sus intervalos de confianza para el 95%, y los coeficientes de correlación de *L. monocytogenes* en agua de peptona tamponada, con y sin citral. En esta tabla se puede observar que los valores z son muy similares, no existiendo diferencias significativas entre ellos, lo cual refuerza el hecho ya comentado de que el efecto del citral se mantiene constante a todas las temperaturas de tratamiento investigadas.

La tabla también incluye las ecuaciones de las rectas de regresión correspondientes a las gráficas de termodestrucción. Estas ecuaciones son muy útiles, pues permiten estimar el valor D_T a cualquier temperatura. Además, lo hacen teniendo en cuenta todos los valores D_T obtenidos en esta investigación en cada medio, por lo que se pueden considerar estimaciones mucho más precisas de la termorresistencia que las obtenidas en los experimentos individuales.

Estas ecuaciones permitirían estimar, por ejemplo, que el valor $D_{52,5^\circ\text{C}}$ de *L. monocytogenes* en agua de peptona tamponada sin citral es de 35,5 min; mientras que al añadir la nanoemulsión de citral 0,5 mM el valor $D_{52,5^\circ\text{C}}$ se redujo a 3,68 min, es decir, casi 10 veces. A $60,0^\circ\text{C}$, el valor $D_{60,0^\circ\text{C}}$ pasó de 0,386 min a 0,051 min, un poco más de 7 veces, es decir, un efecto ligeramente inferior. Se podría concluir entonces que la adición de la nanoemulsión de citral al medio de calentamiento provocaría una reducción de la resistencia al calor de este microorganismo de entre 7 y 10 veces.

Tabla 4.5: Valores z , intervalos de confianza para el 95%, coeficiente de correlación (r) y ecuación de la recta de regresión de la gráfica de termodestrucción, para *Listeria monocytogenes* en agua de peptona tamponada, con 0,5 mM y sin citral.

Medio de calentamiento	Valor z ($^\circ\text{C}$)	I.C. 95% (-) ($^\circ\text{C}$)	I.C. 95% (+) ($^\circ\text{C}$)	r	Ecuación de termodestrucción
Agua de peptona tamponada sin citral	3,82	2,96	5,37	0,943	$\log D_T = -0,262T + 15,3$
Agua de peptona tamponada con 0,5mM citral	3,73	3,34	4,20	0,990	$\log D_T = -0,249T + 13,6$

La tabla 4.6 muestra los valores z , sus intervalos de confianza para el 95%, los coeficientes de correlación r y las ecuaciones de las rectas de regresión correspondientes a las gráficas de termodestrucción de *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada, con y sin citral. En esta tabla se puede observar que el valor z en presencia de citral es ligeramente más grande que sin citral. Sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre estos valores, por lo que, a pesar de la convergencia de ambas gráficas a temperaturas elevadas (fig. 4.5), estadísticamente no puede demostrarse un menor efecto del citral a temperaturas más altas para este microorganismo.

Cuando se utilizan las ecuaciones de las rectas de regresión de las gráficas de termodestrucción de *S. Senftenberg* en agua de peptona tamponada, se puede estimar, por ejemplo, que el valor $D_{55,0^{\circ}\text{C}}$ sin citral es de 25,0 min; mientras que al añadir la nanoemulsión de citral 0,5 mM el valor $D_{55,0^{\circ}\text{C}}$ se redujo a 13,6 min, es decir, a menos de la mitad. A $62,5^{\circ}\text{C}$, el valor $D_{62,5^{\circ}\text{C}}$ tan solo se redujo de 1,22 min a 1,11 min. En resumen, la adición de la nanoemulsión de citral al medio de calentamiento reduciría la resistencia al calor de este microorganismo a la mitad, en el mejor de los casos.

Tabla 4.6: Valores z , intervalos de confianza para el 95%, coeficientes de correlación (r) y ecuaciones de las rectas de regresión de las gráficas de termodestrucción para *Salmonella* Senftenberg en agua de peptona tamponada en presencia o no de 0,5 mM citral.

Medio de calentamiento	Valor z ($^{\circ}\text{C}$)	I.C. 95% (-) ($^{\circ}\text{C}$)	I.C. 95% (+) ($^{\circ}\text{C}$)	r	Ecuación de termodestrucción
Agua de peptona tamponada sin citral	5,72	4,85	6,97	0,977	$\log D_T = -0,175T + 11,02$
Agua de peptona tamponada con 0,5mM citral	6,75	5,61	8,48	0,961	$\log D_T = -0,145T + 9,11$

En los experimentos que se realizaron con anterioridad en este laboratorio, se encontraron también buenos resultados al añadir nanoemulsiones y combinarlas con tratamiento térmico. De la misma forma que en este estudio, al emplear nanoemulsión de timol en *S. Senftenberg*, se comprobó que, a temperaturas más bajas, la nanoemulsión causaba más efecto. Se dieron unos valores de $D_{57,5}$ de 11,6 a 3,73 minutos, frente a los 10,5 a 8,70 minutos de este experimento. (Velez, 2019).

Para *L. monocytogenes*, al aplicar 0,5mM de timol en agua de peptona el valor $D_{57,5}$ se redujo de 0,64 minutos en la muestra control a 0,40 minutos cuando se añadía la nanoemulsión. En cambio, en los experimentos realizados con citral, el valor $D_{57,5}$ se redujo de 1,88 a 0,155 minutos, proporcionando un mayor efecto. (Sarango, 2020).

Utilizando en *L. monocytogenes* una nanoemulsión de 0.5 mM de p-limoneno, el valor D_{55} utilizando como medio agua de peptona se redujo de 9,54 minutos en muestras de control a 0,59 minutos cuando se le añadió la nanoemulsión. Utilizando citral, el valor D_{55} pasó de ser 17 minutos en las repeticiones de control a 0,802 minutos usando la nanoemulsión. (Espín, 2019).

También se comprobó el efecto del limoneno en *L. monocytogenes* en caldo TSB, el cual obtuvo un valor de $D_{52,5}$ de 29,2 minutos en la muestra de control, y un valor de 0,420 al añadir el limoneno en forma de nanoemulsión. (Maté, 2016)

Cuando se aplicó una nanoemulsión de *p-limoneno* 1 mM en *S. Senftenberg* a 50C, se comprobó que el valor D_T se reducía hasta 50 veces, reduciéndose el valor D desde 32,13 minutos en muestras de control hasta 0,65 minutos, mostrando los mejores resultados en tratamiento combinado de calor y antimicrobianos hasta le fecha. (Ros-Chumillas *et al.*, 2017).

4.2 Efecto de la adición de citral al caldo de carne en la resistencia al calor de *L. monocytogenes* y *S. Senftenberg*.

Las figuras 4.6 y 4.7, muestran las gráficas de supervivencia de *L. monocytogenes* y *S. Senftenberg* en agua de peptona tamponada y en caldo de carne en presencia o no de citral. Las gráficas en agua de peptona tamponada se han incluido para facilitar la comparación entre los resultados obtenidos en ambos medios

Figura 4.7: Gráficas de supervivencia de *Salmonella Senftenberg* a 57,5°C en agua de peptona tamponada (A) y en caldo de carne (B) con (●) y sin (●) una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

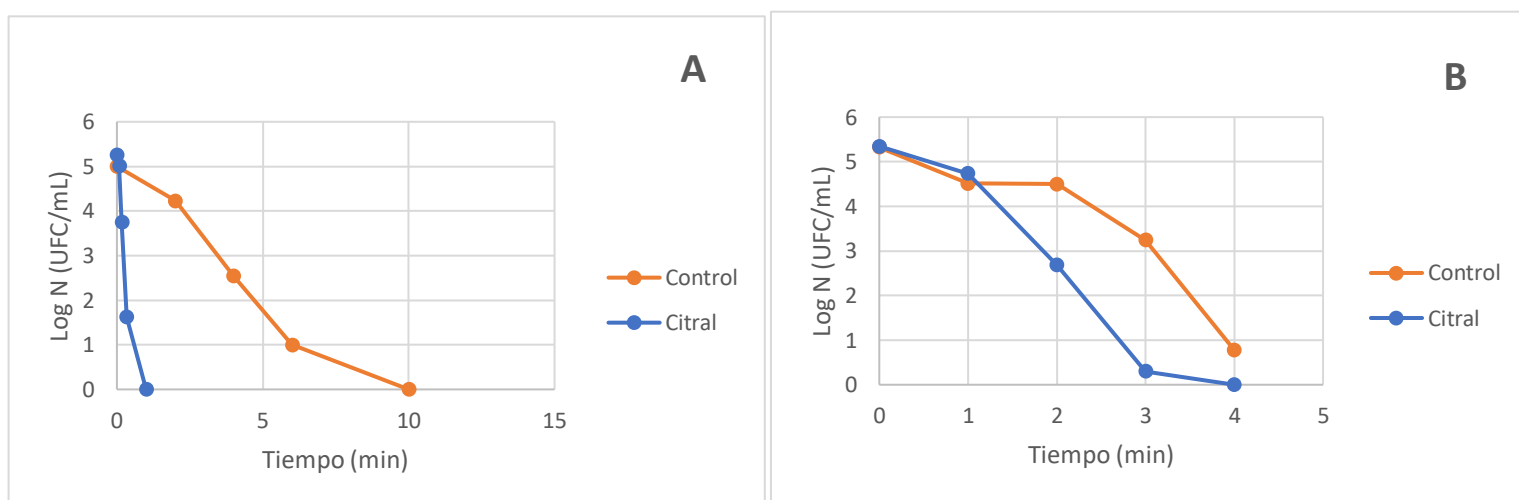


Figura 4.6: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* a 57,5°C en agua de peptona tamponada (A) y en caldo de carne (B) con (●) y sin (●) una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

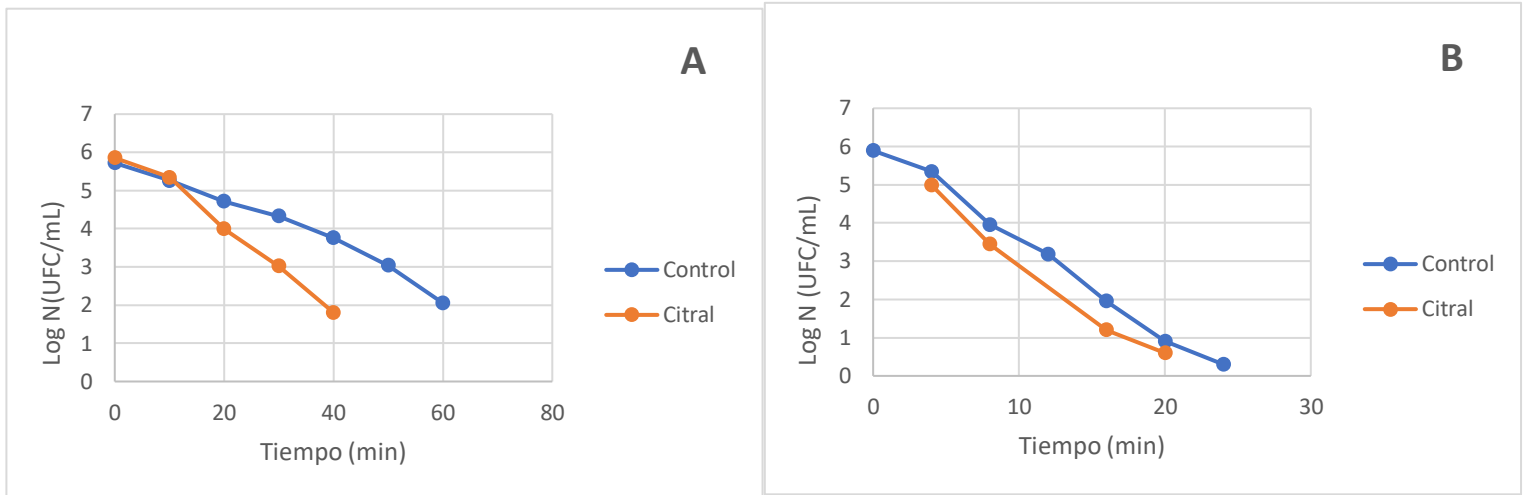


Figura 4.7: Gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg a 60,0°C en agua de peptona tamponada (A) y en caldo de carne (B) con (●) y sin (●) una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

En ambos microorganismos se observó un menor efecto de la adición de la nanoemulsión de citral cuando se empleó caldo de carne como medio de calentamiento. En el caso de *L. monocytogenes* se pasó de un efecto de en torno a 10 veces en agua de peptona tamponada a menos de la mitad en caldo de carne (figura 4.6). En el caso de *S. Senftenberg*, el efecto prácticamente desapareció (figura 4.7).

La tabla 4.7 y 4.8 muestra los resultados de los experimentos de *L. monocytogenes* a 57,5°C y *S. Senftenberg* a 60,0°C respectivamente, utilizando como medio el caldo de carne, tanto para las muestras de control como para las que se utilizó la nanoemulsión de citral. La tabla 4,7 también incluye los resultados obtenidos con *L. monocytogenes* tras haber homogeneizado el caldo de carne empleado como medio de calentamiento.

Tabla 4.7: Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo de carne a 57,5°C en distintas condiciones.

Medio de calentamiento	Valor DT	I.C 95% (-)	I.C 95% (+)	r
Caldo sin citral	0,966	0,542	4,41	0,92
Caldo con 0,5 mM de citral	0,581	0,337	2,124	0,973
Caldo homogeneizado sin citral	0,724	0,508	1,259	0,938
Caldo homogeneizado con 0,5 mM de Citral	0,413	0,294	0,69	0,976

Como se puede observar en la tabla 4,7, la resistencia del microorganismo apenas se reduce al utilizar la nanoemulsión de citral, disminuyendo el valor $D_{57,5^\circ\text{C}}$ de 0,996 a 0,581 min. Es más, dada la amplitud de los intervalos de confianza, esta disminución ni siquiera puede considerarse estadísticamente significativa.

Tabla 4.8: Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación obtenidos a partir de las gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg en caldo de carne a 60,0°C en presencia o no de una nanoemulsión de citral 0,5 mM.

Medio de calentamiento	Valor D_T	I.C. 95% (-) (min)	I.C. 95% (+) (min)	r
Caldo sin citral	3,903	3,462	4,472	0,996
Caldo con citral	3,63	2,56	6,21	0,991

Se puede observar cómo, al utilizar la nanoemulsión en caldo de carne en *Salmonella*, el efecto apenas es relevante frente a las muestras de control, reduciéndose el valor $D_{60,0^\circ\text{C}}$ en menos de un 10% y resultando esta reducción estadísticamente no significativa.

El escaso efecto encontrado en alimentos coincide con lo observado por otros autores con estos mismos microorganismos en alimentos (Sarango, 2020);(Vélez, 2019). Únicamente (Maté *et al.*, 2017) encontraron un efecto importante, de 90 veces, en la resistencia al calor de *L. monocytogenes* al añadir una nanoemulsión de D-limoneno 0,5 mM en zumo de manzana. Estos autores justificaron el gran efecto encontrado en que el zumo de manzana no tiene grasa en su composición. De hecho, en esta misma publicación se encontraba una ausencia total de efecto en la resistencia de este mismo microorganismo al añadir la misma concentración de D-limoneno nanoemulsionado a zumo de zanahoria. Al recrear un zumo de zanahoria artificial al que se iban eliminando los distintos componentes, se comprobó que la grasa y la fibra presentes en el zumo de zanahoria eran responsables de gran parte de la pérdida del efecto del D-limoneno.

Al observar que en caldo de carne el efecto de la nanoemulsión de citral disminuía considerablemente, se pensó que las partículas de grasa del caldo podrían estar interviniendo a la hora de que la nanoemulsión actuara en los microorganismos. El caldo de carne utilizado en esta investigación no tiene fibra alimentaria y tiene tan solo un 0,1% de grasa. Es muy poca cantidad, pero esa grasa podría ser la responsable de la pérdida del efecto ya que las gotitas de nuestra nanoemulsión de citral podrían fusionarse con las de la grasa presente en el caldo, desapareciendo casi totalmente su efecto antimicrobiano. Por ello, y de manera análoga a como se preparó el citral, se decidió pasar por el ultraturrax el caldo de carne durante 15 minutos con el fin de comprobar si esto podía causar un efecto en la resistencia de los microorganismos (fig 4.8). Estos experimentos se realizaron únicamente con *L. monocytogenes*, ya que fue el microorganismo en que se observó un mayor efecto de la nanoemulsión en el agua de peptona tamponada.

Se comprobó también al microscopio el caldo de carne antes y después de ser homogeneizado con el fin de tratar de detectar alguna diferencia que pudiese resultar interesante remarcar. Las imágenes antes y después de homogeneizar el caldo se muestran en la figura 4.9. Aunque no se realizaron mediciones objetivas del tamaño de gota, las imágenes sí que muestran, subjetivamente, un menor tamaño en las gotas de grasa del caldo tras haber sido homogeneizado.

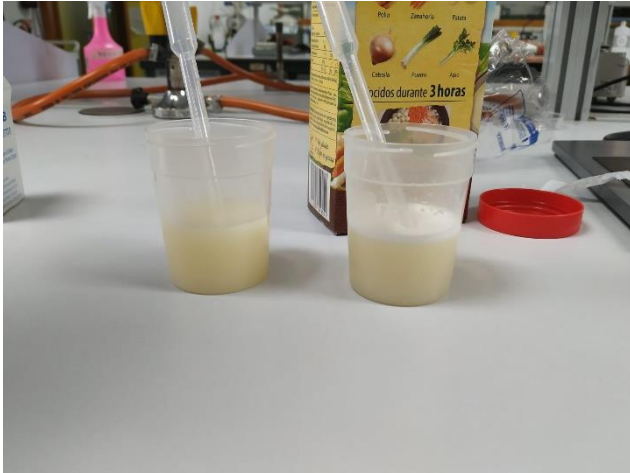


Figura 4.8: Imagen del caldo antes (izquierda) y después (derecha) de ser homogeneizado.

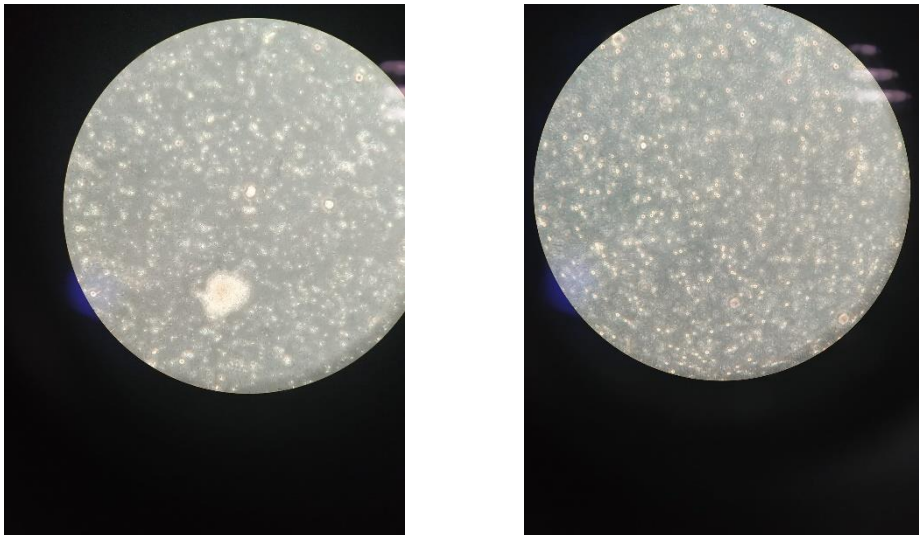


Figura 4.9: Imágenes comparativas a microscopio entre el caldo antes (izquierda), y después (derecha), de ser homogeneizado.

La figura 4.10, muestra las gráficas de supervivencia de *L. monocytogenes* en caldo de carne antes de ser homogeneizado, con y sin citral y después de ello. Las gráficas en caldo de carne antes de homogeneizar se han incluido para facilitar la comparación entre los resultados obtenidos en ambos medios.

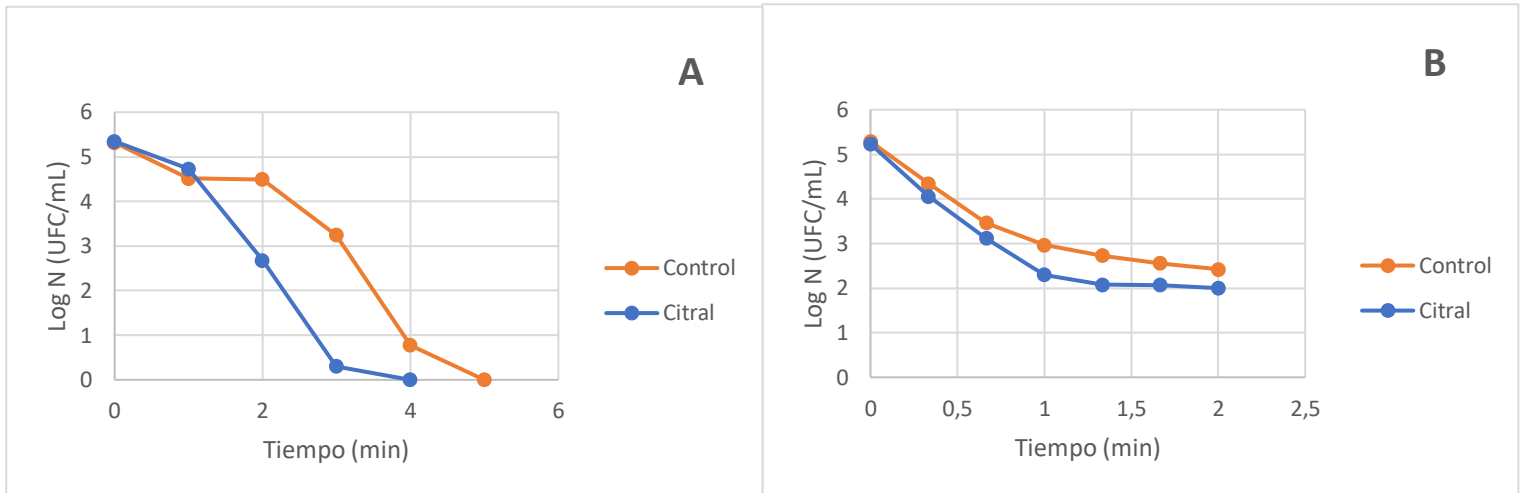


Figura 4.8: Gráficas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo de carne a 57,5°C sin homogeneizar (A) y homogeneizado (B) con (●) y sin (○) citral.

La tabla 4.7 muestra los resultados referentes a la resistencia de *L. monocytogenes* en caldo de carne homogeneizado en presencia o no de la nanoemulsión de citral.

Como se puede observar, el valor de D_T sin citral es de 0,724 minutos, mientras que, al añadir citral, el valor D_T disminuye a 0,413 minutos, resultando, al igual que ocurría en caldo sin homogeneizar en una disminución estadísticamente no significativa.

Por lo tanto, se comprueba que la homogeneización del caldo de carne no lleva a ninguna diferencia remarcable.

4.3. Optimización del tratamiento térmico mediante la adición de nanoemulsión de citral.

Para abordar la optimización del tratamiento térmico se parte de la base del consenso generalizado de que es necesario inactivar seis ciclos logarítmicos del microorganismo patógeno de interés, ya que este nivel de inactivación (6 ciclos log) es el objetivo de seguridad alimentaria que se suele aplicar a la mayoría de alimentos pasteurizados para garantizar su seguridad alimentaria (Buchanan, 1997).

La optimización del tratamiento térmico mediante la adición de un compuesto que reduce la resistencia al microbiana al calor, como es el caso de nuestra nanoemulsión de citral, podría lograrse bien reduciendo el tiempo de tratamiento, bien reduciendo la temperatura de tratamiento o bien modificando ambos parámetros simultáneamente. Esta optimización se realiza a partir de los datos que se obtienen de las ecuaciones de regresión de las líneas de termodestrucción. Como ya ha sido expuesto en el apartado 4.1, estas ecuaciones permiten calcular el valor D_T de un microorganismo a cualquier temperatura de tratamiento, teniendo en cuenta todos los experimentos realizados para estimar su resistencia al calor en ese medio. Una vez conocido el valor D_T a una temperatura determinada, se puede estimar el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos logarítmicos, simplemente multiplicando el valor D_T obtenido (tiempo para inactivar un ciclo logarítmico) por 6.

Así, comenzando por el tratamiento térmico de *L. monocytogenes* en agua de peptona tamponada, que ha resultado la combinación microorganismo-medio de calentamiento en la que se ha visto un mayor efecto, la ecuación de termodestrucción (tabla 4.5) había permitido estimar un $D_{52,5^{\circ}\text{C}} = 35,5$ min en agua de peptona tamponada, de modo que el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos log sería:

$$D_{52,5^{\circ}\text{C}} \times 6 = 35,5 \times 6 = 213 \text{ minutos}$$

Por su lado, la ecuación de termodestrucción en agua de peptona tamponada en presencia de la nanoemulsión de citral 0,5 mM (tabla 4.5) había permitido estimar un $D_{52,5^{\circ}\text{C}} = 3,68$ min, de modo que el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos log en este caso sería:

$$D_{52,5^{\circ}\text{C}} \times 6 = 3,68 \times 6 = 22,08 \text{ minutos}$$

Así pues, el tratamiento se podría reducir de 213 a 22,08 minutos, es decir, se podría reducir en 190,92 min, prácticamente un 90% a una temperatura de 52,5°C, simplemente añadiendo una concentración 0,5 mM de citral en forma de nanoemulsión, manteniendo los mismos niveles de seguridad alimentaria para este microorganismo.

Aunque no se ha encontrado un efecto significativo de la temperatura de tratamiento en el efecto de la adición de citral en la resistencia de *L. monocytogenes* al calor, hemos comprobado en el apartado 4.1 que, tomando los valores absolutos que proporcionan las ecuaciones de las rectas de termodestrucción, la reducción a temperaturas más elevadas era un poco menos marcada. Se puede calcular igualmente como se reduciría el tratamiento térmico a la temperatura de 60°C:

$$D_{60,0^{\circ}\text{C}} \times 6 = 0,386 \times 6 = 2,32 \text{ minutos} = 139 \text{ segundos}$$

Por su lado, la ecuación de termodestrucción había permitido estimar un $D_{52,5^{\circ}\text{C}} = 0,051 \text{ min}$ en agua de peptona tamponada en presencia de la nanoemulsión de citral 0,5 mM, de modo que el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos log en este caso sería:

$$D_{52,5^{\circ}\text{C}} \times 6 = 0,051 \times 6 = 0,31 \text{ minutos} = 19 \text{ segundos}$$

Así pues, a 60°C el tratamiento se podría reducir de 139 a 19 segundos, es decir, en 120 segundos, un 86%, manteniendo de nuevo los mismos niveles de seguridad alimentaria para este microorganismo.

De esta manera, se podría calcular cuando se podría optimizar el tratamiento térmico a cualquier temperatura. Por ejemplo, se podría calcular la reducción del tiempo de tratamiento a una temperatura de 72°C, que es habitualmente utilizada para los tratamientos de pasteurización HTST (high temperature short time). No obstante, las predicciones deberían realizarse siempre en el rango de temperaturas investigadas, evitando extrapolaciones a temperaturas superiores o inferiores, ya que fuera de ese rango, las predicciones son menos fiables.

En muchas ocasiones, a la industria alimentaria le resulta más conveniente modificar la temperatura que el tiempo de tratamiento. Por ejemplo, si el tratamiento térmico se aplica mediante un intercambiador de calor, con una sección de mantenimiento de una longitud determinada y en el que el alimento es impulsado a través de una bomba que proporciona flujo turbulento a un determinado caudal, al menos en una primera instancia, es mucho más sencillo modificar la temperatura de mantenimiento que el tiempo en esa sección. Entonces, otra manera de abordar la optimización es calculando cuando se podría reducir la temperatura de tratamiento, manteniendo un mismo tiempo de tratamiento. Por ejemplo, a partir de la ecuación de termodestrucción se puede calcular a que temperatura se consiguen 6 ciclos logarítmicos de inactivación en un tiempo determinado, en ambos medios, con y sin citral. Pongamos por ejemplo un tiempo de 6 minutos. Como 6 minutos sería el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos log, el tiempo para inactivar 1 ciclo sería de 1 minuto. Se trata entonces de buscar la temperatura a la que el valor $D_T = 1 \text{ min}$, es decir, $\log D_T = 0$. De nuevo sustituyendo en cada una de las ecuaciones de la tabla 4.5, tendríamos:

- Agua de peptona tamponada: Temperatura = $15,3 / 0,262 = 58,4^{\circ}\text{C}$
- Agua de peptona tamponada con citral: Temperatura = $13,6 / 0,249 = 54,6^{\circ}\text{C}$

De este modo, otra manera de optimizar el tratamiento sería añadiendo 0,5 mM de la nanoemulsión de citral y reduciendo la temperatura en 3,8°C, de 58,4°C a 54,6°C, manteniendo en este caso el mismo tiempo de tratamiento de 6 minutos y manteniendo así el mismo nivel de seguridad alimentaria.

Teniendo en cuenta el precio del citral de uso alimentario, se puede calcular también lo que se incrementaría el precio del tratamiento por litro de producto al añadir este antimicrobiano.

Para ello, podemos calcular la cantidad de citral que necesitamos por litro de alimento en base a la ecuación Ecuación 4.1:

$$M = \frac{\left(\frac{m}{pm}\right)}{V} \text{ (ec 4.1)}$$

Siendo M la molaridad, m la masa (en gramos), pm el peso molecular y V el volumen (en Litros).

Sabiendo que la solución de citral que hemos utilizado es de 0,5 mM=0,0005 M, que el peso molecular del citral es de 152,23 gr/mol y que el volumen lo calculamos para un litro de medio, en nuestro caso agua de peptona:

$$0,0005 = \frac{\left(\frac{m}{152,23}\right)}{1}; m = 152,23 \cdot 0,0005 = 0,076 \text{ gr de citral por Litro de agua de peptona tamponada.}$$

El citral de uso alimentario tiene una pureza del 96%, según consta en la página web de uno de los principales productores (www.sigmaaldrich.com), por lo que el peso real de citral que habría que añadir al medio de calentamiento para conseguir una solución 0,5 mM es de 0,0793 gramos. Teniendo en cuenta el precio del citral del mismo productor: 116 €/kg:

$$7,93 \times 10^{-5} \frac{\text{kg citral}}{\text{Lag peptona}} \cdot 116 \frac{\text{€}}{\text{kg}} = 9,19 \times 10^{-3} \frac{\text{€}}{\text{Lag peptong}}, \text{ o lo que es lo mismo, } 0,92 \text{ céntimos por tratamiento.}$$

En el caso de *S. Senftenberg* el descenso de termorresistencia en agua de peptona tamponada al añadir la nanoemulsión de citral fue mucho menos marcado que en *Listeria*. Con todo, también se puede optimizar el tratamiento para este microorganismo.

Atendiendo a la ecuación de termodestrucción de *S. Senftenberg* (tabla 4.6) se pudo estimar de manera semejante a como se hizo con *L. monocytogenes* un $D_{55,0^{\circ}\text{C}}=25,63$ min en agua de peptona tamponada, de modo que el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos log sería:

$$D_{55,0^{\circ}\text{C}} \times 6 = 25,63 \times 6 = 153,78 \text{ minutos}$$

Gracias a la ecuación de termodestrucción en agua de peptona tamponada en presencia de la nanoemulsión de citral 0,5 mM (tabla 4.6), se pudo estimar un $D_{55,0^{\circ}\text{C}}=16,56$ min en agua de peptona tamponada, de modo que el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos log sería:

$$D_{55,0^{\circ}\text{C}} \times 6 = 16,56 \times 6 = 99,36 \text{ minutos}$$

De esta forma, el tratamiento se podría reducir de 153,78 minutos a 99,36 minutos, lo que equivale a un 35% a una temperatura de 55,0°C, añadiendo simplemente una concentración 0,5 mM de citral en forma de nanoemulsión, y con la misma seguridad alimentaria para este microorganismo.

En el apartado 4.1 se pudo observar como la nanoemulsión de citral en *S. Senftenberg* posee un menor efecto en la resistencia al calor a temperaturas de tratamiento más elevadas. Por esta razón resulta de interés calcular la reducción del tratamiento térmico a una temperatura de 62,5°C sin nanoemulsión de citral:

$$D_{62,5^{\circ}\text{C}} \times 6 = 1,22 \times 6 = 7,32 \text{ minutos}$$

Por su lado, la ecuación de termodestrucción había permitido estimar un $D_{62,5^{\circ}\text{C}} = 1,11$ min en agua de peptona tamponada en presencia de la nanoemulsión de citral 0,5 mM, de modo que el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos log en este caso sería:

$$D_{52,5^{\circ}\text{C}} \times 6 = 1,11 \times 6 = 6,66 \text{ minutos}$$

Así pues, a 60°C el tratamiento se podría reducir de 7,32 a 6,66 minutos, es decir, tan solo un 9%, y manteniendo de nuevo los mismos niveles de seguridad alimentaria para este microorganismo. Estos resultados confirman que efectivamente a temperaturas más altas el efecto del citral se reduce.

En el caso de *S. Senftenberg* también se podría abordar la optimización tratando de disminuir la temperatura del tratamiento manteniendo los mismos tiempos de tratamiento. Siguiendo el ejemplo de *L. monocytogenes* y poniendo un tiempo de 6 minutos para inactivar 6 ciclos log, el tiempo para inactivar un ciclo seguiría siendo de un minuto. Ahora se trata de buscar la temperatura a la que el valor $D_T = 1$ min, lo cual implica que $\log D_T = 0$. Sustituyendo de nuevo en las ecuaciones de la tabla 4.6 tendríamos:

- Agua de peptona tamponada. Temperatura= $11,08/0,175 = 63,3^{\circ}\text{C}$
- Agua de peptona tamponada con citral. Temperatura= $9,11/0,145 = 62,8^{\circ}\text{C}$

De este modo, otra manera de optimizar el tratamiento sería añadiendo 0,5 mM de la nanoemulsión de citral y reduciendo la temperatura en 0,5°C, de 63,3°C a 62,8°C, manteniendo en este caso el mismo tiempo de tratamiento de 6 minutos y manteniendo así el mismo nivel de seguridad alimentaria.

Si bien en el caso de *Salmonella* la optimización del tratamiento llevaría a reducciones de tiempo o de temperatura mucho menores que en el caso de *Listeria*, el incremento del coste del tratamiento por la adición de citral seguiría siendo el mismo, pues seguimos con la misma concentración 0,5 mM, es decir, un coste inferior a un céntimo de euro por litro de producto.

No obstante, todos estos cálculos se han realizado en un medio de laboratorio, agua de peptona tamponada, pero si esta optimización tiene interés para la industria alimentaria sería para su aplicación en alimentos. Los resultados de esta investigación han demostrado que el efecto de la nanoemulsión de citral se reduce considerablemente hasta prácticamente desaparecer cuando el tratamiento térmico se realiza en un alimento, como el caldo de carne. Posiblemente, la presencia de un pequeño porcentaje de grasa (0,1%) en el caldo de carne es la responsable de la disminución del efecto, y el gran reto que se debe plantear la industria alimentaria si quiere reducir la intensidad de los tratamientos térmicos mediante la aplicación de nanoemulsiones de compuestos antimicrobianos, es como reducir el efecto negativo que tiene la grasa en este sentido.

Otra posibilidad, no explorada en esta investigación sería incrementar la concentración de citral para tratar de aumentar su efecto. No obstante, es bien conocido el carácter aromático de los componentes de los aceites esenciales, entre ellos el citral, por lo que un incremento de la concentración podría repercutir en un detrimento de las características organolépticas del producto final.

En cualquier caso, de manera similar a como se ha optimizado el tratamiento térmico del agua de peptona, se podría también abordar la optimización del tratamiento térmico del caldo de carne. No obstante, habría que tener en cuenta que las diferencias encontradas en la resistencia al calor de estos microorganismos en presencia o no de la nanoemulsión de citral no han resultado estadísticamente significativas en caldo de carne. En cualquier caso, se puede realizar el cálculo en términos de los valores absolutos de resistencia al calor encontrados para estos microorganismos en el caldo de carne.

Como en caldo de carne únicamente se ha calculado el valor D_T a una temperatura, los cálculos se pueden realizar en base a ese valor.

En caldo de carne sin nanoemulsión de citral se obtuvo un $D_{57,5^\circ\text{C}}=0,965$ min, con el que se puede calcular el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos logarítmicos de la población inicial de microorganismos a esta temperatura de $57,5^\circ\text{C}$.

$$D_{57,5^\circ\text{C}} \times 6 = 0,965 \times 6 = 5,79 \text{ minutos}$$

En caldo de carne con nanoemulsión de citral 0,5 mM se obtuvo un $D_{57,5^\circ\text{C}}=0,581$, con el que se puede calcular como se reduciría el tratamiento térmico a esta temperatura de $57,5^\circ\text{C}$.

$$D_{57,5^\circ\text{C}} \times 6 = 0,581 \times 6 = 3,49 \text{ minutos}$$

Así pues, a $57,5^\circ\text{C}$ el tratamiento se podría reducir de 5,79 a 3,486 minutos, es decir, en poco más de dos minutos, un 40%, manteniendo los mismos niveles de seguridad alimentaria para este microorganismo.

Para el caldo homogéneo sin nanoemulsión se obtuvo un $D_{57,5^\circ\text{C}}=0,72$ min, con el que se puede calcular el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos logarítmicos de la población inicial de microorganismos a esta temperatura de $57,5^\circ\text{C}$.

$$D_{57,5^\circ\text{C}} \times 6 = 0,72 \times 6 = 4,32 \text{ minutos}$$

En caldo de carne homogéneo con nanoemulsión de citral 0,5 mM se obtuvo un $D_{57,5^{\circ}\text{C}}=0,41$, con el que se puede calcular el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos logarítmicos de la población inicial de microorganismos a esta temperatura de $57,5^{\circ}\text{C}$:

$$D_{57,5^{\circ}\text{C}} \times 6 = 0,41 \times 6 = 2,46 \text{ minutos}$$

De esta manera, a $57,5^{\circ}\text{C}$ el tratamiento se podría reducir de 4,32 a 2,46 minutos, es decir, en aproximadamente dos minutos, un 43%, manteniendo los mismos niveles de seguridad alimentaria para este microorganismo.

Para *S. Senftenberg* se procedería de la misma forma:

En caldo de carne sin nanoemulsión de citral se obtuvo un $D_{60,0^{\circ}\text{C}}=3,90$, con el que se puede calcular el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos logarítmicos de la población inicial de microorganismos a esta temperatura de $60,0^{\circ}\text{C}$.

$$D_{60,0^{\circ}\text{C}} \times 6 = 3,90 \times 6 = 23,4 \text{ minutos}$$

En caldo de carne con nanoemulsión de citral 0,5 mM se obtuvo un $D_{60,0^{\circ}\text{C}}=3,63$, con el que se puede calcular el tiempo necesario para inactivar 6 ciclos logarítmicos de la población inicial de microorganismos a esta temperatura de $60,0^{\circ}\text{C}$.

$$D_{60,0^{\circ}\text{C}} \times 6 = 3,63 \times 6 = 21,78 \text{ minutos}$$

De esta manera, a 60°C el tratamiento se podría reducir de 23,4 a 21,78 minutos, es decir, en aproximadamente dos minutos, un 7%, manteniendo los mismos niveles de seguridad alimentaria para este microorganismo.

Aunque en caldo de carne la reducción de los tiempos de tratamiento es mucho menor que lo observado en agua de peptona tamponada, todavía sería posible optimizar los tratamientos térmicos en base a la adición de una nanoemulsión de citral. Es conveniente recordar que, también en este caso el coste adicional del tratamiento seguiría siendo inferior a 1 céntimo de euro por litro de caldo, dado que la concentración de citral en el caldo de carne sigue siendo la misma, 0,5 mM,

5. Conclusiones

Con los experimentos que se han realizado en este trabajo se ha podido concluir que:

- La adición de una nanoemulsión de citral 0,5 mM al agua de peptona tamponada redujo la termorresistencia de *Salmonella* Senftenberg y de *Listeria monocytogenes*. Aunque el efecto del citral era mayor en *Listeria* (El valor $D_{52,5^{\circ}\text{C}}$ se reduce de 35,5 a 3,68 minutos, es decir, 9 veces) que en *Salmonella* (Valor $D_{55^{\circ}\text{C}}$ pasó de 25,63 minutos a 13,56, también se redujo la termorresistencia de este microorganismo.
- La adición de una nanoemulsión de citral al caldo de carne tuvo un efecto considerablemente menor en la termorresistencia de estos microorganismos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores D_T obtenidos con o sin citral en ambos microorganismos.
- Los resultados obtenidos permitirían reducir el tiempo de tratamiento necesario para conseguir 6 ciclos logarítmicos de inactivación en agua de peptona a 52,5 °C en prácticamente un 90%, de 213^a 22,08 minutos, al añadir una nanoemulsión de citral 0,5 mM. O bien permitirían reducir la temperatura de tratamiento en casi 4°C, de 58,4 a 54,6°C manteniendo los mismos tiempos.
- En el caso de *Salmonella*, la reducción sería de un 9% en agua de peptona a 60°C, pasando de 7,32 a 6,66 minutos, o bien de 63,3 a 62,8°C, manteniendo los mismos tiempos de tratamiento. Además, el uso del citral por tratamiento sería solo de 0,92 céntimos.

6. Bibliografía

Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2021). Available at: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/agencia/seccion/sobre_aesan.htm (Accessed: 26 May 2021).

Aljaafari, Sultan, Abushelaibi, Lai y Lim. (2019) Aceites esenciales: colaborando con antibióticos, Aceites esenciales- Aceites de la naturaleza. IntechOpen. London. doi: 10.5772/intechopen.86575.

Alvarado López, G. and Medina Lezama, E. (2019) 'Nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja y tween 80', *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(2), pp. 189–205.

Buchanan, R. L. 1997. «National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods “Principles of Risk Assessment for Illnesses Caused by Foodborne Biological Agents”». *Journal of Food Protection* 60(11):1417–1419.

Campezo, C. (2016) 'Guía sobre aceites esenciales en productos cosméticos'. Dirección Europea para la Calidad del Medicamento y la Asistencia del Consejo de Europa (EDQM). Madrid.

Casp Vanaclocha, A. and Abril Requena, J. (2003) '*Procesos de conservación de alimentos*'. Tercera edición. Mundi-Prensa. Madrid.

Castro Ríos, K. (2012). '*Tecnología de alimentos*'. Colombia: Ediciones de la U. Available at: <https://library.biblioboard.com/content/cf99c770-ffe9-407c-bbfe-0cef24464721> (Accessed: 29 April 2021).

Conesa, (2009) 'Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia', *Journal of Applied Microbiology*. 107: 506-513.

'Coronel, Aguilera, Jimenez. *Munguía y López*. (2009). 'Modelos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana en alimentos'. 3: 11-23.

Dunlop. R.H ; Williams, D.I (1996) '*Medicina veterinaria, una historia ilustrada*'. Mosby-Year book. St-Louis.

Durich, J. O. (2002) 'Las toxiinfecciones alimentarias como problema de salud pública'. *Med integral*; 40: 1-3.

EFSA (2021) *EFSA, European Food Safety Authority*. Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa> (Accessed: 26 May 2021).

Espinosa, Varela, Martínez y Cano. (2015) 'Brotos de enfermedades transmitidas por alimentos. España'. Vol 22 n° 11: 130-145.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2021) 'The European Union One Health 2019 Zoonoses Report, *EFSA Journal*'.

FAO (2021).

Gestion y Calidad, A. (2020) 'Organismos implicados en la seguridad alimentaria'. *Gestión-Calidad.com*. Available at: <http://gestion-calidad.com/organismos-implicados-en-la-seguridad-alimentaria> (Accessed: 26 May 2021).

IAA (2020). 'La importancia de los tratamientos térmicos en la conservación de alimentos.' Available at: <https://www.industriaalimentaria.org/blog/contenido/la-importancia-de-los-tratamientos-termicos-en-la-conservacion-de-alimentos> (Accessed: 28 April 2021).

Iguaz (2020). 'Apuntes de operaciones básicas en ingeniería de los alimentos'.

Durás y Abajas (2011). 'Enfermedades de origen alimentario, intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias.' Open Course Ware. Madrid.

Jones, D. and Seeliger, H. P. R. (1986) 'Comité internacional en Bacteriología Sistemática subcomité en la taxonomía de *Listeria*, *Brochothrix* y *Erysipelothrix*: Minutos del meetingsm 7 y 8 de septiembre 1986, Manchester, England', *International Journal of Systematic Bacteriology*.

Kopper, et al (2009). 'Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua'. Food & Agriculture org.

Ledermann D., W. (2003) 'Una historia del bacilo de Eberth desde Junker hasta Germanier', *Revista chilena de infectología*, 20. Edición aniversario. 58-61

Lopez y Bueno (2019). 'Patogenia y tipos de *Salmonella*'. *Negocios de avicultura*. Año 16. Número 87: 1-9. Available at: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_-_salmonella_patogenia_y_tipos_lopez_y_bueno_2019.pdf (Accessed: 10 June 2021).

Martinez M, (2001). 'Aceites esenciales.' Guía. Universidad de Medellín.

Maté (2016). 'Efecto del D-limoneno en forma de nanoemulsión en la viabilidad de *Listeria monocytogenes* en alimentos'. Tesis doctoral. UPCT.

Maté, M. Periago, Palop, Chumillas, Huerta y Grullón. (2017) 'La grasa y la fibra interfieren con el drástico efecto que tiene el D-limoneno nanoemulsionado sobre la resistencia al calor de *Listeria monocytogenes*.'. *Food Microbiology*. Elsevier. Amsterdam.

Ministerio de sanidad (2019). 'Informe de casos de *Listeria*'.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. (2016). '*Microbiología médica*.' 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier.

Olivares, R. (2009) 'Listeria monocytogenes: bacteria antigua, desafío permanente'. *Medwave*. n° 6: 1-6.

OMS (2021) '*Enfermedades de transmisión alimentaria, OMS 2021*'.

Perez, Reyes, Sosa y Morales, (2013). 'Mecanismos de transferencia de calor que ocurren en tratamientos térmicos de alimentos.' Universidad de las Américas. México. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 7-1*. 37-47.

Ros & Bustillo (2011) '*Escaldado de alimentos*.' Open Course Ware. Madrid. Available at: https://www.infoalimentacion.com/noticias/2009/5/2648_escaldado_alimentos.asp (Accessed: 29 April 2021).

Ros-Chumillas, Garre, M. Periago, Maté y Palop. (2017) 'D-limoneno nanoemulsionado reduce la resistencia al calor de *S. Senftenberg* sobre 50 veces'. MDPI. Suiza.

Salazar, C. V. (2019). 'Optimización de tratamientos térmicos aplicados a alimentos líquidos mediante nanoemulsiones de antimicrobianos naturales.' Trabajo Fin de Grado. UPCT

Sarango (2020). 'Evaluación del efecto combinado de calor y microemulsión de timol frente a *Listeria monocytogenes* en caldo de cultivo y alimento (caldo casero de carne).' Trabajo Fin de Grado. UPCT.

Singh, Meher, Raval, Khan, Chaurasia y Jain. (2017) 'Nanoemulsion: Conceptos, desarrollo y aplicaciones en el transporte de cosméticos.', *Journal of Controlled Release*. Vol 252: 28-49.

Somolinos, García, Condón, Mackey y Pagan. (2010) 'Inactivación de *Escherichia coli* mediante citral', *Journal of Applied Microbiology*. 108: 1928-1939.

Somrani, M. (2020). 'La actividad anti-biofilm de los aceites esenciales en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Enteritidis*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena. doi: 10.31428/10317/9168.

Lima (2007). 'Ajuste a un modelo matemático, predicción y validación de un modelo experimental no-lineal'. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena.

Espín (2019). 'Evaluación del efecto de la velocidad de calentamiento en un proceso combinado de calor y nanoemulsiones de antimicrobianos'. Trabajo fin de Carrera. UPCT.

UPCT (2020). '*Laboratorios de tres continentes ya han comprado el termorresistómetro Mastia patentado por la UPCT.*' Available at: https://www.upct.es/destacados/cdestacados.php?id_buscar=11806 (Accessed: 24 May 2021).

Willey, J. M. (2020). '*Microbiología de Prescott.*' Decimoprimer edición. Nueva York, NY: McGraw-Hill Education.

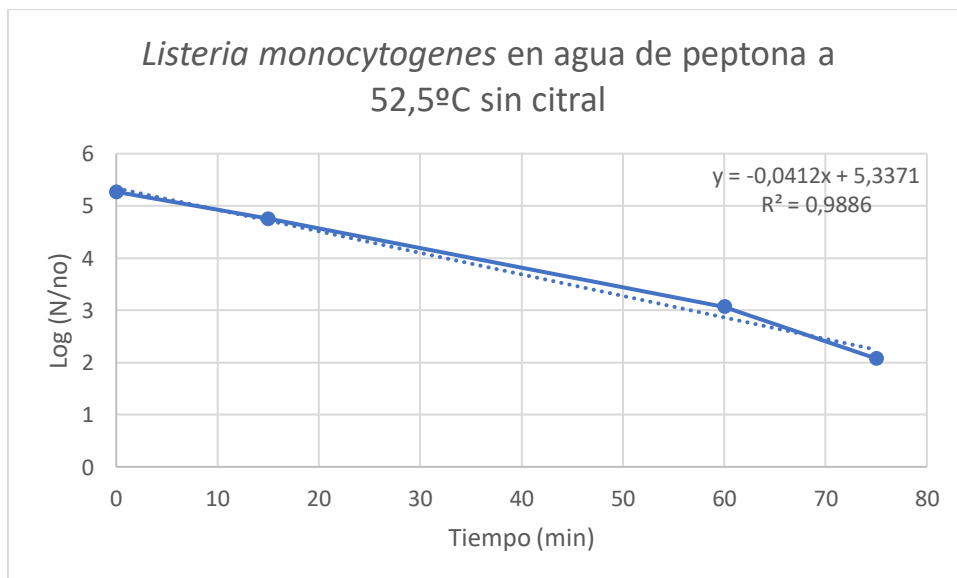
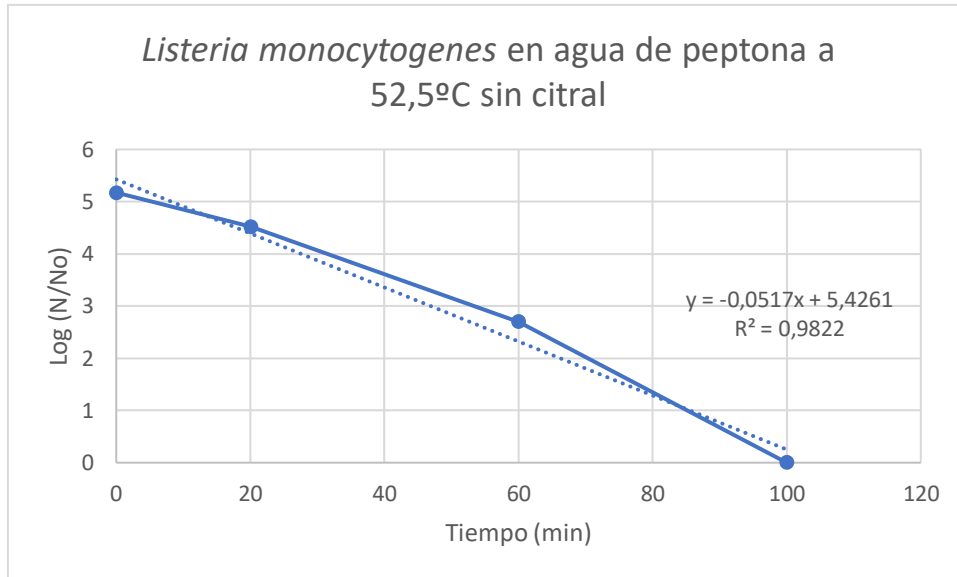
Tafur (2019). 'Desarrollo de biopelículas activas con aceite esencial de citral microencapsulado y su efecto en la carga microbiana del queso fresco'. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Agraria la Molina. Available at: <http://190.119.243.88/bitstream/handle/UNALM/4157/yoplac-tafur-ives-julian.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accessed: 10 June 2021).

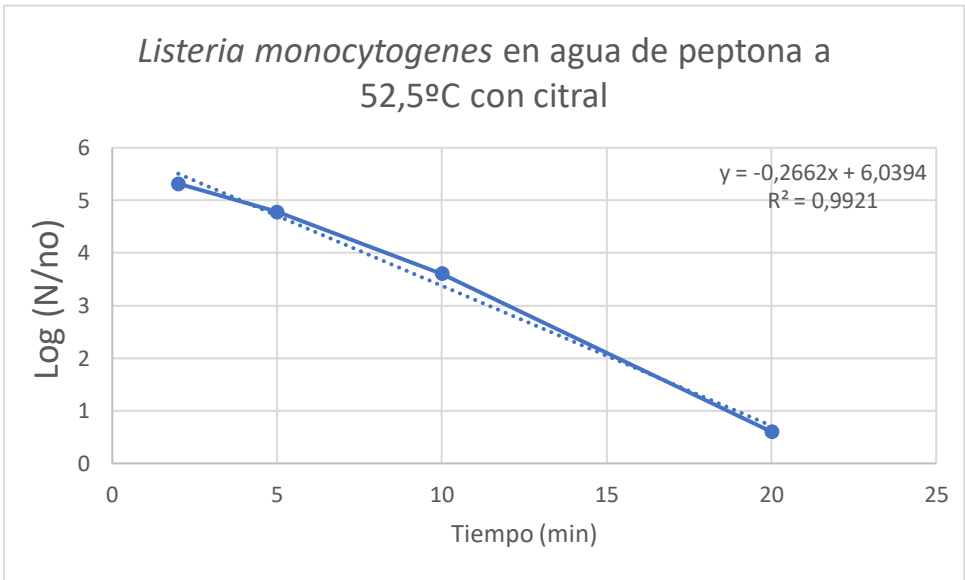
www.sigmaaldrich.com

Young, Freedman (2008) 'Física universitaria vol I'. Decimosegunda edición. Sears-Zemansky.

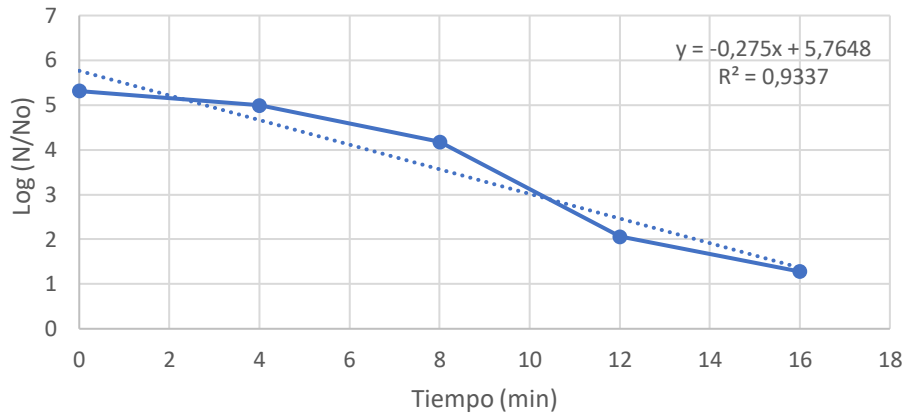
7. Anexos

Gráficas de supervivencia del microorganismo en agua de peptona

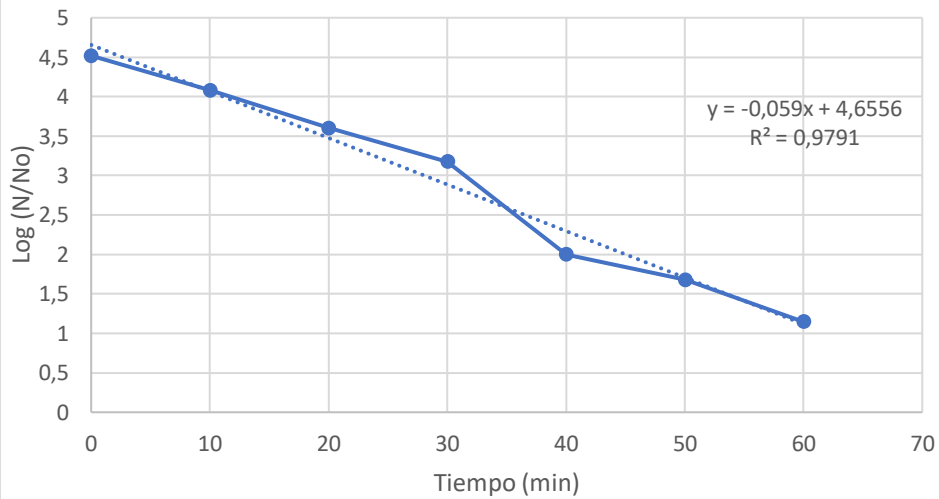




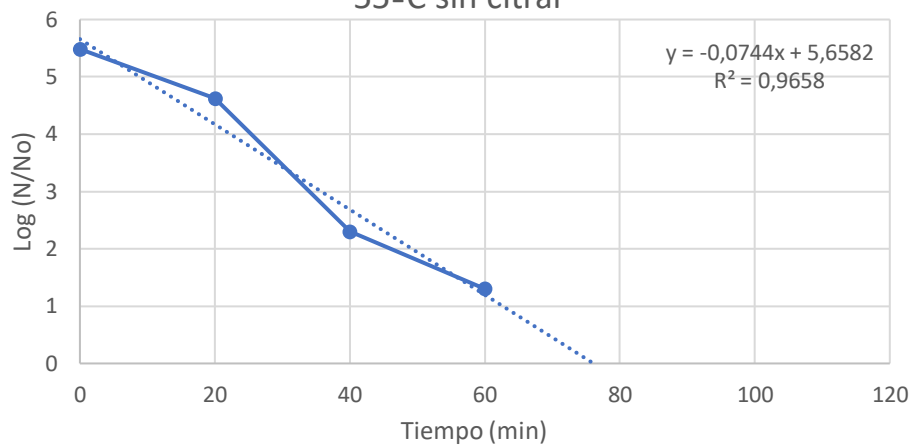
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 52,5°C con citral



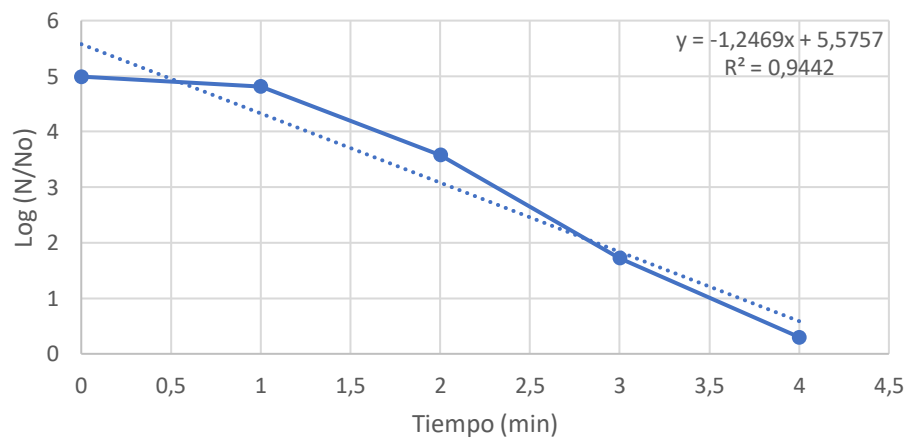
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 55°C sin citral



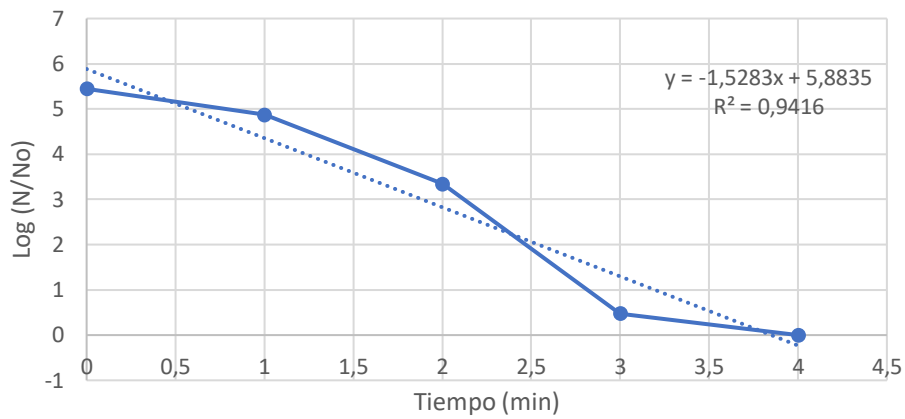
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 55°C sin citral



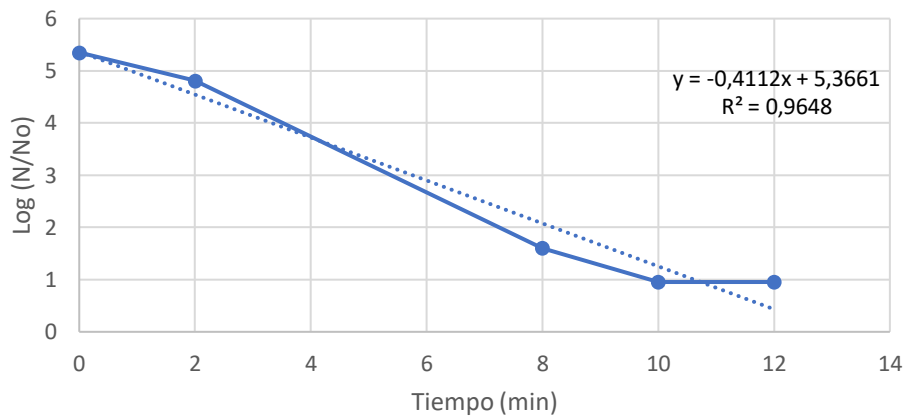
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 55°C con citral



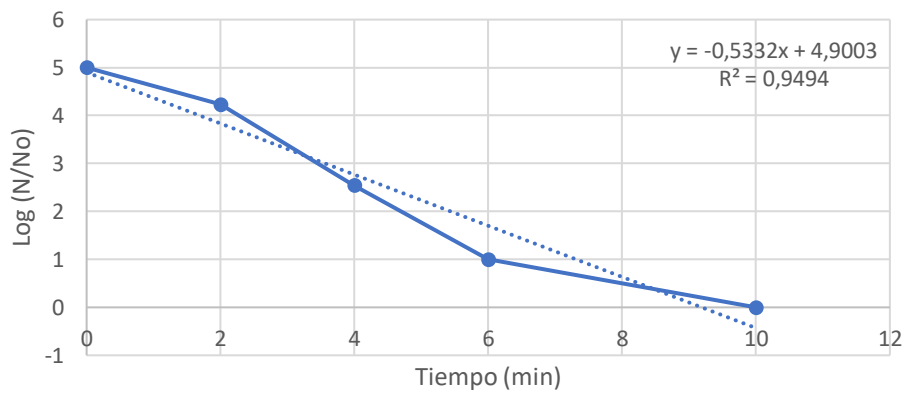
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 55°C con citral



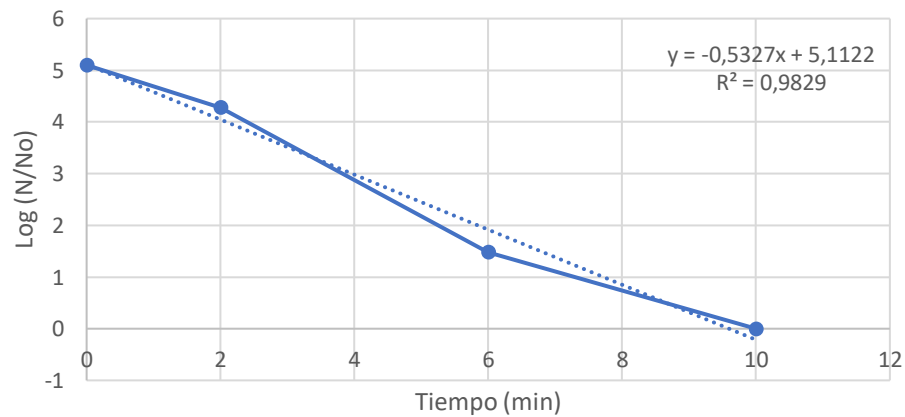
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 57,5°C sin citral

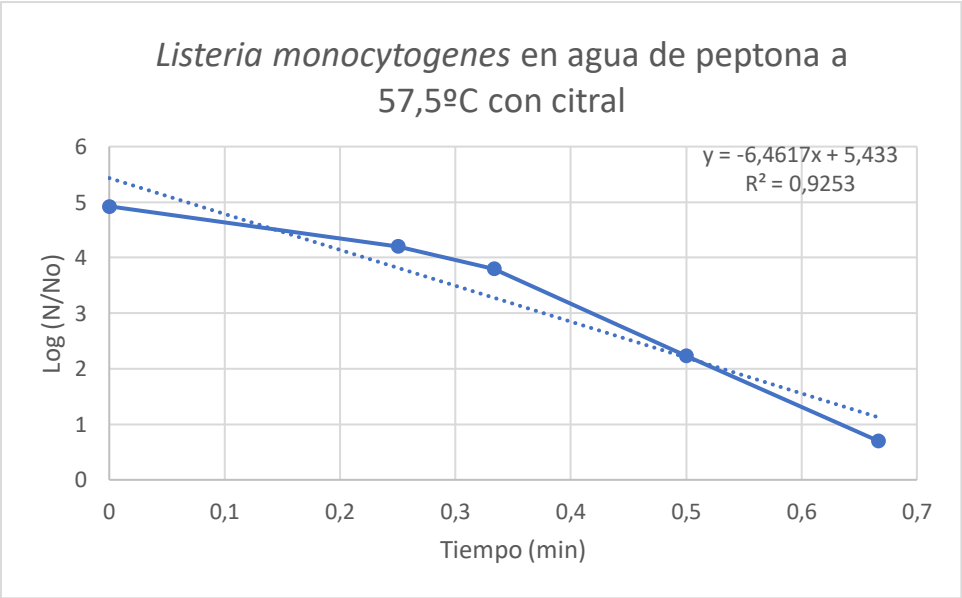
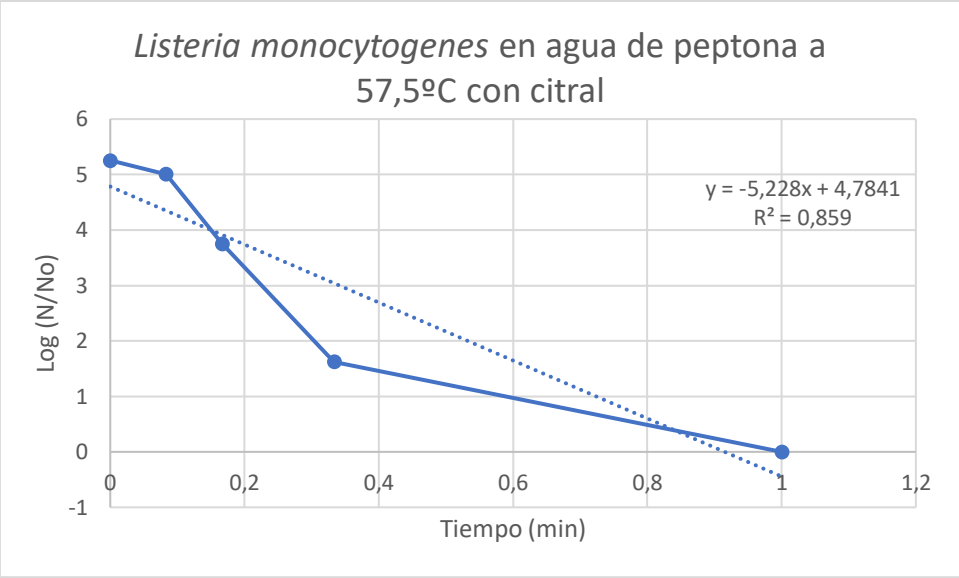


Listeria monocytogenes en agua de peptona a 57,5°C sin citral

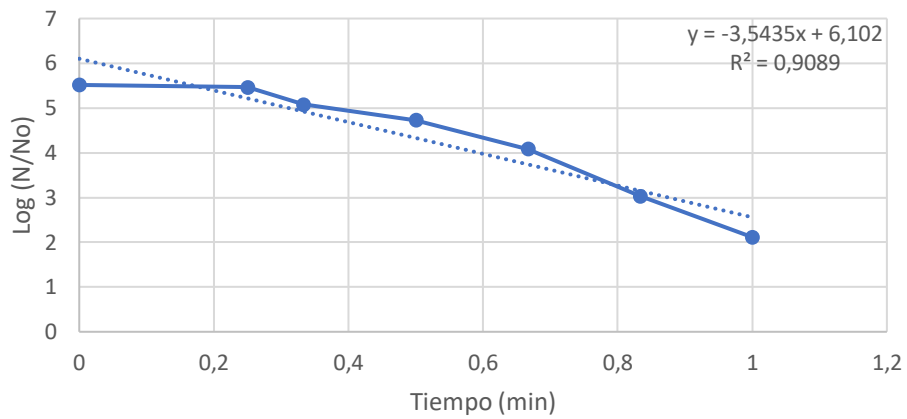


Listeria monocytogenes en agua de peptona a 57,5°C sin citral

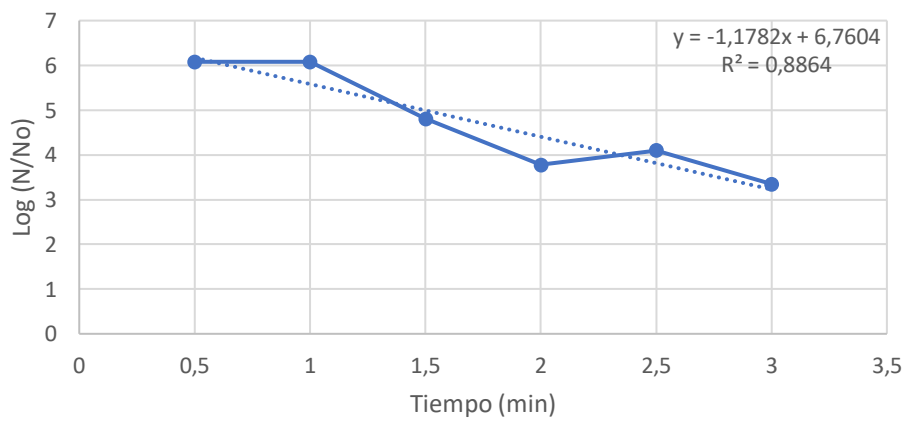


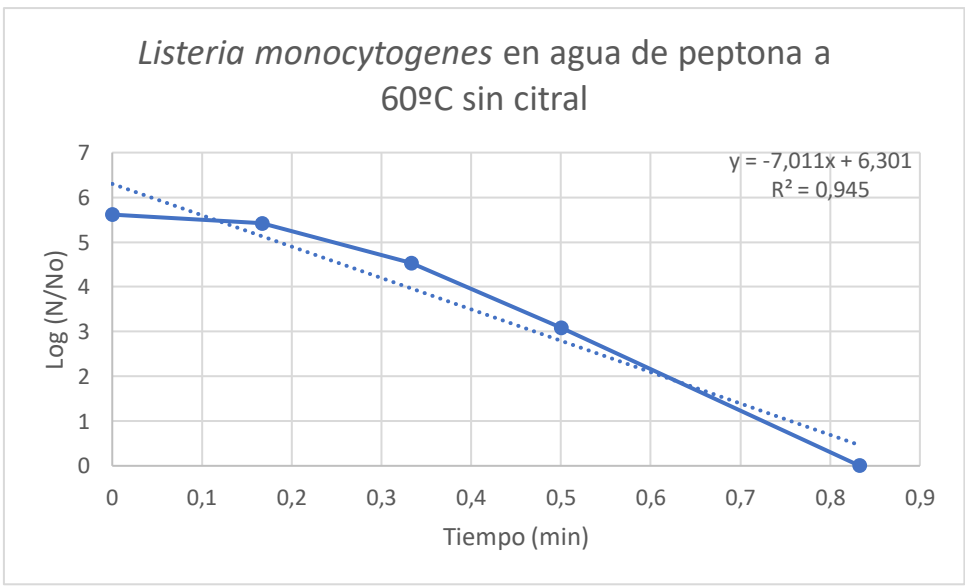
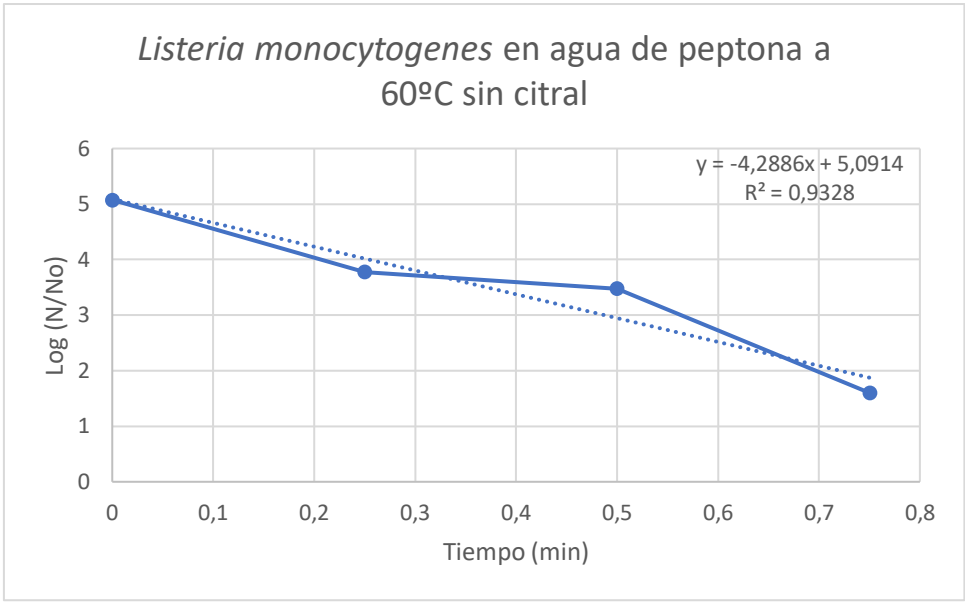


Listeria monocytogenes en agua de peptona a 57,5°C con citral

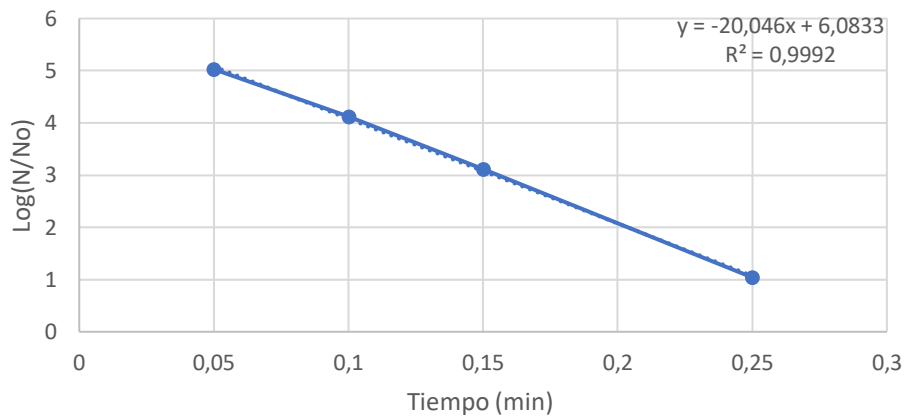


Listeria monocytogenes en agua de peptona a 60°C sin citral

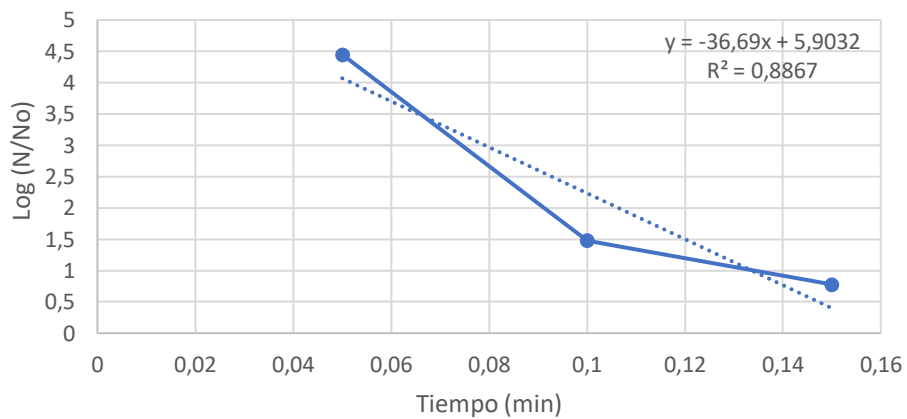




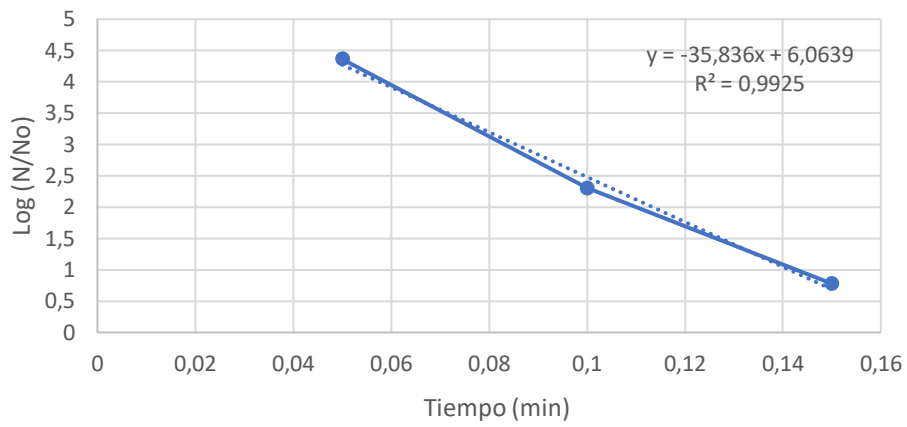
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 60°C con citral



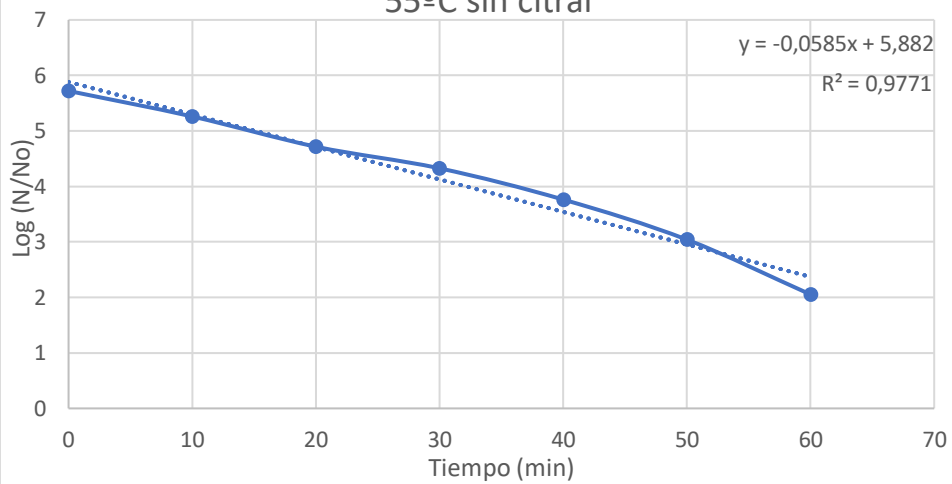
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 60°C con citral



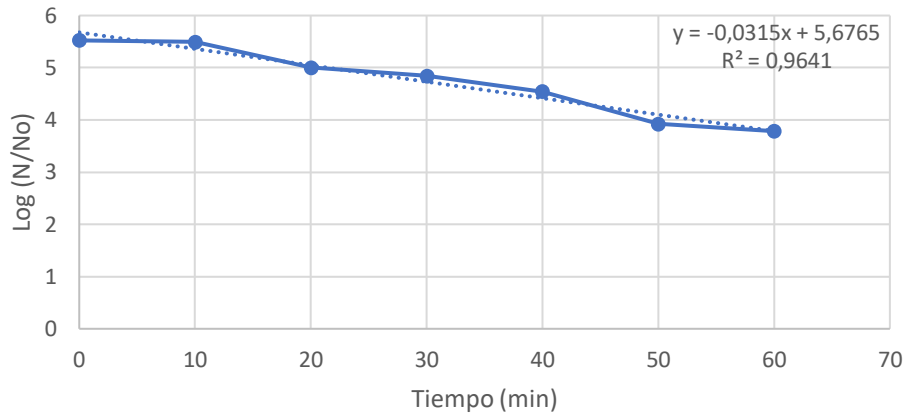
Listeria monocytogenes en agua de peptona a 60°C con citral



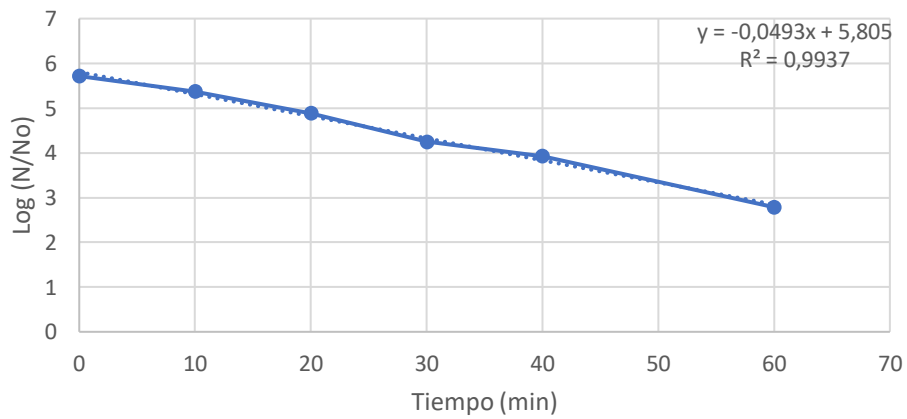
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 55°C sin citral



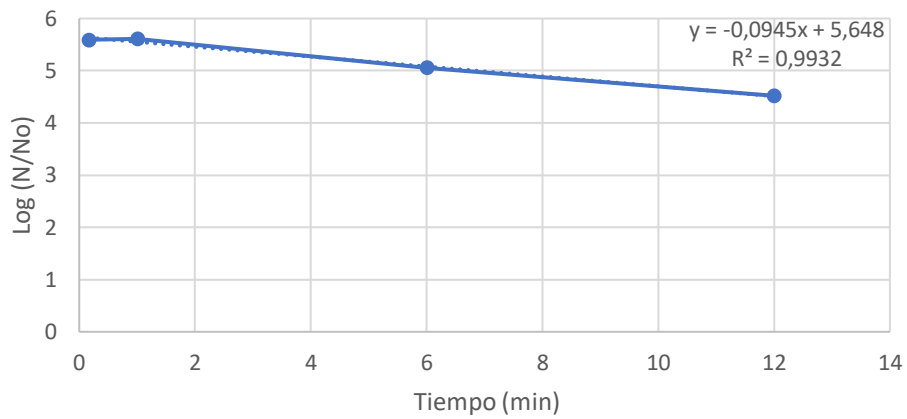
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 55°C sin citral



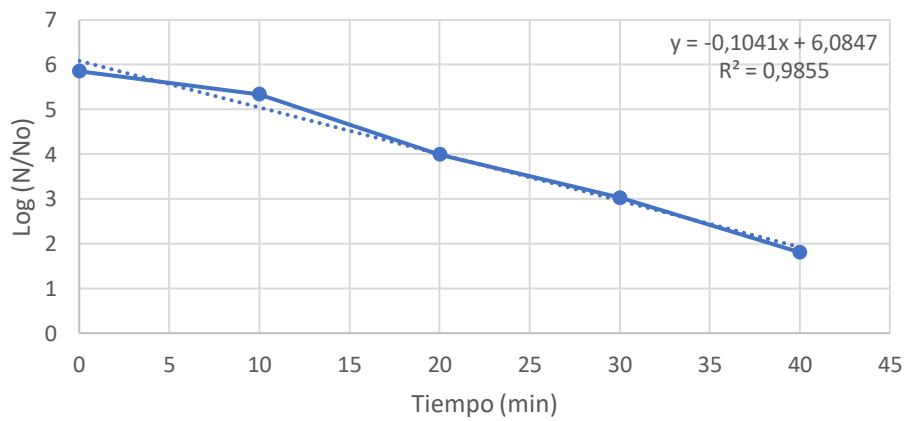
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 55°C sin citral



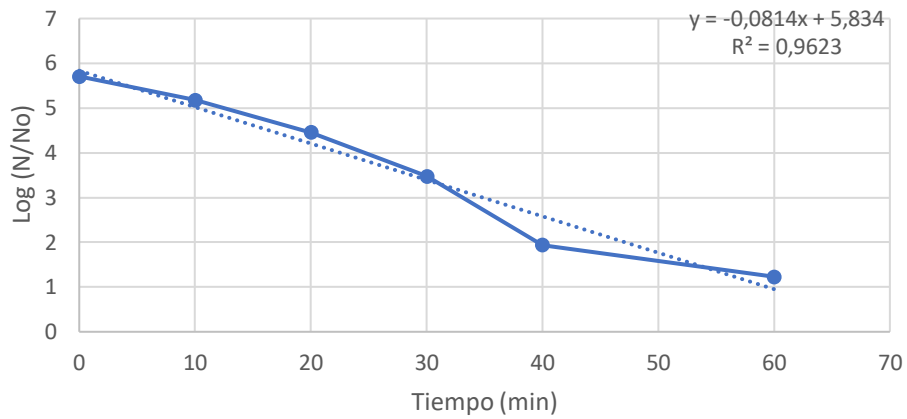
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 55°C con citral



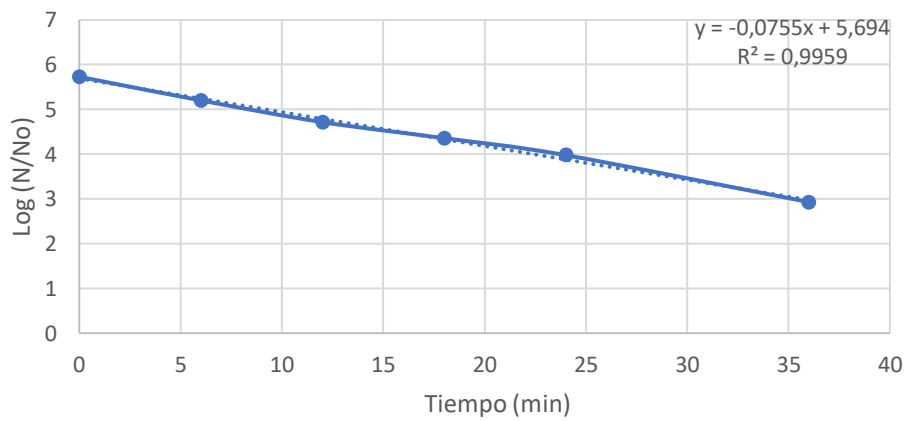
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 55°C con citral

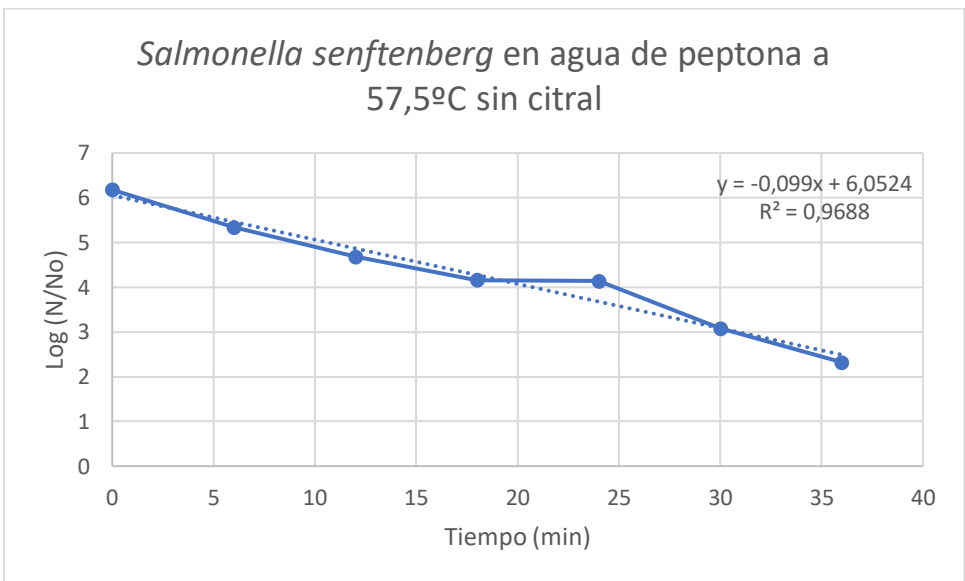
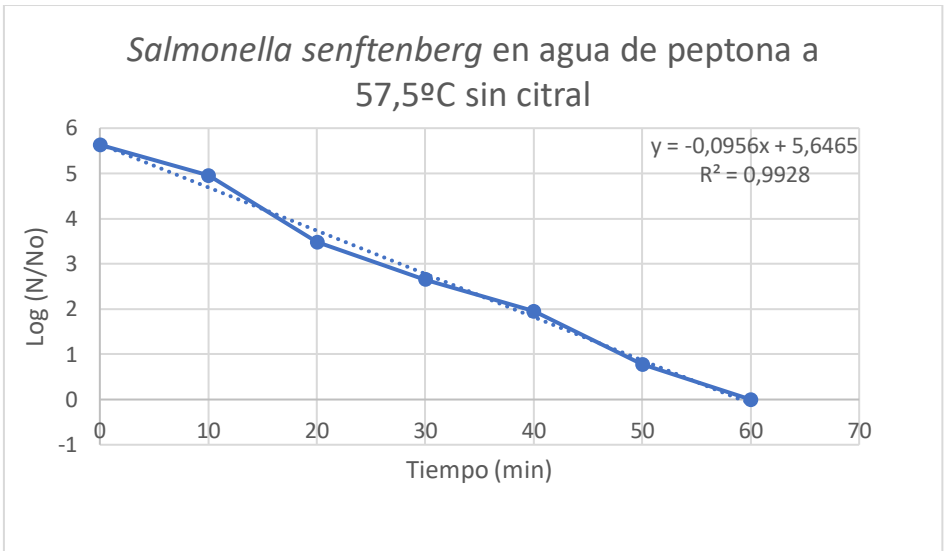


Salmonella senftenberg en agua de peptona a 55°C con citral

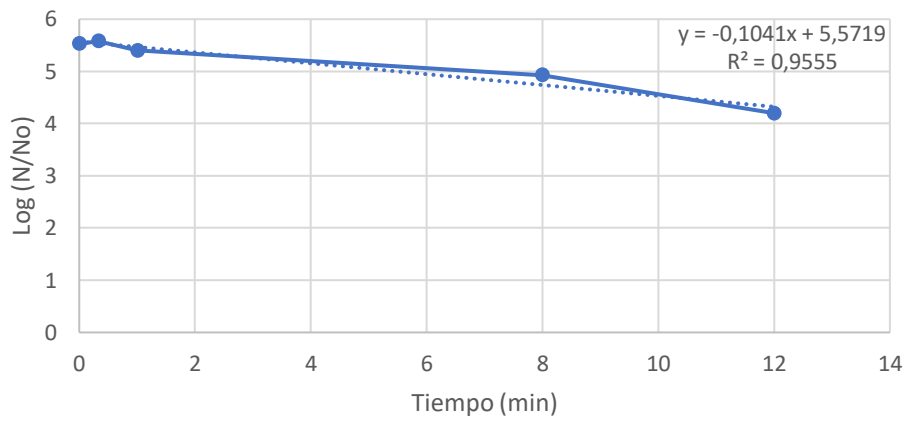


Salmonella senftenberg en agua de peptona a 57,5°C sin citral

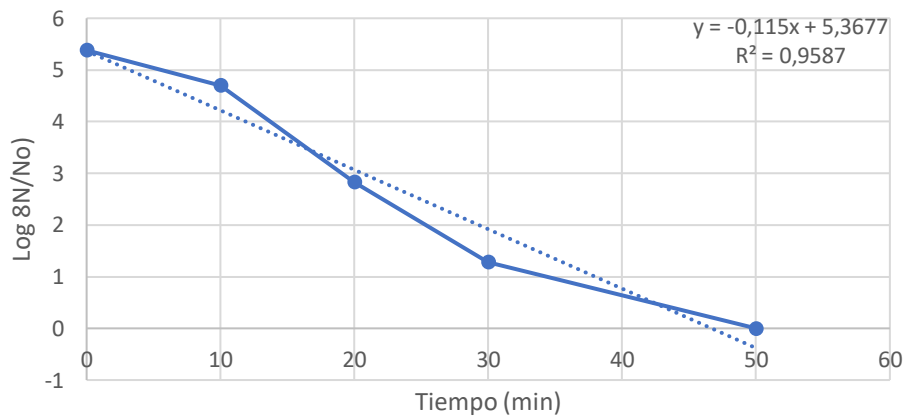




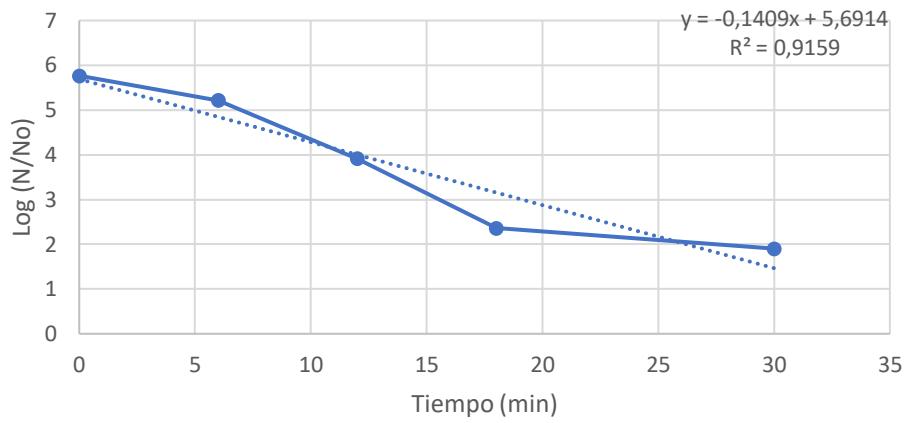
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 57,5°C con citral



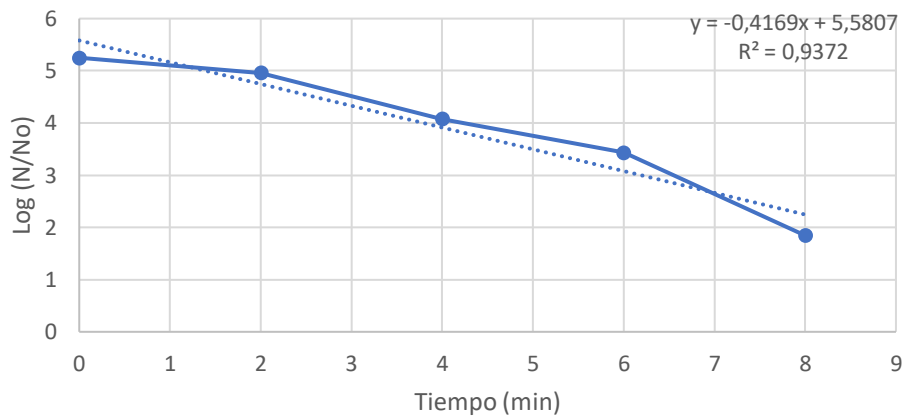
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 57,5°C con citral



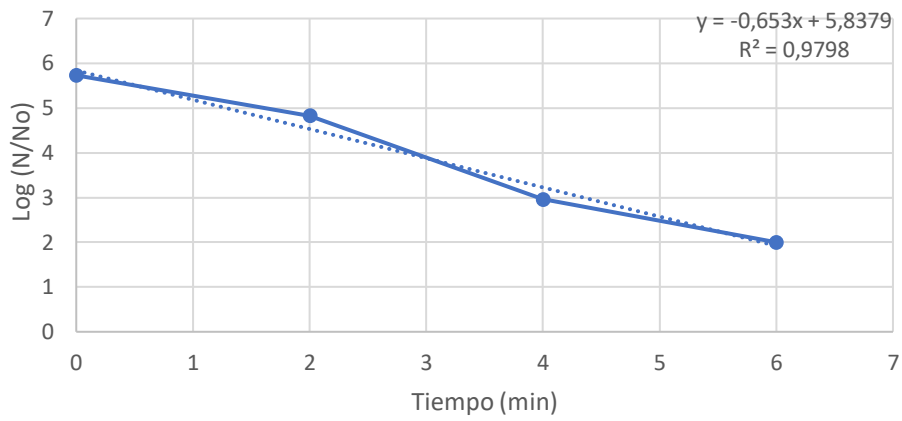
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 57,5°C con citral



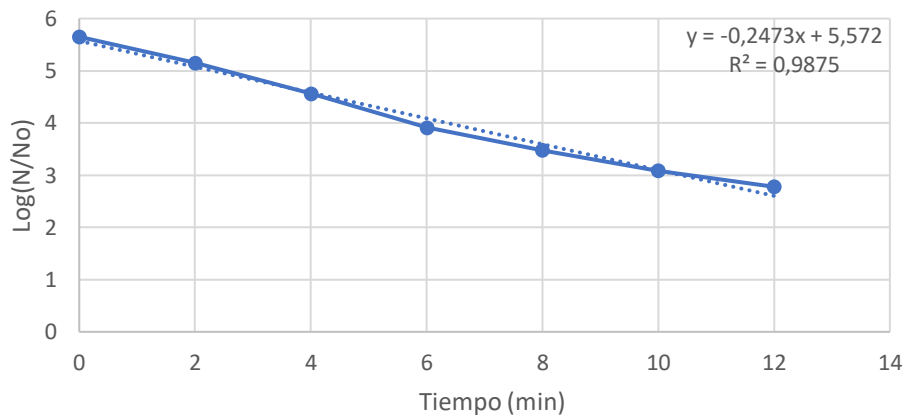
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 60°C sin citral



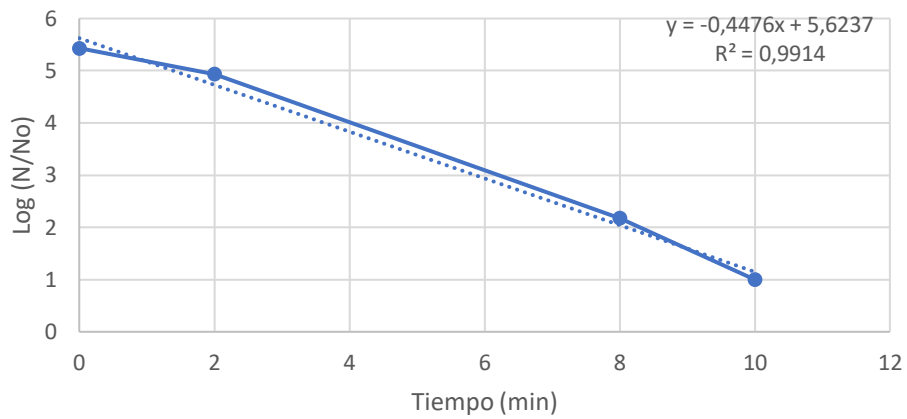
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 60°C con citral



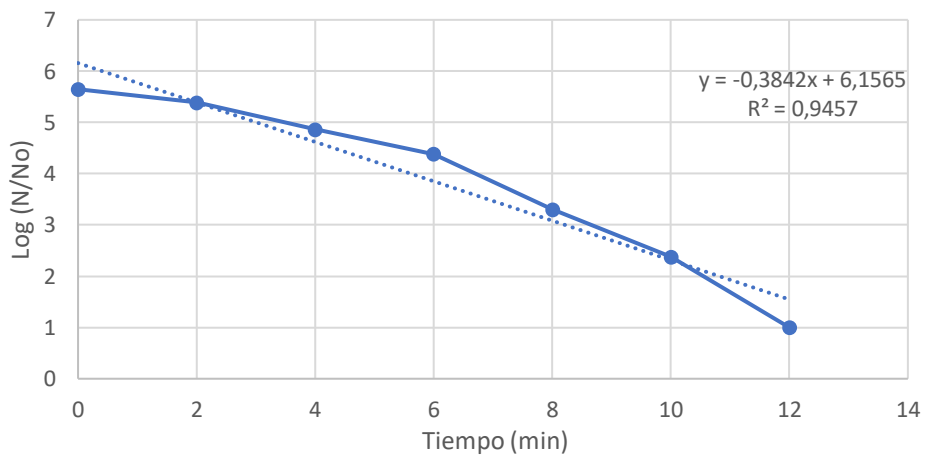
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 60°C sin citral



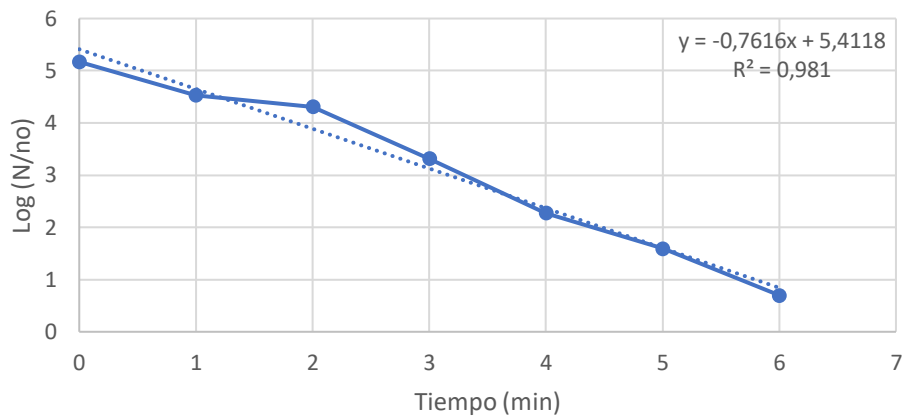
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 60°C con citral



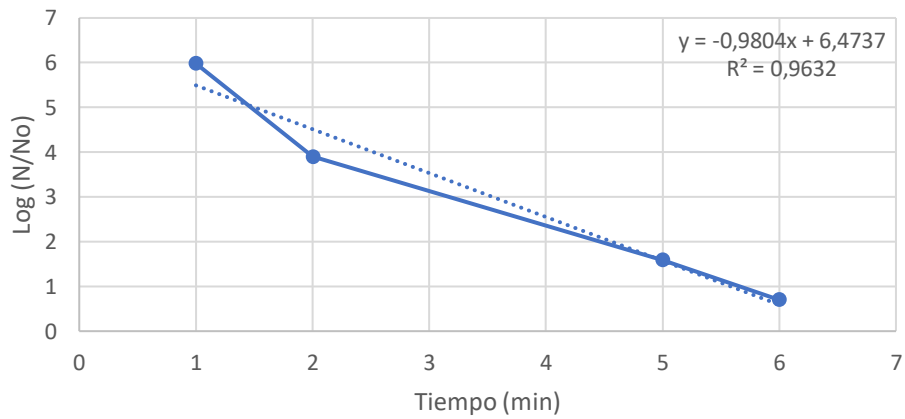
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 60°C con citral



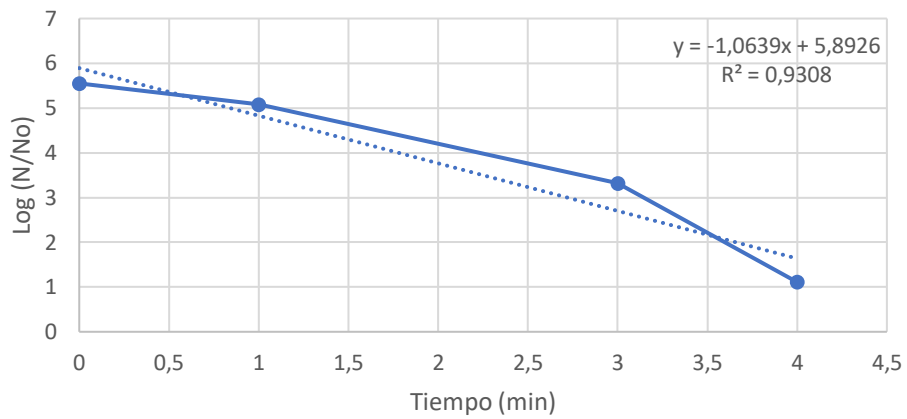
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 62,5°C sin citral



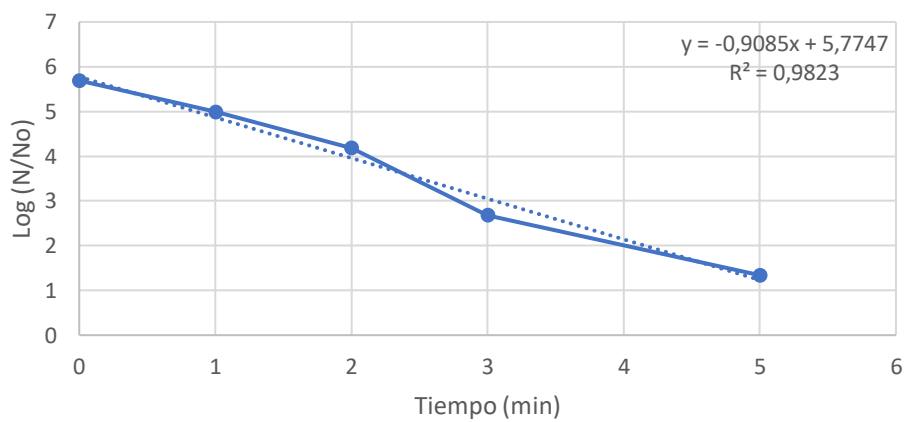
Salmonella senftenberg en agua de peptona a 62,5°C sin citral

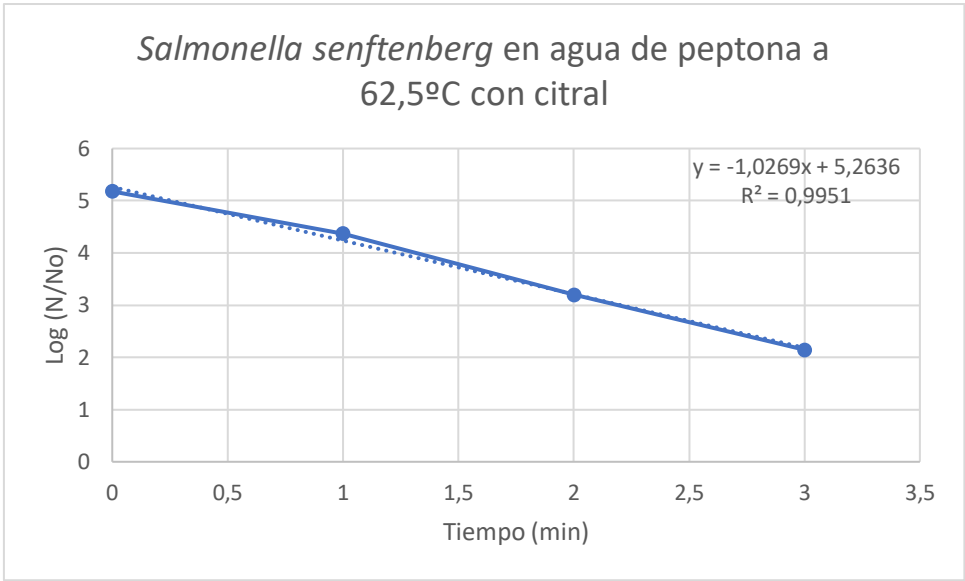


Salmonella senftenberg en agua de peptona a 62,5°C con citral

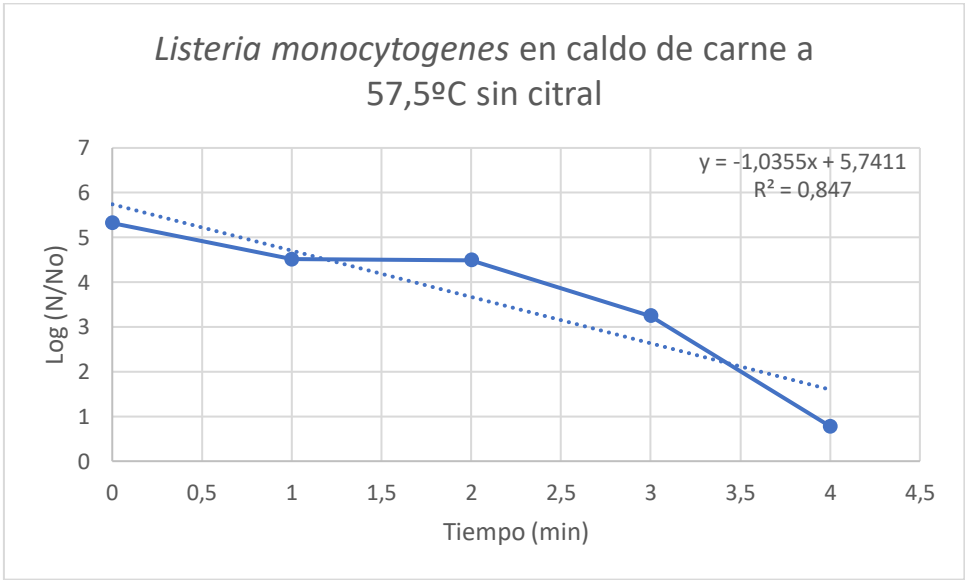


Salmonella senftenberg en agua de peptona a 62,5°C con citral

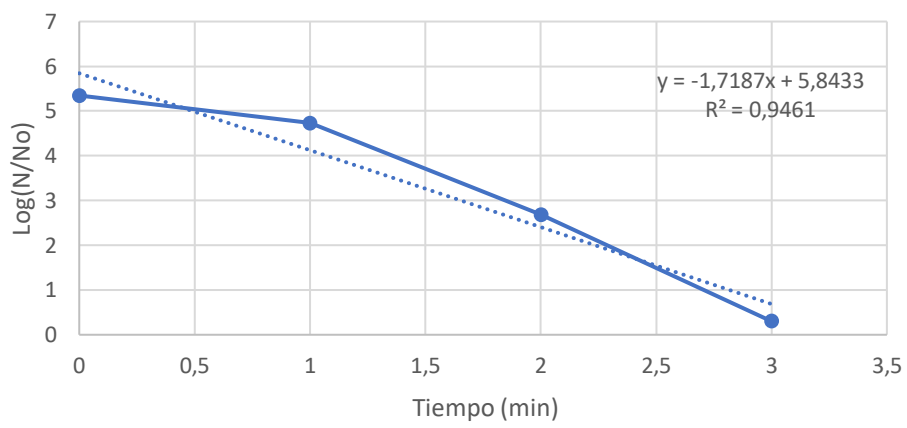




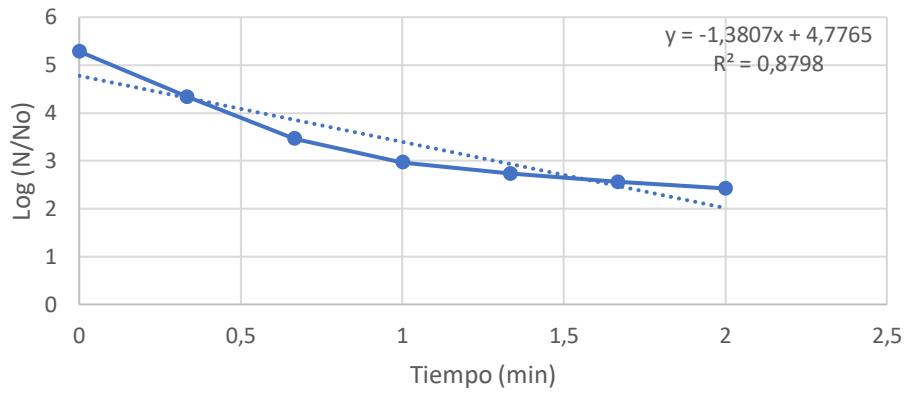
Gráficas de supervivencia de microorganismos en caldo de carne.



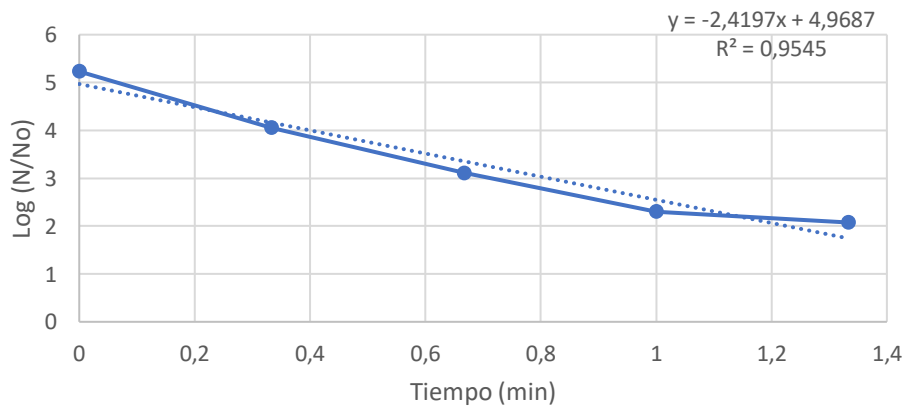
Listeria monocytogenes en caldo de carne a 57,5°C con citral



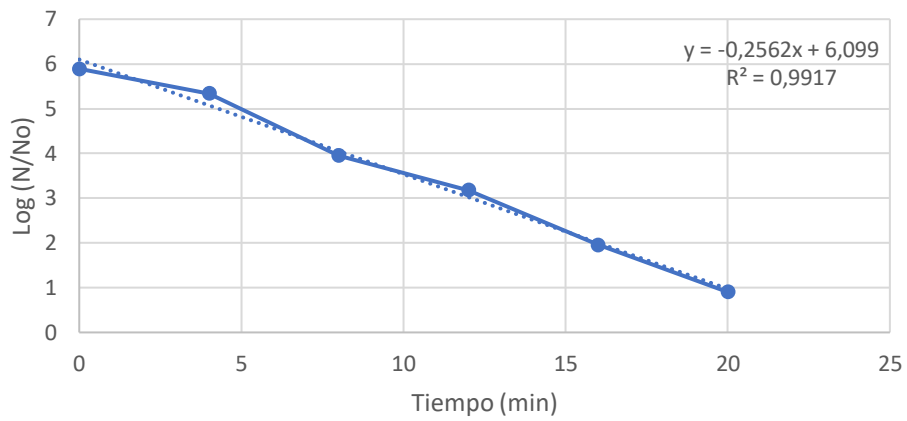
Listeria monocytogenes en caldo de carne homogéneo a 57,5°C sin citral



Listeria monocytogenes en caldo de carne homogéneo a 57,5°C con citral



Salmonella senftenberg en caldo de carne a 60°C
sin citral



Salmonella senftenberg en caldo de carne a 60°C
con citral

