



UNIVERSIDAD CENTRAL VENEZUELA



FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**CONTROL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y
DETERIORATIVOS EN JUGOS DE NARANJA (*Citrus sinensis* L.) Y
MANGO (*Mangifera indica* L.) USANDO COMPUESTOS
ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN DE PLANTAS.**

Tutora: Dra. Rosa Raybaudi-Massilia TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por La Br. Alexandra Zambrano, como requisito parcial para optar al título de Licenciando en Biología mención Tecnología de Alimentos.

Caracas, Julio de 2011.

RESUMEN

Los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización han sido aplicados con éxito a los jugos de frutas para garantizar su calidad e inocuidad microbiológica desde hace mucho tiempo, sin embargo es bien sabido que sus características fisicoquímicas, propiedades nutricionales y atributos sensoriales pueden verse afectados por estos tratamientos. Por esta razón el interés en el uso de tratamientos no térmicos solos o combinados con sustancias antimicrobianas naturales para la conservación de los jugos ha incrementado en los últimos años. No obstante, la mayoría de los trabajos reportados en la bibliografía sobre el efecto de sustancias antimicrobianas de origen de plantas contra microorganismos patógenos y deteriorativos han sido realizados “in vitro”, siendo pocos los trabajos de investigación realizados aplicando directamente estas sustancias sobre jugos frescos. Brotes causados por *Salmonella* y *E. coli* O:157:H7 han estado asociados con el consumo de frutas y jugos frescos de mango y naranja y otras frutas, la mayoría de estos brotes están relacionados a la presencia de estos patógenos en la corteza de la fruta, contaminada presumiblemente en el campo por fertilizantes aplicados inadecuadamente, irrigación con aguas contaminadas o a través de trabajadores infectados, por lo tanto, estos patógenos pueden ser transferidos durante su procesamiento. Con la finalidad de contrarrestar el crecimiento de microorganismos patógenos efectivamente en jugos frescos, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas como *Ginseng*, *Ginkgo biloba*, Extracto de semillas y cáscaras de uvas roja y *Aloe vera* por el método de difusión de discos, sobre microorganismos patógenos como *Salmonella entérica* serv. Saintpoul y *E. coli* O:157:H7 “in vitro” y en jugos de naranja (*Citrus sinensis* L.) variedad Valencia y mango (*Mangifera indica* L.) variedad Haden, determinándose actividad

antimicrobiano en todos los compuestos empleados, siendo el *Ginseng* el de mayor efectividad. Este compuesto fue empleado en conjunto con un ácido orgánico (málico) y una sal (sorbato de potasio) mediante un diseño multinivel (2x2x2x2) en jugos de mango y naranja clarificados, esterilizados, y almacenados durante 72 h a 5°C, dónde la combinación de las máximas concentraciones empleadas de ácido málico (0,5%), sorbato de potasio (0,05%) y ginseng (2%), mostró un sinergismo en la inactivación de dichos patógenos, reduciendo $2,77 \pm 0,00$ unidades logarítmicas de *E. coli* O157:H7 y un nivel de $6,23 \pm 0,00$ de *S. Saintpaul* en jugos de naranja, y reduciendo un nivel de $6,68 \pm 0,00$ de *E. coli* y $6,44 \pm 0,00$ de *S. Saintpaul* en jugo de mango a las 72 horas de almacenamiento. Al emplear tales concentraciones durante el almacenamiento a 5°C durante 21 días en jugos de mango y naranja frescos se logró inactivar las poblaciones de *S. Saintpaul* hasta niveles indetectables, lo cuales fueron encontradas a los 0 y 1 día de almacenamiento respectivamente. *E. coli* O157:H7 resultó ser más resistente al tratamiento, observándose una reducción total de la población a los 7 días. El empleo de *ginseng* 2%, ác. málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05% en jugos de naranja y mango almacenados por 21 días a 5°C mostró que los parámetros fisicoquímicos como pH y acidez titulable se mantuvieron casi constantes en el tiempo, debido a que el tratamiento con sustancias antimicrobianas retrasó el proceso de senescencia del jugo e inhibió el crecimiento de la flora nativa. Los índices de color aumentaron significativamente en lo jugos de frutas tratados con los antimicrobianos, favoreciendo las características como luminosidad, color amarillo y rojo principalmente.

AGRADECIMIENTOS

✧ *A Dios y a la Virgen María:*

Por haberme iluminado el camino en cada sombra, y por darme la fortaleza para lograr esta gran meta.

✧ *A mi familia:*

Por su motivación, ayuda y amor incondicional, gracias papá por ayudarme a leer los textos en inglés, gracias mamá por ayudarme a redactar, educadores, formadores y transformadores en base al texto y en el contexto.

✧ *A la Universidad Central de Venezuela:*

Por brindarme la educación exclusiva, agradezco a todos los profesores que formaron parte de este largo camino del aprendizaje de la biología.

✧ *A la Dra. Rosa Raybaudi-Massilia:*

A quien agradezco enormemente su dedicación, comprensión, paciencia, y todo lo aprendido, ya que fui su pasante y tesista, y a su esposo Jonathan Mosqueda por la ayuda brindada en los análisis de la Tesis.

✧ *A todos los compañeros, empleados y amigos que conocí en esta casa, gracias por su cariño y apoyo.*

***A todos mis sinceros
agradecimientos.***

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MARCO TEÓRICO.....	17
3.1 Generalidades de las frutas.	17
3.2 Aspectos nutricionales, de calidad e inocuidad de los jugos de frutas frescos.	21
3.2.1 Características principales de <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.....	25
3.2.1.1 <i>Salmonella</i>	25
3.2.1.2 <i>E. coli</i> O157:H7	26
3.3 Alternativas tecnológicas aplicadas a jugos de frutas frescos para prolongar su vida útil.	27
3.4 Combinación de alternativas tecnológicas para prolongar la vida útil de jugos de frutas frescos.....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 Frutas.....	35
4.2 Microorganismos.	36
4.3 Estudio “In Vitro” para evaluar el efecto de compuestos de origen de plantas sobre <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7.....	37

4.4 Otros antimicrobianos utilizados	38
4.5 Diseño experimental.	38
4.6 Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas y en combinación con un ácido orgánico (ácido málico) y una sal (sorbato de potasio) según un diseño multifactorial contra <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 en jugos de mango y naranja clarificados y esterilizados.....	39
4.7 Estudio de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas contra <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 en jugos de mango y naranja frescos.....	42
4.8 Evaluación del efecto antimicrobiano de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico (ácido málico) y una sal (sorbato de potasio) sobre la flora nativa y características fisicoquímicas de jugos de mango y naranja frescos.....	44
4.9 Evaluación sensorial.	47
4.10 Análisis estadístico de los resultados.....	47
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1 Caracterización del mango variedad “Haden” y de la naranja variedad “Valencia”.	48
5.2 Curvas de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul.	
53	
5.3 Estudio “In Vitro” de compuestos de origen de plantas sobre <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7.	56

5.4 Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos de planta en combinación con un ácido orgánico y una sal basado en un diseño factorial de múltiples niveles contra <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 en jugos de mango y naranja clarificados y esterilizados.	61
5.4.1 Actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal en Jugo de naranja (<i>Citrus sinensis L.</i>) var. “Valencia” clarificado y esterilizado.	62
5.4.2 Actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal en Jugo de mango (<i>Mangifera indica L.</i>) var. “Haden” clarificado y esterilizado.	66
5.5 Estudio de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal contra <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 en jugos de mango y naranja frescos almacenados a 5°C por 21 días.	71
5.6 Evaluación del efecto antimicrobiano de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal sobre la flora nativa y características fisicoquímicas de jugos de mango y naranja frescos durante 21 días de almacenamiento a 5° C.	75
5.6.1 Evaluación del efecto antimicrobiano en jugos de naranja frescos.....	76
5.6.2 Evaluación del efecto antimicrobiano en jugos de mango frescos.....	82
5.7 Evaluación sensorial de jugos de mango y naranja frescos con y sin antimicrobianos añadidos.....	88
6. CONCLUSIONES	91

7. RECOMENDACIONES.....	93
8. BIBLIOGRAFÍA	94
9. ANEXO.....	99
9.1 Diseño factorial multi-nivel	99
9.2 Evaluación sensorial	100
9.2.1 Encuesta empleada	100
9.2.2 Tabla de números aleatorios para la designación de las muestras de la evaluación sensorial.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición física, química y proximal del mango (<i>Mangifera indica</i> L.).....	19
Tabla 2. Composición física, química y proximal de la naranja (<i>Citrus sinensis</i> L.)	21
Tabla 3. Caracterización del mango variedad “Haden” (<i>Mangifera indica</i> L.)	49
Tabla 4. Caracterización de la naranja variedad “Valencia” (<i>Citrus sinensis</i> L.).....	51
Tabla 5. Efecto antimicrobiano de <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Aloe vera</i> , <i>Ginseng</i> y extracto de cáscara y semilla de uvas rojas sobre <i>Salmonella entérica</i> ser. Saintpaul y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 usando el método de discos.....	57
Tabla 6. Efecto antimicrobiano de diferentes sustancias añadidas solas o combinadas determinado inmediatamente al ser añadidas (0h) y a las 72 h de almacenados a 5 °C sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. Saintpaul</i> en jugo de naranja (<i>Citrus Sinensis</i> L.) var. “Valencia” clarificado y esterilizado.	63
Tabla 7. Efecto antimicrobiano de diferentes sustancias añadidas solas o combinadas determinado inmediatamente al ser añadidas (0h) y a las 72 h de ser almacenados a 5 °C sobre <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. Saintpaul</i> en jugo de mango (<i>Mangifera indica</i> L.) var. “Haden” clarificado y esterilizado.	67
Tabla 8. Comportamiento de <i>Salmonella</i> Saintpaul y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en jugos de naranja y mango frescos tratados y no tratados con antimicrobianos y almacenados a 5°C por 21 días.	72
Tabla 9. Evolución de la flora nativa en jugos de naranja (<i>Citrus sinensis</i> L.) var. “Valencia” tratados y no tratados durante 21 días de almacenamiento a 5°C.	81

Tabla 10. Evolución de la flora nativa en jugo de mango (<i>Mangifera indica L.</i>) var. “Haden” tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C por 21 días.....	85
Tabla 11. Evaluación sensorial del jugo de mango tratado y sin tratar con antimicrobianos el mismo día de su preparación.....	89
Tabla 12. Evaluación sensorial del jugo de naranja tratado y sin tratar con antimicrobianos el mismo día de su preparación.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracterización de la pulpa de naranja (<i>Citrus sinensis</i> L) variedad “Valencia” y mango (<i>Mangifera indica</i> L.) variedad “Haden”.	35
Figura 2. Curvas de crecimiento de <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7	36
Figura 3. Actividad antimicrobiana de diferentes extractos de planta (Ginkgo biloba, Aloe vera, Ginseng, extracto de semilla y cáscara de uvas rojas) contra <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 determinada por el método de difusión de discos.	37
Figura 4. Actividad antimicrobiana del extracto de planta en combinación con un ácido orgánico y una sal basado en un diseño factorial multi-nivel contra <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 en jugos de naranja y mango clarificados y esterilizados.	41
Figura 5. Efecto antimicrobiano de una combinación de un compuesto de origen de plantas con un ácido orgánico (málico) y una sal (sorbato de potasio) contra <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul y <i>E. coli</i> O157:H7 en jugos de naranja y mango frescos almacenados por 21 días a 5 °C.	43
Figura 6. Efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos de origen de plantas sobre la microflora nativa de jugos de naranja y mango frescos.	45
Figura 7. Efecto de los compuestos de origen de plantas sobre las características fisicoquímicas de jugos de naranja y mango frescos.	46
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (a) en medio de cultivo líquido tripticasa de soya (TSB) suplementado con extracto de levadura al 0,6%, y <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul (b) en medio de cultivo TSB, ambas incubas a 37°C sin agitación.	55
Figura 9. Reducción de la población de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (a) y <i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul (b) en jugo de naranja (<i>Citrus Sinensis</i> L.) var. “Valencia”, por acción de diferentes	

sustancias antimicrobianas y sus combinaciones inmediatamente luego de ser añadidas (0h) y después de 72h de almacenamiento a 5°C..65

Figura 10. Reducción de la población de *Escherichia coli* O157:H7 (a) y *Salmonella entérica* serv. Saintpaul (b) en jugo de mango (*Mangifera indica* L.) var. “Haden”, por acción de diferentes sustancias antimicrobianas y sus combinaciones inmediatamente luego de ser añadidas (0h) y después de 72h de almacenamiento a 5°C.....69

Figura 11. Cambios en los parámetros pH (a) y acidez titulable (b), de jugo de naranja tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C por 21 días.....77

Figura 12. Cambios en los parámetros sólidos solubles (a) y color (b), en jugo de naranja tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C.79

Figura 13. Cambios en los parámetros pH (a) y acidez titulable (b), en jugo de mango tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C..83

Figura 14. Cambios en los parámetros sólidos solubles (a) y color (b), en jugo de mango tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C.85

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y hortalizas frescas y sus jugos se ha incrementado a nivel mundial, como consecuencia de una mayor promoción como parte de una dieta sana, baja en calorías, rica en vitaminas y capaz de prevenir enfermedades crónicas no transmisibles.

La tendencia actual del consumidor está orientada hacia el consumo de alimentos con mínimo procesamiento que mantengan sus características lo más semejante al producto natural, pero que sean de buena calidad nutricional y sensorial, y que además contengan la menor cantidad de aditivos o conservantes posible.

Los tratamientos térmicos tradicionales para la conservación de jugos de frutas como la pasteurización garantizan la inocuidad del producto y prolongan su vida útil, pero afectan en gran parte los atributos sensoriales del alimento, en vista de ello, las nuevas tendencias para cumplir los criterios microbiológicos se dirigen hacia la aplicación de tratamientos no térmicos que garanticen la seguridad y calidad del producto terminado.

Una de las opciones que se está estudiando para la conservación de frutas frescas cortadas y jugos es el uso de sustancias antimicrobianas naturales solas o en combinación con otros tratamientos. No obstante, la mayoría de los trabajos reportados en la bibliografía sobre el efecto de estas sustancias contra microorganismos patógenos y deteriorativos han sido realizados “in vitro”, siendo pocos los trabajos de investigación realizados aplicando directamente estas sustancias sobre frutas frescas y jugos (Raybaudi-Massilia y col. 2009 y D’Amore, 2010).

Dentro de los beneficios que se pueden obtener con el uso de sustancias antimicrobianas de origen de plantas como conservantes en jugos de frutas y hortalizas se pueden señalar: la reducción del gasto energético al no aplicar tratamientos que consumen gran cantidad de energía, como la pasteurización y la esterilización y los beneficios para la salud del consumidor que pueden aportar las sustancias antimicrobianas que se apliquen, las cuales en su mayoría son compuestos bioactivos extraídos de plantas que pueden tener actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, etc.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar la actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas sobre microorganismos patógenos como *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 “*in vitro*” y en jugos de frutas tropicales.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la efectividad antimicrobiana “*in vitro*” de distintas concentraciones de compuestos de origen de plantas contra poblaciones de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 mediante el método de difusión de discos con papel de filtro.
- Determinar mediante la aplicación de un diseño factorial de múltiples niveles la combinación ideal de un compuesto de origen de plantas más un ácido orgánico (málico) más una sal (sorbato de potasio), para controlar o reducir las poblaciones de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 inoculados en jugos de naranja y mango (esterilizados) y almacenados a 5°C por 72h.
- Estudiar el comportamiento durante 21 días de almacenamiento a 5°C de los mismos patógenos inoculados en jugos de naranja y mango frescos tratados con la combinación de sustancias antimicrobianas que haya resultado más efectiva.
- Evaluar el efecto de la combinación de sustancias antimicrobianas que haya resultado más efectiva para controlar o reducir los niveles de microorganismos patógenos, sobre la

microflora natural (aerobios mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras) de jugos de naranja y mango frescos almacenando por 21 días a 5 °C.

- Evaluar los parámetros físicos y químicos de jugos de naranja y mango tratados y no tratados con la combinación de sustancias antimicrobianas que haya resultado más efectiva para controlar o reducir los niveles de microorganismos patógenos durante 21 días de almacenamiento a 5°C.
- Realizar una prueba de evaluación sensorial afectiva de aceptación a jugos de naranja y mango tratados y no tratados con la combinación de compuestos que haya resultado más efectiva para reducir los niveles de microorganismos patógenos y controlar la microflora nativa de estos productos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de las frutas.

Las frutas son definidas por el Código Alimentario Español (CAE) como fruto, inflorescencia, semilla o partes carnosas de órganos florales que hayan alcanzado un grado adecuado de madurez y sean adecuadas al consumo humano. Estas a su vez se clasifican según su naturaleza (carnosas, secas y oleaginosas), su estado (frescas, desecadas, deshidratadas y congeladas), su calidad comercial (según reglamentación correspondiente) y según su zona geográfica de origen (zona templada, subtropical y tropical) (Aranceta y Pérez-Rodrigo, 2006).

La mayor parte de la producción mundial de frutas y hortalizas se consume en forma fresca, especialmente las hortalizas. El 30% de la fruta se procesa principalmente en forma de jugo y vino. Además, en los países desarrollados el consumo de frutas y hortalizas procesadas es alrededor de la mitad del consumo total. Las principales frutas y hortalizas que más se comercializan globalmente son los cítricos, plátano, tomate, uvas y manzanas. Otras frutas tropicales de extenso comercio mundial, son el melón, mango, papaya, aguacate y fresas (IICA, 1999).

Es oportuno recordar algunas propiedades nutricionales por las que el consumo de frutas y hortalizas es ampliamente recomendado. Estos grupos alimentarios son fuentes de diversos nutrientes indispensables para la vida humana. Las frutas carnosas aportan principalmente agua, vitaminas, minerales y fibra. Están formadas en un 80-90% por agua, y el contenido en proteínas, lípidos e hidratos de carbono es bajo, salvo algunas excepciones, el aporte energético de las frutas

no sobrepasa las 70kcal/100g, por lo que su consumo es útil en regímenes hipocalóricos (Aranceta y Pérez-Rodrigo, 2006).

Por otra parte, las frutas y hortalizas además de ser fuente de micronutrientes, constituyen una importante fuente alimentaria de fibra, lo cual las convierte en alimentos sumamente beneficiosos para prevenir y tratar enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, la obesidad y la hipercolesterolemia, entre otras (Mahan y Escott, 2001).

Entre las frutas tropicales de amplio consumo se encuentran la naranja y el mango, las cuales son excelentes fuentes de vitamina A (carotenoides), vitamina C, folato y potasio (en el caso de la naranja). El mango (*Mangifera indica L*), es un fruto drupáceo, reniforme hasta globoso, de 6-12cm de largo, con el mesocarpio carnoso y comestible; de árbol mediano o alto, de hojas alternas, subcoriáceas, lanceolado-elípticas, de ápice subagudo y base aguda. Sus flores se caracterizan por ser hermafroditas y masculinas mezcladas en la misma panícula, pétalos imbricados de color amarillento, con anteras versátiles y ovario unilocular. Es una planta de Asia Tropical, cultivada ampliamente en las regiones tropicales, en Venezuela se producen numerosas variedades, principalmente en zonas cálidas (Schnee, 1984).

Durante los meses de diciembre, enero y febrero, casi todos los cultivares florecen en Venezuela, y sus frutos se cosechan a finales de abril, mayo, junio y a comienzos de julio, dependiendo del cultivar y de las condiciones ambientales. La mayor parte de la producción de mangos se obtiene de huertos caseros, localizados a lo largo y ancho de todo el país, y propagados por semillas.

La introducción de variedades para su estudio y selección en el país se inicia en 1952, cuyos resultados han permitido las recomendaciones que satisfacen las necesidades del consumo en la mesa y la industria. Las variedades que se han destacado por sus elevados rendimientos han sido: “Keitt”, “Haden”, “Kent”, “Smith”, “Sensation” y “Zill”. Siendo la variedad “Haden” una de las más recomendadas por su producción óptima y sus buenas características organolépticas (Avilan y col., 1981).

En la tabla 1 se muestra la composición proximal del mango, donde se puede observar que se trata de una fruta con alto contenido de humedad, vitamina A, betacarotenos y ácido ascórbico.

Tabla 1. Composición física, química y proximal del mango (*Mangifera indica* L.).

Composición	Rango de valores
pH	3,9 – 4,2
Calorías	55 g.
Humedad	84,0 g.
Proteína	0,6 g.
Grasa	0,1 g.
Carbohidratos disponibles	12,8 g.
Carbohidratos Totales	14,8 g.
Fibra Dietética Total	2,0 g.
Fibra Dietética Insoluble	1,3 g.
Cenizas	0,5 g.
Calcio	10 mg.
Fósforo	13 mg.
Hierro	0,2 mg.
Vitamina A	112 mg.
β-caroteno	672 equi total
Tiamina	0,06 mg.
Riboflavina	0,06 mg.
Niacina	0,6 mg.
Vitamina B6	0
Ácido Ascórbico	45 mg.

Fuente: Adaptada del INN, 1999.

La naranja (*Citrus Sinensis*) se identifica según dos variedades, la variedad valencia y la variedad Earlies, la variedad valencia presenta la particularidad de poseer pocas semillas (o ninguna) y abundante jugo, por lo que se recomienda su empleo para la preparación de jugos. Esta fruta también es denominada naranja china, sweet orange, *Citrus sinensis L.*, probablemente es oriunda de la China, Indochina u otras regiones del sudeste de Asia. Es la más conocida y popular entre las frutas cítricas, se distingue por ser una baya de corteza suave, generalmente fina, de menos de ¼ de pulgada de espesor, de color anaranjado en su madurez, mayormente de 2 ½ - 3 ½ pulgadas de diámetro con pulpa de color anaranjado dulce o a veces ligeramente agria. Sus flores son blancas muy fragantes generalmente de 5 pétalos, hojas oblongas a elípticas u ovadas. De árbol pequeño siempre verde, de copa redonda que alcanza de 20-30 pies de altura. Se cultiva en regiones tropicales y subtropicales (Little y Marrero, 2001).

El naranjo dulce, *Citrus sinensis* Linn. Osbeek, constituye uno de los principales rubros de la citricultura venezolana siendo la variedad Valencia la más cultivada por su adaptación a climas muy variados, desde los trópicos hasta el subtropical frío. Su producción se incrementó en los últimos años debido al aumento en el mercado industrial y al consumo fresco (Avilan y Rengifo, 1987; Zambrano y col., 2001); además, el volumen de industrialización ha permitido la aparición de una serie de industrias anexas que aprovechan los subproductos de las materias primas (Zambrano y col., 2001).

La tabla 2 muestra la composición proximal de la naranja, donde se observa que igualmente es una fruta con alto contenido de humedad, betacarotenos y ácido ascórbico, pero con menor contenido de vitamina A.

Tabla 2. Composición física, química y proximal de la naranja (*Citrus sinensis* L.)

Composición	Rango de valores
Grados Brix	9
Sólidos en Suspensión	20 - 40 %
Acidez como ácido cítrico	1,8 - 3,0 %
pH	2,8 - 3,2
Calorías	35 g.
Humedad	90,1 g.
Proteínas	0,7 g.
Grasa	0,0 g.
Carbohidratos Totales	8,8 g.
Cenizas	0,4 g.
Calcio	65 mg.
Fósforo	21 mg.
Hierro	1,4 mg.
Vitamina A	7 mg.
β -caroteno	42 equi total
Tiamina	0,08 mg.
Riboflavina	0,04 mg.
Niacina	0,4 mg.
Ácido Ascórbico	45 mg.

Fuente: Adapatado del INN, 1999.

3.2 Aspectos nutricionales, de calidad e inocuidad de los jugos de frutas frescos.

Son numerosos los organismos, sociedades, gobiernos e industrias alimentarias que, a escala mundial, promueven y recomiendan un consumo diario de frutas y verduras. A modo de ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y Cinco al día Venezuela promueven un consumo mínimo de 400g de frutas y hortalizas por día, y un óptimo diario de cinco porciones de frutas o verduras, con el fin de prevenir enfermedades crónicas, en particular las cardiopatías, el cáncer, la diabetes tipo 2 y la obesidad (OMS, 2003).

Tradicionalmente, las frutas y hortalizas han sido consideradas como microbiológicamente más seguras que otros alimentos, tales como carne, leche, huevos, aves de corral, pescados y mariscos. Sin embargo, durante la última década, muchos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos reportados para humanos han sido asociados con el consumo de frutas contaminadas, vegetales y jugos de frutas no pasteurizados (Centers for Disease Control and Prevention, 1997; Parish, 1997; Deroever, 1998; Food and Drug Administration, 1998a; Corbo y col., 2005; Raybaudi-Massilia y col., 2009), posiblemente como consecuencia de una aplicación inadecuada de las buenas prácticas de agricultura y manufactura o malas condiciones de almacenamiento. Específicamente algunos brotes de *Salmonella* (ser. Saintpaul, Typhimurium, Newport, Muenchen, Enteritidis, entre otros) y *E. coli* O157:H7 asociados al consumo de jugos frescos de naranja y mango, así como también con frutas frescas cortadas han sido reportados (Raybaudi-Massilia y col., 2009).

Estas asociaciones de ETA's posiblemente son un efecto del cambio que ha ocurrido en los hábitos alimenticios del consumidor quien ha incrementado la ingesta de este tipo de productos como consecuencia de una mayor promoción del consumo de frutas y vegetales como parte de una dieta sana (Corbo y col., 2000:2005; Pelayo, 2003; Hanf y Gonder, 2005; Rico y col., 2007), además de ser bajas en calorías, ricas en micronutrientes, y de fácil preparación.

Venezuela, por sus condiciones geográficas, tiene un enorme potencial de producción de frutas, siendo actualmente importante, pero muy diseminada por todo el país. Las limitantes más relevantes a considerar para incrementar el consumo fresco y/o el procesamiento de las frutas en el país, básicamente radican en la estacionalidad de la producción y su carácter perecedero. Una

forma parcial de remediar esta situación es la de procesar localmente mediante métodos físicos, enzimáticos y/o combinados ese excedente que no se consume fresco en jugos (zumos), néctares concentrados y pulpas, utilizada mayormente por las industrias procesadoras (FAO, 2004).

Según La Norma COVENIN 1030 (1995) jugo es el producto líquido fermentable, pero no fermentado, obtenido por procedimientos mecánicos y/o enzimáticos, a partir de las frutas y/o vegetales maduros, sanos y limpios, con color, aroma y sabor típicos de la fruta y/o vegetal del que procede.

La calidad de los jugos de frutas frescos no sólo depende del valor nutricional, sino también de sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, las cuales se ven afectadas durante las operaciones de procesamiento mínimas de las frutas, alterándose su integridad física y haciéndose más perecederas que la materia prima original, disminuyendo su resistencia a la contaminación microbiana y afectando sus características organolépticas (Corbo y col., 2006).

La seguridad alimentaria de los jugos cítricos frescos sin pasteurizar se basa principalmente en el proceso de sanitización de la corteza de las frutas y el pH del jugo, el cual suele encontrarse en el intervalo de 2,8 a 4,0 (Banwart, 1989; Pao y col., 1998), valores de pH que impiden en gran parte la proliferación bacteriana. No obstante, brotes causados por *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 han estado asociados con el consumo de frutas y jugos frescos de mango, naranja y otras frutas (CDC, 2007; Raybaudi-Massilia, 2009), lo que significa que el riesgo para el consumidor puede persistir. La mayoría de esos brotes han estado relacionados a la presencia de estos patógenos en la corteza de la fruta, contaminada presumiblemente en el campo por fertilizantes aplicados inadecuadamente, irrigación con aguas contaminadas o a través de

trabajadores infectados (Harris y col., 2003). De este modo, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 han sido transferidos a los tejidos comestibles y jugos cuando las frutas fueron cortadas durante su procesamiento (Ukuku y Sapers, 2001), viéndose favorecida la supervivencia y posible crecimiento de ambos microorganismos gracias a la disponibilidad de nutrientes en la pulpa de la fruta. Esto demuestra como una higiene inadecuada en su procesamiento en combinación con un alto pH del jugo (3.09 a 4.03), podrían ser las causas de un brote por consumo de jugos de frutas (Parish, 1996; Pao y col., 1998).

Son pocos los estudios de incidencia de microorganismos patógenos en frutas frescas cortadas y jugos (Harris y col., 2003), no obstante, esto no significa que ellos no puedan crecer en este tipo de productos, de hecho distintos brotes de enfermedades por consumo de frutas frescas cortadas, jugos y sidra de manzana han sido reportados, además hay diferentes estudios de supervivencia y crecimiento que demuestran que distintos tipos de patógenos como *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter jejuni*, etc han logrado sobrevivir y hasta crecer en este tipo de alimentos (Raybaudi-Massilia y col., 2009). En Venezuela se han realizado algunos trabajos de investigación en jugos de frutas y pulpas como son el de Mosqueda (2003) y Ojeda (2003) quienes evaluaron la incidencia de *Salmonella* en jugos de naranja y pulpas de lechosa y guayaba sin pasteurizar, demostraron la ausencia del microorganismo. Sin embargo, reportaron la presencia de coliformes fecales y *E. coli* en jugo de naranja y pulpa de guayaba, indicando que las condiciones sanitarias bajo las cuales se elaboraron los jugos pudieron haber sido la causa de su presencia en los productos, ya que esta flora es característica del tracto gastrointestinal de animales y humanos, lo que sugiere que una contaminación de origen fecal ocurrió en algún momento del procesamiento.

Considerando la frecuencia de los brotes asociados con sidra de manzana y la severidad de la enfermedad causada por tales sidras, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) concluyó recientemente que existe un alto riesgo de contraer enfermedades por consumo de productos que no han sido procesados de manera adecuada para destruir microorganismos patógenos, incluyendo *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Spp. Por lo tanto la FDA en 1998 publicó algunas regulaciones exigiendo una advertencia en los empaques de los jugos no procesados, indicando que ese producto no ha sido pasteurizado y por lo tanto puede contener bacterias que pueden causar enfermedades severas en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas (Food and Drug Administration, 1998b ; Uljas y Ingham, 1999).

3.2.1 Características principales de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7.

3.2.1.1 *Salmonella*

- a) **Morfología:** bacilos de tamaño pequeño Gram-negativos. Generalmente son móviles por cilios peritrichos y no formadores de esporas. Las colonias tienen un diámetro de entre 2 a 4 mm. (Jay, 2000).
- b) **Propiedades metabólicas:** Son aerobios anaerobios facultativos. Crecen entre un rango de temperatura de 7 a $\leq 54^{\circ}\text{C}$; con un óptimo de 35 – 37 $^{\circ}\text{C}$; con propiedades psicrótroficas de crecimiento de 2 a 4 $^{\circ}\text{C}$. Crecen entre un rango de pH de 4,5 a 9,5 con un pH óptimo de crecimiento 6,5 – 7,5; y con una actividad de agua (a_w) mínima de 0,93 (Doyle, Beuchat, y Montville, 1997).

- c) **Resistencia:** Algunas cepas pueden crecer bajo condiciones de refrigeración. Igualmente toleran condiciones de baja humedad relativa, debido a la presencia de proteínas que actúan como componentes protectores. Son fácilmente destruidas por calor (a temperatura de pasteurización de la leche) (Jay, 2000) y son muy sensibles a ciertos ácidos como es el caso del acético, propiónico y butírico ($\text{pH} < 4$). No toleran concentraciones salinas moderadas (2 – 8% NaCl).
- d) **Actividad bioquímica:** Son capaces de producir sulfuro de hidrógeno detectable en Agar triple azúcar hierro, Agar hierro lisina y ornitina. Reduce nitratos a nitritos. Son ureasa negativa e indol negativo. No desaminan el aminoácido fenilalanina y triptófano. Son oxidasa negativo y fermentan glucosa con producción de ácido o ácido y gas. No fermentan lactosa.

3.2.1.2 *E. coli* O157:H7

- a) **Morfología:** *E. coli* pertenece al grupo heterogéneo de la familia Enterobacteriaceae; se caracteriza por ser una bacteria Gram negativa que forman colonias bien aisladas con 2 a 3 mm de diámetros circulares y lisas con bordes definidos. Son móviles por flagelos peritrichos y no son formadores de esporas.
- b) **Propiedades metabólicas:** Es un microorganismo aerobio facultativo; su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, incapaz de crecer adecuadamente a temperaturas de 44,5°C como lo pueden hacer el resto de las *E. coli* y produce β -glucuronidasa (enzima que le permite hidrolizar compuestos fluorogénicos). Se caracteriza por ser ácido-tolerante, es decir, sobrevivir a $\text{pH} < 4$ (Doyle, Beuchat, y Montville, 1997)

- c) **Actividad bioquímica:** Fermenta una gran variedad de azúcares, tales como arabinosa, manitol, glucosa, lactosa, ramnosa, maltosa y xilosa, formando ácidos y gas a partir de ellos. Produce indol a partir del triptófano. No produce sulfuro de hidrógeno, no utiliza citrato como única fuente de carbono y el microorganismo no crece en presencia de KCN. Otras pruebas características son las siguientes: reacción rojo metilo es positiva. La prueba Voges-Proskauer es negativa, la ureasa y fenilalina deaminasa está ausente y es catalasa positiva (Jay, 1992).
- d) **Resistencia:** Es relativamente resistente a las condiciones ambientales, permaneciendo viva algún tiempo fuera del organismo, en especial en condiciones húmedas y en aguas contaminadas. Es destruida por el calor a 60 °C durante una hora (Jay, 1992).

3.3 Alternativas tecnológicas aplicadas a jugos de frutas frescos para prolongar su vida útil.

La conservación constituye una faceta fundamental de la ciencia y tecnología actual de los alimentos y es sin duda el principal objetivo de dicha disciplina. Con ella se pretende alimentar a grandes poblaciones durante todo el año, con recursos alimenticios disponibles estacionalmente en épocas de cosecha o producción, permitiendo el almacenamiento de reservas esenciales para garantizar la alimentación de la humanidad en épocas de escasez y, por consiguiente, el mantenimiento de nuestra civilización con todas las complejidades e interdependencias existentes en ella (Barreiro y Sandoval, 2006).

En la preservación de alimentos intervienen uno o más de los siguientes principios; la prevención o retraso del crecimiento microbiano, prevención o retraso de la autodescomposición de los alimentos, y la prevención de alteraciones ocasionadas por insectos, animales superiores o por factores físicos (Planella-Villagra, 1983).

En cada método de preservación sobresale un elemento que lo hace característico, de este modo se pueden clasificar en: uso de altas temperaturas, uso de bajas temperaturas, deshidratación, concentración, empleo de conservadores químicos, fermentaciones y radiaciones ionizantes (Planella-Villagra, 1983). Entre las nuevas tecnologías de conservación de alimentos podemos mencionar los tratamientos no térmicos como las altas presiones hidrostáticas, las atmósferas modificadas, la irradiación con rayos gama y la aplicación de pulsos eléctricos.

Tradicionalmente los tratamientos térmicos de altas temperaturas han sido aplicados en la conservación de los jugos de frutas, principalmente la pasteurización, la esterilización comercial, y la esterilización *UHT*. La pasteurización hace referencia a tratamientos térmicos de baja intensidad, en los que la aplicación de calor poco drástica solo conduce a una destrucción selectiva de la población microbiana presente en el alimento. Tanto la temperatura como el tiempo necesario para un tratamiento eficaz están condicionados por la garantía de no provocar cambios en la composición química del alimento (Bello, 2005). En productos de pH ácidos como son los jugos cítricos, vinos, cervezas, etc., su objetivo se centra en prologar su vida útil al ejercer una acción deletérea frente a microorganismos y enzimas con temperaturas no mayores a 88°C (Bello, 2000).

La esterilización comercial permite una conservación a más largo plazo, porque aplica tratamientos que destruyen no solo las formas vegetativas de los microorganismos presentes, sino también casi la totalidad de las esporas termoresistentes. Se trata de una operación a realizar con alimentos introducidos en recipientes cerrados, que posteriormente se someten a los efectos del calor proporcionado por un autoclave con temperaturas superiores a los 100°C (Bello, 2000).

Una de las tecnologías más nuevas que permite llevar a cabo la esterilización actuando sobre el propio alimento sin envasar es el proceso térmico denominado *UHT*, mediante la aplicación de temperaturas más elevadas (130-140°C), durante períodos de tiempos muy cortos (1-2 segundos); de este modo, se logra destruir los microorganismos sin que apenas se vean afectadas las características químicas del producto, pero es necesario que el producto se mantenga bajo condiciones asépticas hasta su envasado hermético definitivo, una vez alcanzada la esterilización (Bello, 2005).

La refrigeración también ha sido comúnmente usada como método de conservación, especialmente en conjunto con la pasteurización, empleada como tecnología de conservación a corto plazo, basada en el poder estabilizador del frío frente a las reacciones enzimáticas y al desarrollo microbiano. El alimento debe ser mantenido a temperaturas positivas, pero próximas a 0°C; la duración de su vida útil dependerá tanto de la naturaleza del alimento, como del envase empleado (Bello, 2005).

Por otra parte, los conservadores químicos también son empleados comúnmente en la conservación de jugos de frutas, éstos actúan, ya sea por el bloqueo del proceso metabólico celular o por el “acaparamiento” del agua disponible. Este método solo se usa como coadyuvante

de otros, ya que exigiría el uso de altas concentraciones del conservador (Planella-Villagra, 1983). El empleo de ácido benzóico y sus sales suele ser aplicado en sidra de manzana y bebidas refrescantes; el ácido sórbico y sus sales en higos; los sulfitos en frutos secos, vinos, jugo de limón, entre otros (Jay, 2000).

En combinación con el ácido benzóico, el ácido sórbico y sus sales; suelen emplearse los ácidos orgánicos. Éstos compuestos contienen uno o más grupos carboxilos y son intermediarios o productos terminales de ciclos metabólicos básicos. Tales compuestos incluyen los ácidos cítrico, málico, láctico, acético, tartárico, fumárico y glucónico.

La incorporación de ácidos en alimentos cumple diversas funciones dependiendo de la aplicación particular. Tales aplicaciones se inscriben en la explotación de una o varias de las siguientes propiedades de los ácidos orgánicos, o sus sales: 1) poder acidulante, 2) capacidad amortiguadora o reguladora del pH, 3) agente quelante de iones metálicos, 4) emulsificante, 5) efectos organolépticos. El principal uso es la acidificación y control del pH en el producto final. Un pH bajo, retarda el crecimiento microbiano y aumenta la efectividad de conservadores como benzoatos y sorbatos. Además, reduce la necesidad de tratamientos térmicos drásticos durante la esterilización de frutas y verduras enlatadas, y promueve la inactivación de enzimas indeseables como polifenoloxidasas (López y col., 2004).

3.4 Combinación de alternativas tecnológicas para prolongar la vida útil de jugos de frutas frescos.

Diferentes tecnologías han sido aplicadas para la conservación de frutas frescas cortadas y jugos, tales como el uso de la refrigeración, tratamientos por calor como la pasteurización y otras novedosas como el uso de atmosferas modificadas, altas presiones, pulsos eléctricos, etc. Sin embargo la tendencia del consumidor es adquirir productos con mínimo procesamiento y con pocos aditivos añadidos y de estar presentes que preferiblemente sean de origen natural.

Una de las alternativas actuales para garantizar la calidad e inocuidad de jugos de frutas es el uso solo o combinado de sustancias antimicrobianas naturales con otros tratamientos no térmicos (Iu y col., 2001; Yuste y Fung, 2002; Liang y col., 2002; Ceylan y col., 2004; Friedman y col., 2004; Raybaudi-Massilia y col., 2006; 2009; Mosqueda-Melgar y col., 2008a; 2008b; 2008c).

Los antimicrobianos naturales son compuestos químicos naturalmente presentes en los alimentos o añadidos a estos con un fin específico; suelen emplearse para retardar el crecimiento o causar la muerte de los microorganismos. Estas sustancias antimicrobianas pueden ser de origen de plantas (aceites esenciales, aldehídos, ésteres, ácidos orgánicos y otros extractos de plantas), animales (enzimas, polisacáridos) o microbiano (bacteriocinas, ácidos orgánicos). Generalmente, las sustancias antimicrobianas tienen diferentes umbrales de concentración para inhibir o inactivar microorganismos. Estos umbrales dependerán de los blancos de acción específicos de la sustancia antimicrobiana, las cuales pueden incluir: pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y material genético, entre otros (Raybaudi-

Massilia, 2007). Además, su acción dependerá de los factores microbianos (resistencia intrínseca, carga inicial, velocidad de crecimiento, tipo de microorganismo, competitividad, condición celular, etc.) así como también de los factores intrínsecos (composición, pH, capacidad buffer, potencial óxido-reducción y actividad de agua), extrínsecos (temperatura, tiempo de almacenamiento, atmósfera y humedad relativa) y de procesamiento de los alimentos (cambios en la composición de los alimentos, alteración de la microflora, cambios de la carga microbiana y microestructura) (Davidson, 1997).

Algunos antimicrobianos de origen de plantas se obtienen principalmente de hierbas, plantas, y especias. Lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dichos antimicrobianos al alimento sin afectar su calidad sensorial y seguridad (Beuchat y Golden, 1989).

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales, los cuales provienen de cortezas, tallos, hojas, y flores. Además la actividad antimicrobiana también es atribuida a ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001).

Estudios *in Vitro* han demostrado que el uso de compuestos de origen de plantas como *Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, *Ginseng* y extracto de semilla y cáscara de uva tienen efectos antimicrobianos sobre microorganismos patógenos y deteriorativos que pueden estar presentes en frutas y sus derivados (Xie y col., 2003; Jayaprakasha y col., 2003; Ahn y col., 2004; Tan y Vanitha, 2004; Rhodes y col., 2006; Theivendran y col., 2006; Rosca-Casian y col., 2007); sin embargo, su efecto sobre microorganismos en jugos de frutas frescos no ha sido estudiado.

Así tenemos que el *Ginseng* inhibe el crecimiento *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., y retarda considerablemente el desarrollo y crecimiento de *Aspergillus* sp. en concentraciones de 500.0 µg/mL (Xu y col., 2009). El *Ginseng* extraído de la raíz de la planta *Panax ginseng* presenta componentes activos como el faltarinol, un pesticida natural, y agente anticancerígeno. Además se ha demostrado que polisacáridos ácidos (panaxadiol y panaxatriol) aislados de *Panax ginseng* inhiben a *Helicobacter pylori* por inducción de aglutinación, posiblemente debido a la presencia de ácido urónico, un importante componente del polisacárido ácido, así como otros polisacáridos que disminuyen la concentración de *S. aureus* en el plasma por mayor activación de macrófagos (Than y Vanitha, 2004).

Estudios realizados por Rosca-Casian y col. (2007) indican que el extracto hidroalcohólico obtenido a partir de hojas frescas de *Aloe vera* poseen actividad fungicida sobre el crecimiento del micelio de hongos patógenos en plantas ornamentales. Por otra parte, aislados de *A. vera* han demostrado inhibir microorganismos como *Staphylococcus* spp. y *Candida* spp. (Than y Vanitha, 2004).

Por otra parte, se ha demostrado que el extracto de hojas del árbol de *Gingko biloba* en combinación con EDTA genera efectos sinérgicos en la inhibición de *L. monocytogenes*, por lo tanto la combinación de estos compuestos pueden tener un uso potencial en alimentos (Xie y col. 2003). Además, un compuesto extraído con acetona a partir de las hojas de *Gingko biloba* ha demostrado ser activa contra *Erwinia amylovora*, *E. coli*, *Pseudomonas phaseolítica*, *Xantomonas phaseoli* y *Bacillus pumilus*. El aldehído 2-hexanol demostró una actividad antifúngica en concentraciones muy bajas. Este compuesto no está normalmente presente en cantidades

detectable en las hojas intactas de *Gingko biloba*, pero este es obtenido al macerar las hojas en presencia de oxígeno (Mazzanti y col., 2000).

Karapinar y col. (2006) aplicó jugo puro de uvas rojas en ensaladas de vegetales inoculadas con *Salmonella typhimurium* obteniendo una reducción de 1-1,5 ciclos logarítmicos de la población de microorganismos.

Estudios realizados por Fernandes y col. (2007), en la ingestión de vino durante una comida, señalan que puede disminuir la cantidad de *Listeria innocua* en el tracto digestivo, este efecto es menor que al emplear una combinación de etanol y ácidos orgánicos como el málico y el láctico, los cuales presentan un efecto sinérgico pero menor que al emplear vino.

4.2 Microorganismos.

Cepas de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 provenientes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) se utilizaron para los estudios de actividad antimicrobiana “*in vitro*” (por el método de difusión con discos) y en jugos de frutas tropicales (mango y naranja). Para esto, cultivos puros de estos microorganismos se cultivaron en caldo tripticasa soya (Himedia, Mubai, India) (con extracto de levadura al 0,6% para *E. coli* O157:H7) a 37°C hasta obtenerlos en fase estacionaria temprana de crecimiento (determinada mediante curvas de crecimiento) (ver Figura 2).

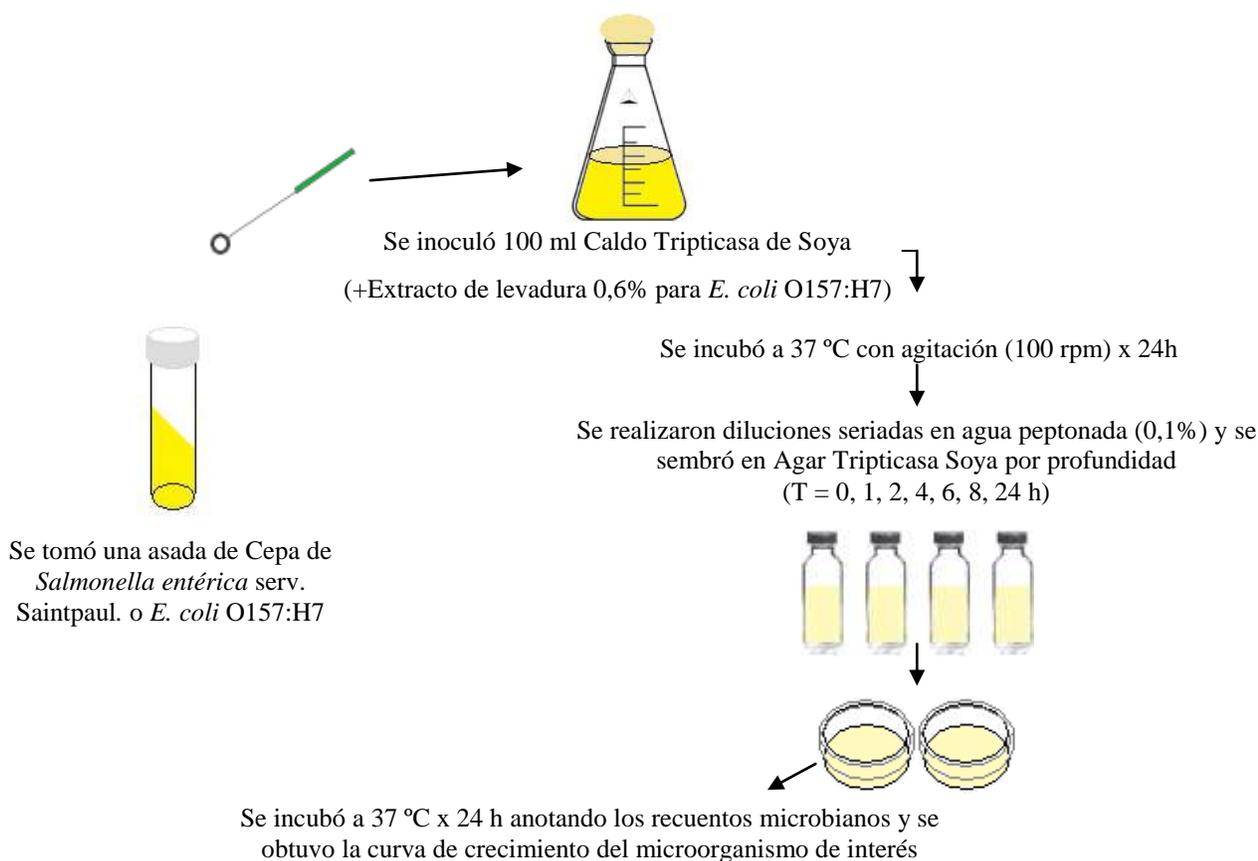


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7.

4.3 Estudio “In Vitro” para evaluar el efecto de compuestos de origen de plantas sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7.

La actividad antimicrobiana de diferentes compuestos de origen de plantas como *Ginkgo biloba* (Laboratorios Arcoiris, Venezuela), *Aloe vera* (Laboratorios Arcoiris, Venezuela), *Ginseng* (Laboratorios Arcoiris, Venezuela), extracto de semillas y cáscaras de uvas rojas (Medifarm, Italia) añadidas al 0, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3% (p/v), se estudió mediante el método de difusión con discos de papel de filtro reportado por Davidson y Parish (1989) (ver Figura 3).

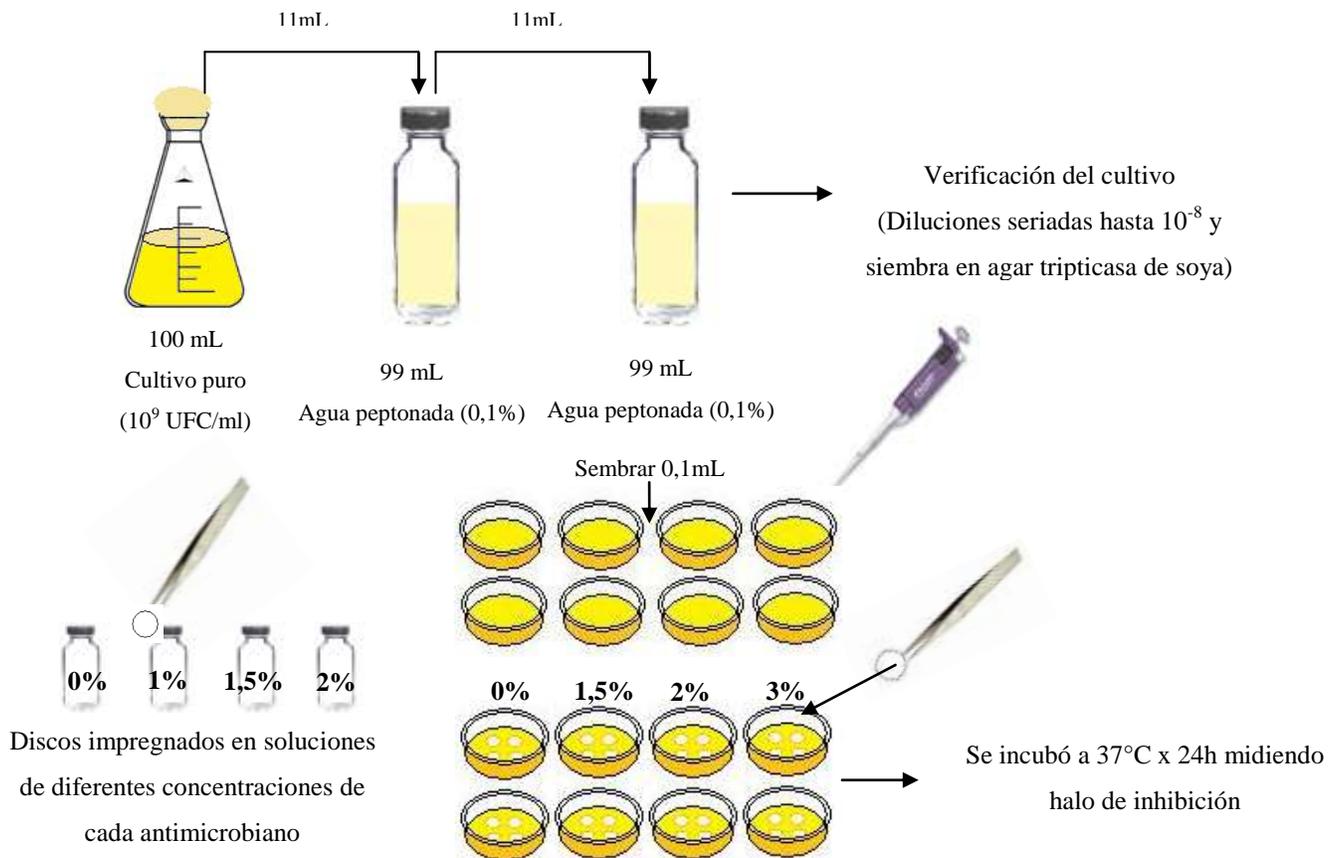


Figura 3. Actividad antimicrobiana de diferentes extractos de planta (*Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, *Ginseng*, extracto de semilla y cáscara de uvas rojas) contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 determinada por el método de difusión de discos.

Soluciones fueron preparadas a partir de los compuestos indicados en diferentes concentraciones y esterilizadas por filtración. En dichas soluciones se impregnaron discos de papel de filtro de 1 cm de diámetro y se colocaron en placas de agar Mueller-Hinton individualmente inoculadas con cultivos puros de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en un nivel de 10^7 UFC/ml. Las placas fueron incubadas a 35 – 37 °C por 24 horas. A continuación se determinaron y midieron los halos de inhibición para luego comparar los resultados a fin de obtener cual de las concentraciones de esas sustancias evaluadas son más efectivas para inhibir el crecimiento de los patógenos señalados.

4.4 Otros antimicrobianos utilizados

Sorbato de potasio (Scharlau Chemie, Unión Europea) en concentraciones de 0 y 0,05% y ácido málico (Scharlau Chemie, Unión Europea) en concentraciones de (0%, 0,5%) fueron también considerados como antimicrobianos para ser incorporados en combinación con el antimicrobiano de origen de plantas que resultara más efectivo.

4.5 Diseño experimental.

Un diseño experimental de tipo “factorial Multi-nivel” 2 x 2 x 2 x 2 (2 concentraciones de ácido orgánico (0 y 0,5%) x 2 concentraciones de sal (0 y 0,05%) x 2 concentraciones de compuesto natural (0 y 2% de ginseng) x 2 repeticiones) fue aplicado utilizando el paquete

estadísticos Statgraphics Plus 5.1. Con la finalidad de comparar el efecto de concentraciones de ácido málico, sorbato de potasio en combinación con el antimicrobiano de origen de plantas seleccionado (ginseng) sobre la inactivación de microorganismos patógenos tales como *S. Saintpaul* y *E. coli* O157:H7 y sobre microorganismos deteriorativos en jugos de frutas tropicales clarificados (mango y naranja individualmente) refrigerados. El diseño consistió en 16 corridas. El orden de los tratamientos fue realizado de manera aleatoria para el estudio de las variables.

4.6 Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas y en combinación con un ácido orgánico (ácido málico) y una sal (sorbato de potasio) según un diseño multifactorial contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en jugos de mango y naranja clarificados y esterilizados.

El compuesto de origen de plantas que resultó más efectivo y la concentración óptima de éste, seleccionados previamente por el método de difusión en discos fue el *Ginseng* al 2%. Ésta concentración fue empleada en combinación con otros compuestos como un ácido orgánico y una sal como agentes antimicrobianos para el siguiente ensayo:

Frutas de madurez intermedia fueron lavadas, peladas, cortadas y trituradas o exprimidas para obtener los jugos. Seguidamente los jugos fueron centrifugados y esterilizados a 121°C x 15 minutos (para eliminar la microflora nativa de los jugos). A continuación combinaciones de diferentes concentraciones del compuesto de origen de plantas (*Ginseng*) al 0% y concentración óptima (2%), con un ácido orgánico (málico) al 0 y 0.5% y una sal (sorbato de potasio) al 0 y

0.05% p/v fueron añadidas a 50 mL de jugo estéril en frascos. Para estudiar todas las combinaciones de compuestos posibles se empleo un diseño factorial de multiples niveles señalado anteriormente (ver anexo). Los frascos posteriormente fueron inoculados individualmente con 0,5 mL de cultivos puros de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul o *E. coli* O157:H7 en fase estacionaria temprana de crecimiento en un nivel de 10^9 UFC/mL, finalmente incubados a 5°C por 72 horas.

El efecto de las sustancias fue verificado realizando siembras a las 0 y 72 horas de incubación, a partir de la muestra y sus diluciones seriadas por profundidad en agar tripticasa soya (ver Figura 4).

A partir del análisis estadístico del diseño aplicado se seleccionó la combinación ideal de compuestos para utilizarla en los siguientes experimentos.

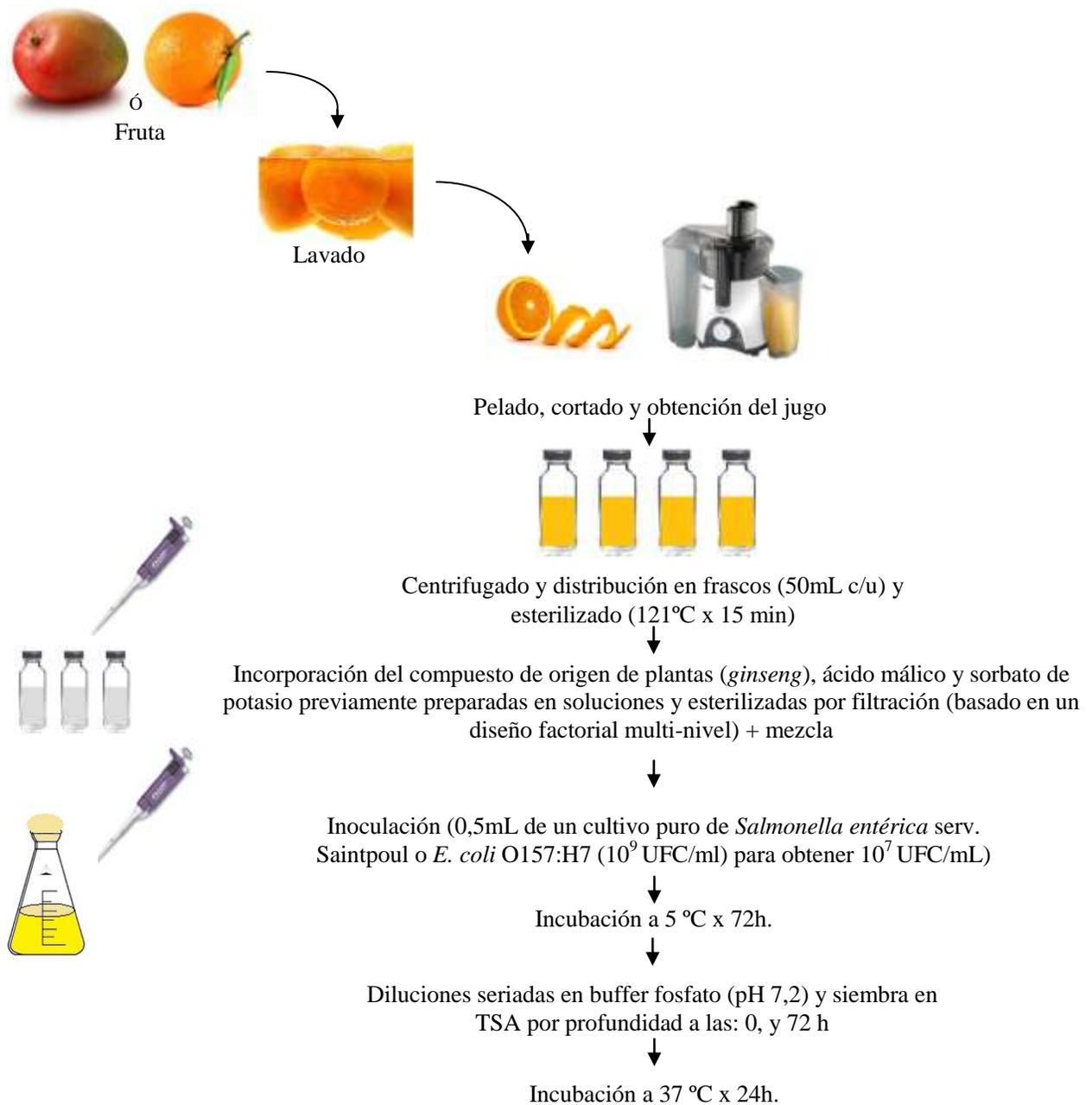


Figura 4. Actividad antimicrobiana del extracto de planta en combinación con un ácido orgánico y una sal basado en un diseño factorial multi-nivel contra *Salmonella entérica serv. Saintpoul* y *E. coli O157:H7* en jugos de naranja y mango clarificados y esterilizados.

4.7 Estudio de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en jugos de mango y naranja frescos.

La combinación de los compuestos estudiados que de acuerdo al diseño factorial de múltiples niveles resultó más efectiva para reducir los niveles de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 (0.5% de ácido málico + 0,05% de sorbato de potasio + 2% de *Ginseng*), fue la empleada en este experimento.

Frascos con 50 mL de jugo de naranja o mango fresco, clarificados y tratados con la combinación de compuestos que resultó ideal en el experimento anterior fueron inoculados individualmente con 0,5 mL de cultivos puros de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en un nivel de 10^9 UFC/ml y finalmente incubados a 5°C por 21 días junto con controles de jugos (sin compuestos añadidos). Siembras por diseminación en superficie en agares selectivos (Hektoen y MacConkey sorbitol) se efectuaron a los 0, 1, 3, 7, 14, 18, 21 días de almacenamiento en refrigeración (5 °C). Las placas fueron incubadas a 35 – 37°C por 24 horas (ver Figura 5).

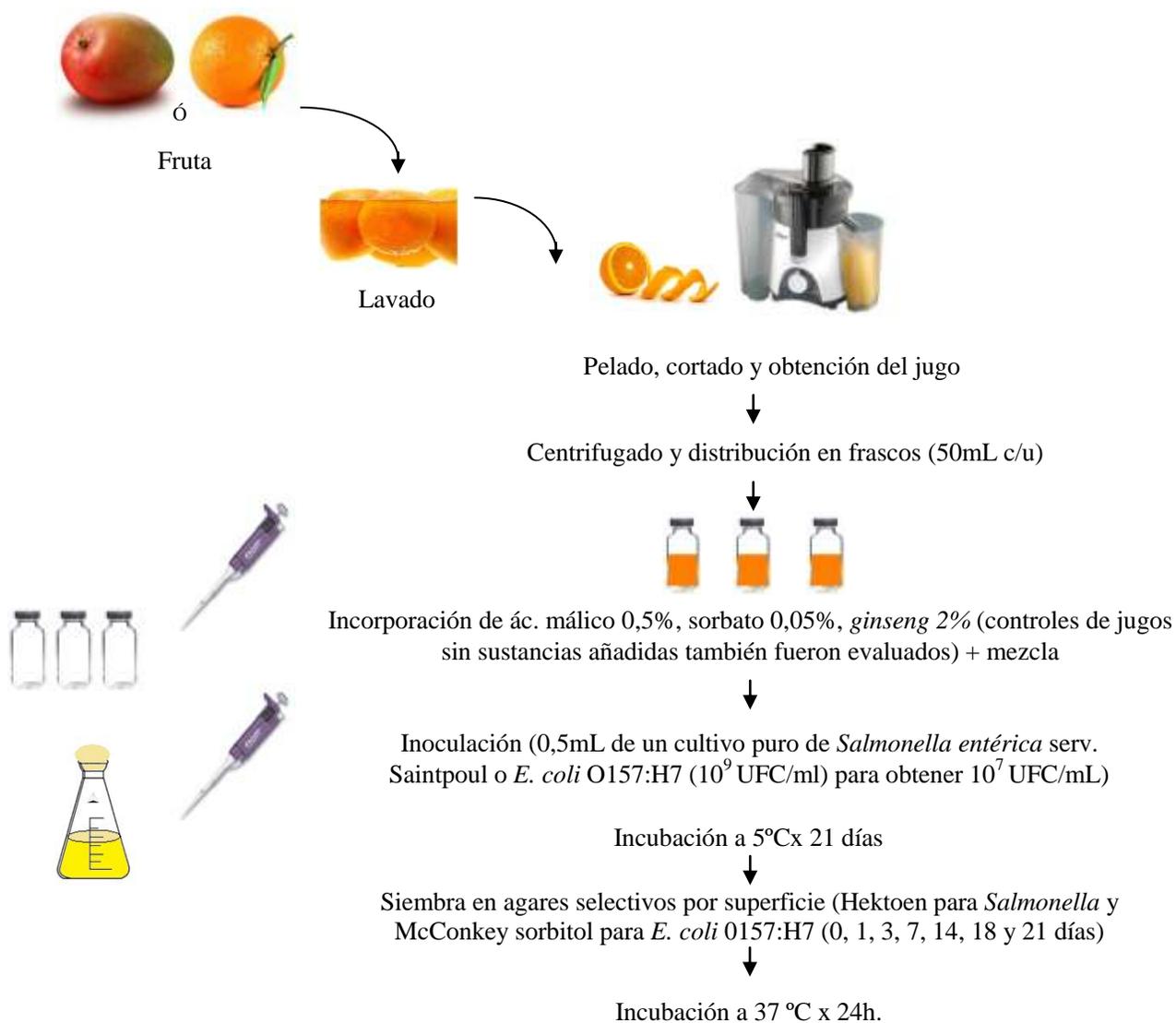


Figura 5. Efecto antimicrobiano de una combinación de un compuesto de origen de plantas con un ácido orgánico (málico) y una sal (sorbato de potasio) contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en jugos de naranja y mango frescos almacenados por 21 días a 5 °C.

4.8 Evaluación del efecto antimicrobiano de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico (ácido málico) y una sal (sorbato de potasio) sobre la flora nativa y características fisicoquímicas de jugos de mango y naranja frescos.

Finalmente se estudió el efecto de las sustancias seleccionadas sobre la flora nativa y características fisicoquímicas de los jugos frescos. Para ello, se prepararon frascos con 50 mL de jugos de naranja o mango con mínimo proceso (clarificados), luego se añadió la combinación sustancias que resultó ideal para reducir los niveles de patógenos estudiados y se incubaron por 21 días a 5°C.

A continuación para evaluar el efecto sobre la flora nativa se sembró por superficie y profundidad en agares Cloranfenicol Glucosa (CGA) y Plate Count (PCA) para hongos y microorganismos psicrófilos/mesófilos, respectivamente, a los 0, 1, 3, 7, 14, 18 y 21 días de almacenamiento. Las placas de CGA se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) por 3-5 días, las placas para mesófilos (PCA) se incubaron a 30 – 35 °C por 24 – 48 horas, y las placas para psicrófilos se incubaron a 5-7°C por 10 – 14 días (ver Figura 6). A su vez a los 0, 1, 3, 7, 14, 18 y 21 días de almacenamiento se determinó pH, acidez titulable, color y sólidos solubles (ver Figura 7).

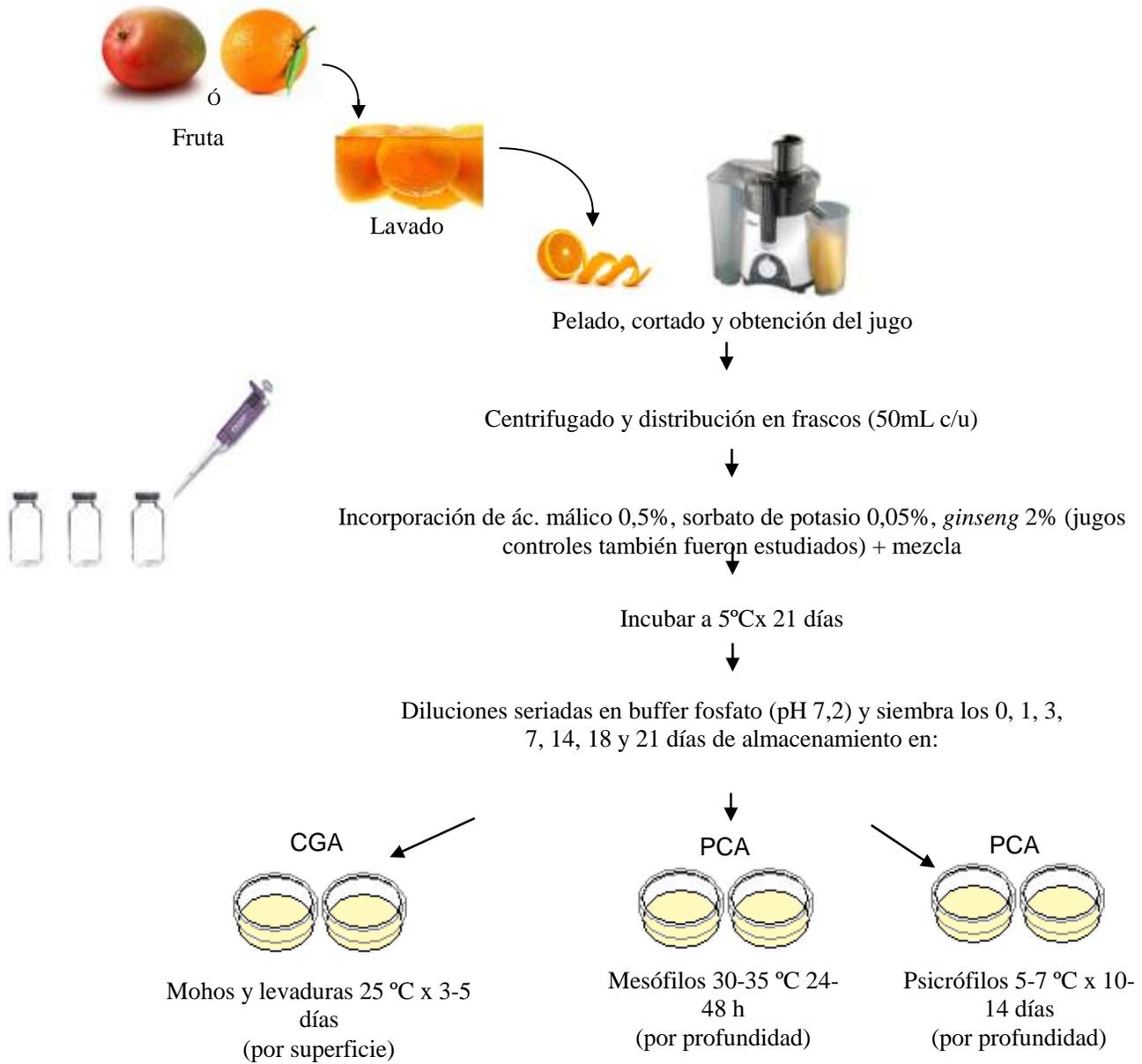


Figura 6. Efecto antimicrobiano de la combinación de compuestos de origen de plantas sobre la microflora nativa de jugos de naranja y mango frescos.

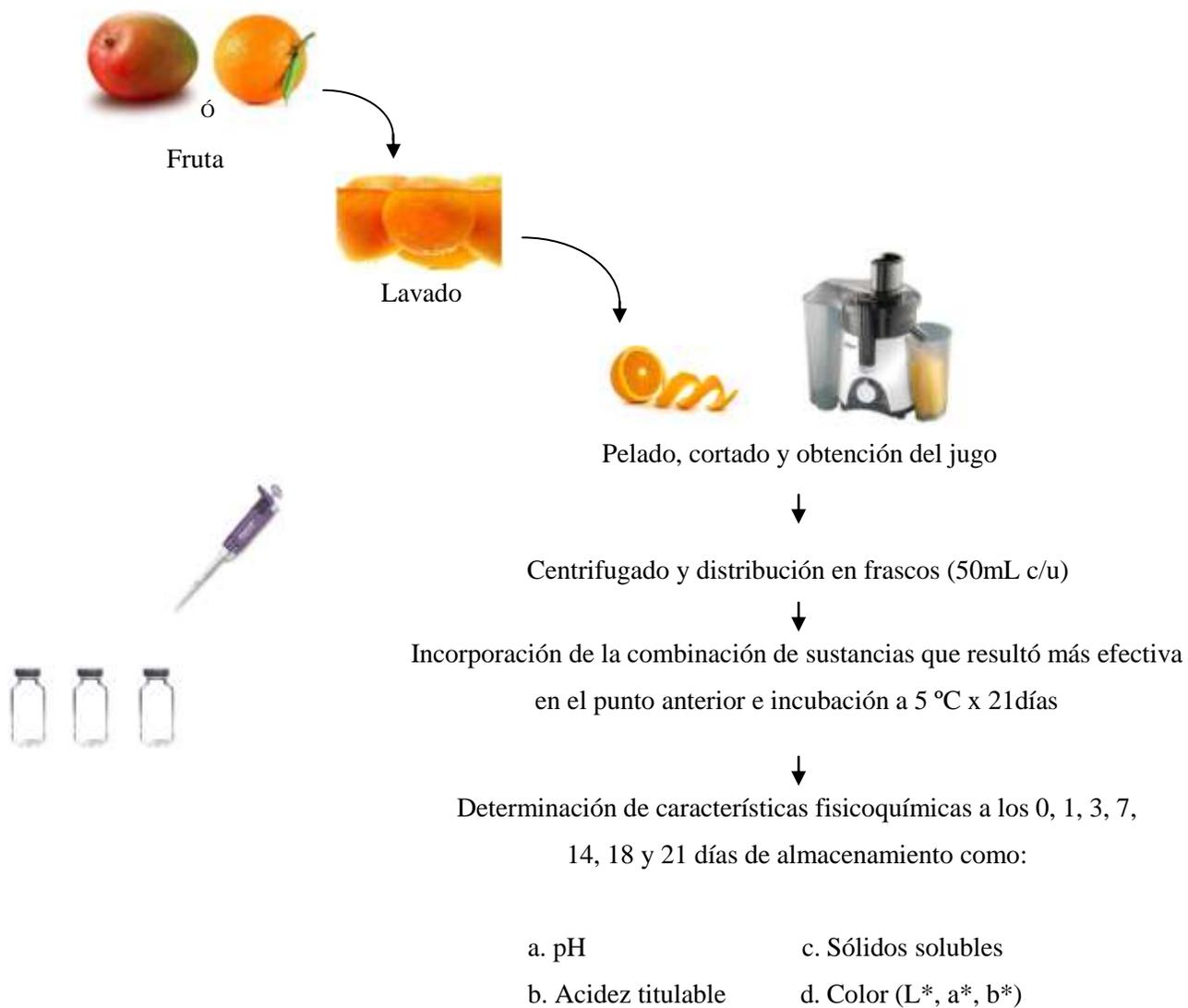


Figura 7. Efecto de los compuestos de origen de plantas sobre las características fisicoquímicas de jugos de naranja y mango frescos.

4.9 Evaluación sensorial.

Jugos de mango y naranja tratados con la combinación que resultó ideal, preparadas el mismo día, fueron utilizados para realizar una prueba de evaluación sensorial afectiva de aceptación, empleando una escala hedónica del 1 (me disgusta mucho) al 9 (me gusta mucho) con un panel piloto de consumidores de 30 personas no entrenadas, en una edad comprendida entre 20 y 60 años, de diferentes estratos socioeconómicos como sugerida por Watts y col. (1992).

4.10 Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos fueron analizados manejando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 y considerando el diseño factorial de múltiples niveles (2x2x2x2) donde se aplicaron combinaciones de tratamientos para cada microorganismo (*Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7).

Por otra parte los resultados obtenidos para parámetros físicos, químicos, microbiológicos y sensoriales fueron analizados aplicando un análisis de varianza de una vía ANOVA para determinar diferencias estadísticas entre muestras tratadas y control y a lo largo del tiempo de almacenamiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del mango variedad “Haden” y de la naranja variedad “Valencia”.

El estudio de los parámetros físicos y químicos se realizó en tres niveles de maduración del fruto, verde, intermedio, y maduro, con la finalidad de seleccionar la madurez apropiada para los siguientes estudios.

Al separar las frutas y hortalizas de sus plantas originarias, sus tejidos experimentan una interrupción en el suministro normal de agua, minerales y, en algunas ocasiones, de productos orgánicos simples del metabolismo. Sin embargo los tejidos continúan siendo capaces de llevar a cabo una gran variedad de transformaciones metabólicas, disminuyendo su calidad ó resultando esencial para lograr el grado de maduración apto para el consumo (IICA, 1987). El grado de madurez del fruto puede determinarse durante la maduración teniendo en cuenta los índices señalados en la Tabla 3 y 4, dónde se muestran los resultados de pH, sólidos solubles, acidez titulable, color y firmeza realizados en mango (*Mangifera indica* L.) y naranja (*Citrus sinensis* L.) respectivamente.

La maduración se caracteriza por una serie de transformaciones químicas que determina cambios de sabor, consistencia, color y aromas. En esta experiencia se observa que el mango variedad “Haden” posee en su estado maduro como fruto comestible, un pH de $4,47 \pm 0,02$ medido

con Microprocessor pH meter. Según Azocar (1977) reportó que el parámetro pH es de 5,10 en este estadio, por otra parte Zambrano (1989) reportó un pH 4,90, valores superiores a los obtenidos por nosotros. Es posible que las diferencias se deban a la variedad de mango utilizada para cada estudio. El pH se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en disolución, siendo de suma importancia ya que este índice permite tener una idea acerca de la estabilidad microbiológica que tendrá la materia prima (Stratford y col., 2000).

Tabla 3. Caracterización del mango variedad “Haden” (*Mangifera indica* L.).

Parámetros	Mango verde	Mango parcialmente maduro	Mango maduro
pH	2,94 ± 0,17 ^a	4,02 ± 0,36 ^a	4,47 ± 0,06 ^a
Acidez Total Titulable (%ácido cítrico)	0,35 ± 0,17 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
Sólidos solubles (°Brix)	9,85 ± 1,23 ^b	12,03 ± 0,61 ^b	18,02 ± 2,10 ^b
Firmeza (g)	6,33 ± 0,75 ^b	5,64 ± 0,12 ^b	5,54 ± 1,62 ^b
<i>L</i> *	65,44 ± 2,99 ^b	63,09 ± 2,54 ^b	61,05 ± 0,51 ^b
<i>a</i> *	15,09 ± 4,02 ^b	17,26 ± 0,46 ^b	22,97 ± 0,68 ^b
<i>b</i> *	71,79 ± 0,96 ^b	71,87 ± 0,19 ^b	75,61 ± 2,56 ^b

a Media de cuatro análisis ± Desviación estándar.

b Media de seis análisis ± Desviación estándar.

La acidez Total titulable, expresada como gramos de ácido cítrico por 100g de fruta fresca, decreció en la medida en que las frutas maduraban. Valores reportados por Azocar (1977) indican una acidez total de 0,130% en mango variedad “Haden” en estado maduro, observándose que este valor se encuentra por encima del valor obtenido por nosotros. Es posible que las diferencias observadas se deban a pequeñas diferencias en criterios o metodología aplicada para la determinación de este parámetro. Por otra parte, la acidez es una función inversa del pH, por lo

que al aumentar el pH se ve disminuida la acidez lo cual se observó al avanzar la madurez del fruto (Tabla 3).

Los sólidos solubles en las frutas están determinados por la concentración de especies químicas disueltas en su fase acuosa, tales como azúcares, y en menor grado, ácidos orgánicos, sales, compuestos nitrogenados y otras especies solubles menores. Valores reportados por Zambrano (1989) en mango var. "Haden" de sólidos solubles fueron de 16 y 18 ° Brix en estado fresco, valores muy semejantes a los obtenidos en el fruto maduro por nosotros. El mango es una fruta climatérica, el etileno provoca la activación de diversas enzimas que catalizan la síntesis de fructosa, glucosa, y sacarosa a partir de almidón, por su importancia destacan la sacarasa sintetasa y la invertasa (Badui, 1990), lo cual se relaciona con el aumento de los sólidos solubles al aumentar madurez del fruto.

Durante los tres estadios estudiados, se observa un cambio en la textura de los mangos, representado por un descenso en la firmeza de los mismos al aumentar su madurez. El ablandamiento del fruto es atribuido principalmente a la degradación de las sustancias pécticas, responsables de la firmeza (Gil y Ruiz, 2010).

En cuanto al color del mesocarpio medido con el Color Flex Spectrophotometer 45°/0° Standars, el índice fotométrico L* indica la luminosidad (L*=100: blanco; L*=0: negro) la cual disminuye con el tiempo a medida en que avanza su madurez. Los parámetros a* y b* expresan la cromacidad, b* (+b*: amarillo; -b*: azul) que es mayor en el estadio maduro, con mayor desarrollo del color amarillo. El valor a* (+a*: rojo;-a*: verde), se hace menos verde y se acerca al rojo al alcanzar su madurez comestible. Las modificaciones del color son principalmente

asociadas a la degradación de la clorofila por las variaciones de pH, desarrollo de procesos oxidativos y por la acción de clorofilasa. La descomposición de la clorofila va asociada a la síntesis o al desenmascaramiento de pigmentos cuyos colores van del amarillo al rojo (carotenoides), o bien de colores rojos violáceos debidos a las antocianinas (Gil y Ruiz, 2010).

Tabla 4. Caracterización de la naranja variedad “Valencia” (*Citrus sinensis* L.)

Parámetros	Naranja verde	Naranja parcialmente maduro	Naranja maduro
pH	3,31 ± 0,01 ^a	3,52 ± 0,02 ^a	3,59 ± 0,02 ^a
Acidez Total Titulable (% ácido cítrico)	1,55 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,02 ^a	0,72 ± 0,01 ^a
Sólidos solubles (°Brix)	9,77 ± 0,12 ^b	11,10 ± 0,17 ^b	13,23 ± 0,12 ^b
Firmeza (g)	16,05 ± 1,18 ^b	15,51 ± 1,37 ^b	5,99 ± 1,79 ^b
<i>L</i> *	74,22 ± 1,95 ^b	71,09 ± 3,55 ^b	67,96 ± 0,35 ^b
<i>a</i> *	1,85 ± 0,63 ^b	5,78 ± 2,87 ^b	8,86 ± 1,66 ^b
<i>b</i> *	34,87 ± 1,13 ^b	38,73 ± 4,04 ^b	49,27 ± 5,96 ^b

a Media de cuatro análisis ± Desviación estándar.

b Media de seis análisis ± Desviación estándar.

Estudios realizados sobre naranjadas comerciales por Bordas (1984) mostraron que el pH de naranjas en estado de madurez fisiológica es de 3,40 - 3,51 valores muy semejantes al obtenido en la naranja variedad “valencia” en madurez intermedia igual a 3,52 ± 0,02. Según la Norma COVENIN 2278-85 (1985) para Alimentos Comercialmente estériles, los alimentos son clasificados de acuerdo a su pH, siendo considerados como muy ácidos los que presenta un pH < 3,7. En vista de que el valor obtenido para la fruta es 3,59 en el fruto maduro, ésta se considera un alimento muy ácido, y justamente este hecho constituye su barrera natural para protegerse del ataque de ciertos microorganismos deteriorativos y patógenos (Tapia y col., 1996).

Por otra parte la acidez titulable obtenida en la naranja de madurez intermedia es de $0,90 \pm 0,02$, Ariza Flores y col. (2010) obtuvieron una acidez entre 0,66-1.00% en naranjas. Los valores obtenidos para la naranja en estado de madurez intermedia y maduro se encuentra entre los valores mencionados anteriormente, decreciendo al avanzar la madurez del fruto. Al aumentar la maduración del fruto la acidez se reduce debido a la transformación de los ácidos orgánicos en azúcares, dando lugar al suave sabor de los frutos maduros (Gil y Ruiz, 2010).

Los sólidos solubles reportados por Bordas (1984) en naranjas con madurez fisiológica (madurez de consumo) son de 12,92 - 14,44 °Brix, intervalo en el cual se encuentra el valor determinado en naranjas maduras. Las reacciones que predominan durante la maduración son las llamadas de hidrólisis, por ellas las moléculas grandes, “polímeros”, que se encuentran en las frutas verdes (almidón, celulosa, pectinas) y que están formadas por la unión de moléculas más pequeñas, “monómeros”, se rompen incorporando una molécula de agua y liberando estas unidades pequeñas. Un ejemplo del aumento de los sólidos solubles es la hidrólisis del almidón para dar azúcares que son los responsables del endulzamiento del fruto (IICA, 1987).

Durante los tres estadios estudiados, se observa un cambio en la textura de las naranjas, representado por un descenso en la firmeza de los mismos al aumentar su madurez. Las microfibrillas de celulosa y diversas hemicelulosas, xilanos y ligninas son responsables de la rigidez de característica de las frutas, mientras que la turgencia, que le confiere firmeza y succulencia, depende del agua retenida por ósmosis en las células (Gil y Ruiz, 2010).

En cuanto al color del mesocarpio de la naranja, los valores de L^* o luminosidad disminuyen a medida en que avanza su madurez, el valor b^* (azul-amarillo) es mayor en el

estadio maduro, con mayor desarrollo del color amarillo y el valor a^* (verde-rojo) se hace menos verde y se acerca al rojo al alcanzar su madurez comestible.

5.2 Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* entérica serv. Saintpaul.

Todos los organismos celulares son estructuras altamente organizadas con una forma específica de metabolismo y reproducción, dirigiendo una serie de reacciones bioquímicas que conducen a su propia síntesis. En la naturaleza las células viven asociadas a otras en conjuntos llamados poblaciones que generalmente derivan de una única célula parental por divisiones celulares sucesivas, con velocidades de crecimiento específicas de acuerdo a diferencias tanto estructurales como funcionales (Madigan y col., 2003).

Con la finalidad de conocer la velocidad de crecimiento para alcanzar la fase estacionaria temprana de los microorganismos patógenos seleccionados se realizaron curvas de crecimiento, debido a que en esta fase generalmente las células son más pequeñas que en la fase exponencial (dado que la división celular continúa después que el incremento de masa se ha detenido), y son más resistentes a agentes físicos (calor, frío y radiaciones) y químicos adversos (Stanier y col., 1992).

Conociendo las exigencias nutritivas de ambos microorganismos se suministró en la solución de cultivo de *E. coli* O157:H7 extracto de levadura en un medio de cultivo nutritivo como lo es el TSB, luego de la realización de la curva de crecimiento durante 24 h representada en el gráfico (a) de la figura 8, se obtuvo inicialmente un aumento progresivo de la masa celular

cuantificada como UFC/mL representada en una escala semilogarítmica, alcanzado la fase estacionaria temprana a las 18h a 37°C, valor disímil al reportado por Ramírez y col. (2005) quien obtuvo una fase estacionaria temprana a las 5h y 30 min. de incubación con caldo EC en condiciones controladas de temperatura, oxigenación y composición. Las diferencias observadas pueden ser atribuidas al control de la oxigenación por agitación del medio, lo cual favorece marcadamente el crecimiento y desarrollo del *E. coli*.

Las bacterias que no esporulan, como *Escherichia coli*, entran a una fase de crecimiento nulo, o fase estacionaria, al agotarse los nutrientes en el medio. En esta fase disminuye el volumen celular y la forma se redondea, se engrosa la pared, disminuye el número de flagelos y se incrementa la resistencia celular a condiciones adversas. El metabolismo se reorganiza, se acumulan compuestos de reserva y osmoprotección y aumenta la degradación de macromoléculas. El DNA en el nucleóide se compacta y disminuye su metabolismo. La expresión de los genes necesarios para el crecimiento disminuye y aumenta la de aquéllos relacionados con la viabilidad celular durante el ayuno. La regulación de los genes de la fase estacionaria depende principalmente del factor transcripcional σ (RpoS) (Ramírez y col., 2005).

Al aplicar la ecuación de número de generaciones $n = (\log N - \log N_0) / \log 2$ donde n: número de generaciones, N: nivel del microorganismo final, N_0 : nivel del microorganismo inicial, se calculó un número de generaciones igual a 19,77 y un tiempo de generación igual a 72,84 min. luego de emplear la ecuación de tiempo de generación $T_g = t / n$, donde t es la variación de tiempo y n es el número de generaciones (Schlegel y Zaborosch, 1997).

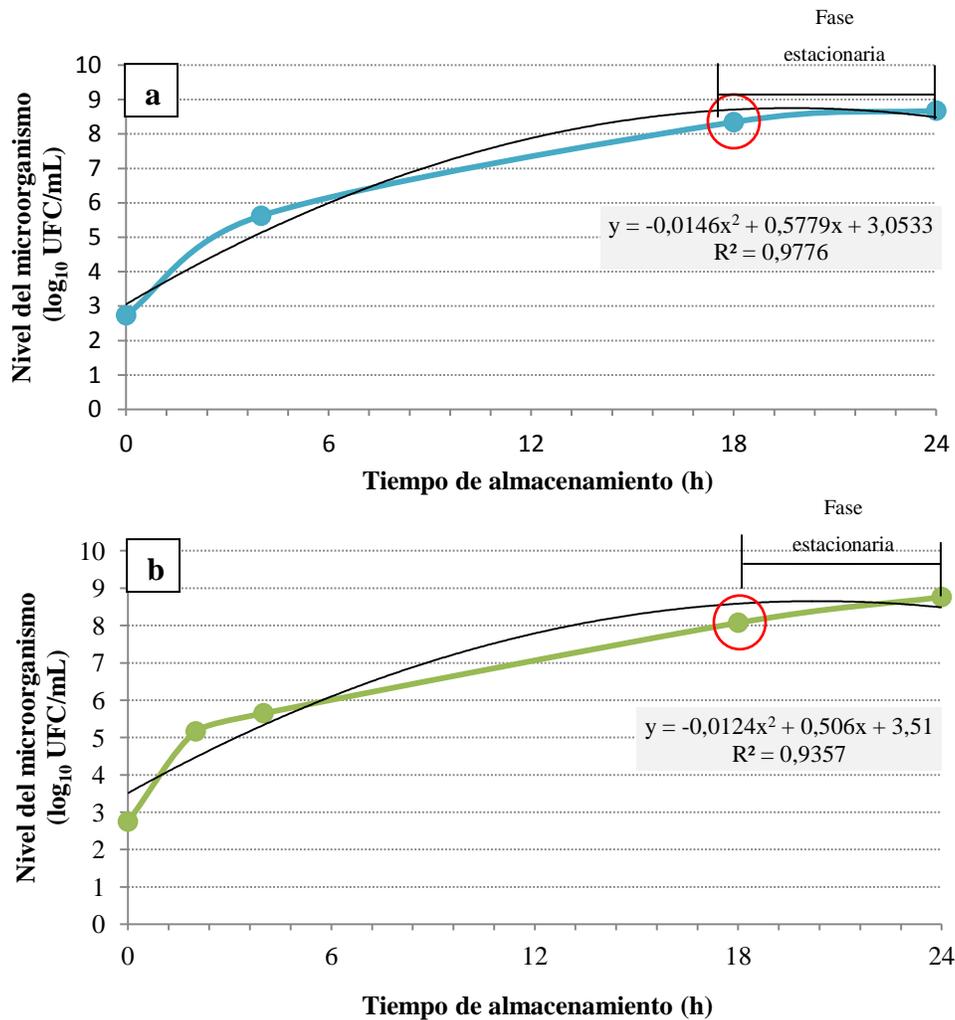


Figura 8. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 (a) en medio de cultivo líquido tripticasa de soya (TSB) suplementado con extracto de levadura al 0,6%, y *Salmonella entérica serv. Saintpaul* (b) en medio de cultivo TSB, ambas incubas a 37°C sin agitación.

En el gráfico (b) de la figura 8, se muestra la curva de crecimiento de *Salmonella entérica serv. Saintpaul* cultivada en caldo tripticasa de soya sin agitación a 37°C, la cual alcanza la fase estacionaria a las 18h de incubación con un inóculo inicial de 10^3 UFC/mL, dónde no hay aumento ni descenso neto en el número de unidades formadoras de colonias en escala logarítmica. A continuación se observa que alcanzadas las 22h de incubación el número de

células viables se hace menor al número de células no viables obteniéndose la fase de muerte. Al aplicar la ecuación de número de generaciones se obtuvo un número de generaciones igual a 20,09 y un tiempo de generación igual a 71,68 min.

En los experimentos realizados por Kim y Bhunia (2008) *Salmonella* serv. Enteritidis fue inoculada con un nivel de 10^3 UFC/mL en un volumen de 100 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) incubado a 37°C en agitación fijado en 150 rpm, alcanzando una fase estacionaria a las 9 h de incubación, las diferencias en tiempo obtenidas se deben principalmente a que el cultivo fue realizado en condiciones estáticas, demostrándose que la agitación favorece significativamente el crecimiento del microorganismo en estudio. A pesar de la selectividad del medio RV empleado por Kim y Bhunia, este es un medio de enriquecimiento que al igual que el caldo TSB contiene triptona de soya por lo que también favorece el crecimiento de *Salmonella* a excepción de *S. typhi*.

5.3 Estudio “In Vitro” de compuestos de origen de plantas sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7.

Empleando el método de difusión de discos sugerido por Davidson y Parish (1987) se evaluó el efecto de cuatro extractos de plantas estandarizados como el extracto de hojas de *Aloe vera*, extracto de raíz de la planta *Panax ginseng*, extracto de hojas del árbol de *Ginkgo biloba* y extracto de cáscara y semilla de uvas rojas, preparados en soluciones acuosas a distintas concentraciones. La evaluación de la acción antimicrobiana se muestra en la tabla 5. Las concentraciones con mayor inhibición del crecimiento cuantificado según el grosor del halo de

inhibición sobre un césped uniforme de microorganismos corresponden a las mayores concentraciones (2,5 y 3 % p/v) para ambos microorganismos.

Tabla 5. Efecto antimicrobiano de *Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, *Ginseng* y extracto de cáscara y semilla de uvas rojas sobre *Salmonella entérica* ser. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7 usando el método de discos.

Microorganismo	Extracto de planta	Concentración de antimicrobiano					
		0.0%	1.0%	1.5%	2.0%	2.5%	3.0%
		Halo de inhibición (mm) *					
<i>Salmonella</i> Saintpaul	<i>Ginkgo Biloba</i>	ND	0.40 ± 0.01	0.60 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.10 ± 0.01	1.20 ± 0.01
	<i>Aloe vera</i>	ND	0.40 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.60 ± 0.00	0.80 ± 0.03	1.20 ± 0.01
	<i>Ginseng</i>	ND	0.50 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.20 ± 0.01	1.50 ± 0.01	2.00 ± 0.01
	Extracto de cáscara y semilla de uvas rojas	ND	0.50 ± 0.03	0.80 ± 0.01	1.10 ± 0.02	1.20 ± 0.01	1.50 ± 0.00
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Ginkgo Biloba</i>	ND	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.80 ± 0.01	1.00 ± 0.01
	<i>Aloe vera</i>	ND	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.30 ± 0.02
	<i>Ginseng</i>	ND	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.30 ± 0.01	1.30 ± 0.00	1.60 ± 0.02
	Extracto de cáscara y semilla de uvas rojas	ND	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.60 ± 0.04

* Los valores reportados son el promedio de tres (3) determinaciones ± Desviación estándar

ND: No detectado

La respuesta celular a variaciones bruscas del medio ambiente, o respuesta al estrés, se caracteriza por cambios en la expresión genética y en la fisiología celular. Estos cambios le permiten a la célula sobrevivir y adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Gómez, 2006). Sin embargo se observa que dicha adaptación depende además de las concentraciones empleadas

del antimicrobiano en estudio. En las concentraciones del 1 al 3% se observó un halo de inhibición, aumentando el diámetro al incorporar una concentración mayor del antimicrobiano. Entre los parámetros intrínsecos afectados se encuentra principalmente la actividad de agua debido a la incorporación de solutos que corresponden a los discos impregnados en soluciones concentradas de cada extracto de planta.

La reducción de la actividad de agua por debajo de su valor óptimo disminuye la velocidad de crecimiento y el tamaño de la población final, ya que todas las reacciones químicas de las células necesitan un medio acuoso. Se debe tener en cuenta sin embargo, que la a_w está influenciada por otros parámetros ambientales, como el pH, la temperatura de crecimiento, y el Eh (Jay, 2000).

Las diferencias observadas en el diámetro de los halos de inhibición según el extracto de planta empleado se deben a que cada uno de ellos contiene distintos compuestos antimicrobianos con distintos umbrales en la célula microbiana. En general las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de hierbas, especias, extractos vegetales están aparentemente relacionadas con su contenido de compuestos fenólicos (Lai y col., 1991), las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, la mayoría de los cuales son fenoles o sus derivados de oxígeno sustituido, que representan los metabolitos secundarios, de su totalidad al menos 12.000 han sido aislados representando menos del 10% del total existente (Murphy, 1999).

Además de los compuestos fenólicos, otros compuestos extraídos de las plantas que poseen actividad antimicrobiana son los polifenoles entre los que se encuentran: quinonas,

flavonoides, taninos y cumarinas. Otros son los terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lecitinas y polipéptidos, entre otros (Murphy, 1999).

El latex es reportado como compuesto químico antimicrobiano en el extracto de hoja de *Aloe vera*, con actividad antimicrobiana efectiva contra *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Streptococcus* y *S. aureus*, según Murphy (1999). Se denomina látex al compuesto antimicrobiano sin embargo es un nombre general ya que los antimicrobianos presentes en esta planta son muy variados y conforman una mezcla compleja de compuestos químicos. Entre los compuestos químicos presentes en esta planta se encuentran las antroquinonas, quinonas, saponinas, aloerresinas, isoaloerresinas, fenoles, taninos, esteroides, entre otros compuestos (Stevens, 2000). Por lo que el umbral de este extracto de planta es muy amplio, entre los cuales se encuentran unión a proteínas y adhesinas, inhibición enzimática, privación del sustrato, forma un complejo con la pared celular, disrupción de la membrana y formación de complejos de iones metálicos (Murphy, 1999).

El extracto de hoja del árbol de *Ginkgo biloba* contiene como principal compuesto antimicrobiano los flavonoides, que son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo (Domingo y López-Brea, 2003), los cuales se unen a las adhesinas, forman complejos con la pared celular e inactivan enzimas, con actividad antimicrobiana general contra virus, bacterias y hongos.

En el *ginseng* se ha reportado como compuesto químico antimicrobiano aislado de la planta a las saponinas, con actividad antimicrobiana efectiva contra *E. coli*, *Sporothrix schenckii*, *Staphylococcus* y *Trichophyton* (Murphy, 1999). Las saponinas son un grupo de glucósidos

coloides muy hidrosolubles. Se conocen dos tipos de saponinas según la estructura del grupo aglicón también llamada genina ó sapogenina, entre los cuales se encuentran los esteroides (neutros) y triterpenoides (ácidos) generalmente unidos a una porción glucídica (Anaya, 2003). El umbral de las saponinas es la membrana, generando la disrupción de ésta por acción de los terpenoides específicamente.

El extracto de cáscara y semilla de uvas rojas contiene principalmente compuestos fenólicos, taninos y antocianinas (Obreque-Slier y col., 2010), los cuales se unen a las adhesinas, forman complejos con la pared celular, inactivan enzimas, y forman complejos de iones metálicos, entre otros efectos.

Los resultados de la aplicación del método de difusión de discos para evaluar el efecto de diferentes sustancias antimicrobianas sobre *S. Saintpaul* o *E. coli* O157:H7 demostraron que todos los compuestos empleados ejercieron un efecto bactericida sobre la población de ambos microorganismos ya que se observaron halos de inhibición en todos los casos, sin embargo ese efecto fue más significativo cuando se utilizó el extracto de raíz de la planta *Panax ginseng*. Por otra parte, debido a que no se observaron grandes diferencias de inhibición del crecimiento de los patógenos en estudio entre las concentraciones ubicadas entre el 2 y 3% se seleccionó la concentración de 2%.

5.4 Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos de planta en combinación con un ácido orgánico y una sal basado en un diseño factorial de múltiples niveles contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en jugos de mango y naranja clarificados y esterilizados.

Un diseño experimental del tipo “factorial Multi-nivel” 2 x 2 x 2 x 2 (2 concentraciones de ácido málico (0 y 0,5%) x 2 concentraciones de sorbato de potasio (0 y 0,05%) x 2 concentraciones de compuesto natural (0 y 2% de ginseng) x 2 repeticiones) fue empleado con la finalidad de comparar el efecto de concentraciones de ácido orgánico y concentraciones de sal en combinación con el antimicrobiano de origen de plantas seleccionado (*ginseng*) sobre la inactivación de microorganismos patógenos tales como *S. Saintpaul* y *E. coli* O157:H7 en jugos clarificados y esterilizados, a las 0 y 72 horas de almacenamiento a 5°C.

El jugo clarificado por centrifugación, contiene una menor cantidad de sólidos ya que la centrifugación tiene el objetivo de separar partículas que difieren en masa o densidad a motivo de la fuerza centrífuga aplicada por el giro de un rotor (Berk y Lodish, 2006), donde el sobrenadante decantado compuesto por las partículas menos densas es el jugo clarificado empleado en los siguientes experimentos, básicamente este tipo de centrifugación de baja velocidad tiene la finalidad de separar los sedimentos de un jugo (que tienen mayor densidad que los líquidos), obteniéndose uno más claro y con menor contenido de sólidos en suspensión, impidiendo que estos sólidos puedan ejercer un efecto protector o de “apantallamiento” en los microorganismos al estudiar el efecto antimicrobiano de los compuestos empleados (*ginseng*, ácido málico y

sorbato de potasio). Además estos jugos fueron esterilizados para evitar la interferencia de la flora nativa sobre la respuesta ante los compuestos antimicrobianos aplicados.

5.4.1 Actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal en Jugo de naranja (*Citrus sinensis L.*) var. “Valencia” clarificado y esterilizado.

En la tabla 6 se muestra el efecto antimicrobiano expresado como una relación entre las unidades logarítmicas iniciales y finales microbianas al emplear las diferentes combinaciones de los compuestos antimicrobianos añadidos según el diseño factorial multinivel, donde se observa que al emplear las máximas concentraciones de los antimicrobianos en combinación con el *ginseng* se obtienen las máximas reducciones, conjuntamente este efecto se ve aumentado a las 72 horas de incubación a 5°C, ya que se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de almacenamiento para *S. Saintpaul*.

Inicialmente el jugo de naranja clarificado y esterilizado fue inoculado con un nivel de 10^6 UFC/mL de cada microorganismos individualmente, obteniéndose reducciones logarítmicas en la mayoría de los casos incluyendo a jugos no tratados con los antimicrobianos (controles), lo cual indica que el pH del jugo actuó como una barrera contra la supervivencia y desarrollo de estos patógenos. El pH del jugo de naranja ubicado en $3,52 \pm 0,02$ posiblemente afectó por lo menos dos aspectos de la célula microbiana: el funcionamiento de sus enzimas y el transporte al interior de las células. Según Jay, 2000, el pH óptimo de crecimiento de *Salmonella* en alimentos es de 4,05 mientras que el pH óptimo de *E. coli* O157:H7 es de 4,5.

Tabla 6. Efecto antimicrobiano de diferentes sustancias añadidas solas o combinadas determinado inmediatamente al ser añadidas (0h) y a las 72 h de almacenados a 5 °C sobre *E. coli* O157:H7 y *S. Saintpaul* en jugo de naranja (*Citrus Sinensis L.*) var. “Valencia” clarificado y esterilizado.

Concentración del compuesto			Promedio de reducciones		Promedio de reducciones	
			<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. Saintpaul</i>	
SP (%) AM (%) G (%)			(Log _{ini} / Log _{fin})		(Log _{ini} / Log _{fin})	
			t = 0h	t = 72h	t = 0h	t = 72h
0	0	0	2,00 ± 0,05 ^{Aa}	2,03 ± 0,02 ^{Aa}	0,73 ± 0,08 ^{Aa}	1,73 ± 0,14 ^{Ba}
0	0	2	1,93 ± 0,04 ^{Aa}	2,31 ± 0,03 ^{Ab}	0,26 ± 0,02 ^{Ab}	1,74 ± 0,06 ^{Ba}
0	0,5	0	2,59 ± 0,04 ^{Ac}	2,31 ± 0,18 ^{Ab}	3,45 ± 0,02 ^{Ac}	6,23 ± 0,00 ^{Ab}
0	0,5	2	1,23 ± 0,10 ^{Ae}	1,67 ± 0,04 ^{Ae}	2,54 ± 0,04 ^{Af}	6,23 ± 0,00 ^{Bb}
0,05	0	0	0,32 ± 0,11 ^{Ab}	0,77 ± 0,07 ^{Ac}	1,82 ± 0,11 ^{Ac}	6,23 ± 0,00 ^{Bb}
0,05	0	2	1,33 ± 0,16 ^{Ad}	1,72 ± 0,04 ^{Ad}	0,00 ± 0,00 ^{Ae}	6,23 ± 0,00 ^{Bb}
0,05	0,5	0	1,15 ± 0,08 ^{Ad}	0,95 ± 0,14 ^{Ac}	3,71 ± 0,68 ^{Ad}	6,23 ± 0,00 ^{Bb}
0,05	0,5	2	2,82 ± 0,06 ^{Ad}	2,77 ± 0,00 ^{Af}	1,78 ± 0,01 ^{Ac}	6,23 ± 0,00 ^{Bb}

G: ginseng; AM: ácido málico; SP: sorbato de potasio

A, B: las letras mayúsculas indican las diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento ubicados en filas (p<0,05).

a, b, c, d, e: las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre las combinaciones de agentes antimicrobianos ubicados en columnas y cada tiempo de almacenamiento (p<0,05).

Los valores son el promedio de dos determinaciones por duplicado ± desviación estándar (n=4).

Al mismo tiempo un pH desfavorable hace a las células mucho más sensibles a una gran variedad de agentes tóxicos (Jay, 2000). Lo cual se observa en las reducciones microbianas obtenidas al incorporar ácido málico, sorbato de potasio y *ginseng* tanto individualmente como en conjunto. A su vez se evidenció el poder antimicrobiano del *ginseng* que al ser incorporado individualmente en el jugo logró una reducción de 0,26 ± 0,02 unidades logarítmicas de UFC/mL

a las 0 h y $1,78 \pm 0,01$ a las 72 h de almacenamiento a 5°C para *S. Saintpaul* y $1,93 \pm 0,04$ y $2,31 \pm 0,03$ respectivamente para *E. coli* O157:H7, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los agentes antimicrobianos en cada tiempo.

En la figura 9 se muestra las reducciones microbianas obtenidas a las 0 y 72 horas de almacenamiento a 5°C en jugos de naranja (*Citrus sinensis L.*) tratados y no tratados con los antimicrobianos según el diseño factorial multinivel, en la gráfico (a) se observa los niveles de *E. coli* O157:H7 determinándose un efecto sinérgico al incorporar el ácido málico 0,5% más sorbato de potasio 0,05% más el ginseng 2%, siendo la combinación más efectiva para reducir las poblaciones de este potencial patógeno en esta matriz alimentaria, reduciendo $2,82 \pm 0,06$ unidades logarítmicas a las 0 h y $2,77 \pm 0,00$ unidades logarítmicas a las 72 h de incubación a 5°C . Mientras en el gráfico (b) de la figura 9 se observan las reducciones logarítmicas determinadas para *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en jugos de naranja (*Citrus sinensis L.*), observándose que las mayores reducciones logarítmicas del microorganismo ($3,71 \pm 0,68$) fueron obtenidas al incorporar en conjunto el sorbato de potasio y el ácido málico a las 0 horas y que luego de 72 horas de almacenamiento a 5°C se logra la reducción de la totalidad de la población incorporada inicialmente ($6,23 \pm 0,00$) en todos los tratamientos a excepción del control y de aquel que se le incorporó únicamente *ginseng*.

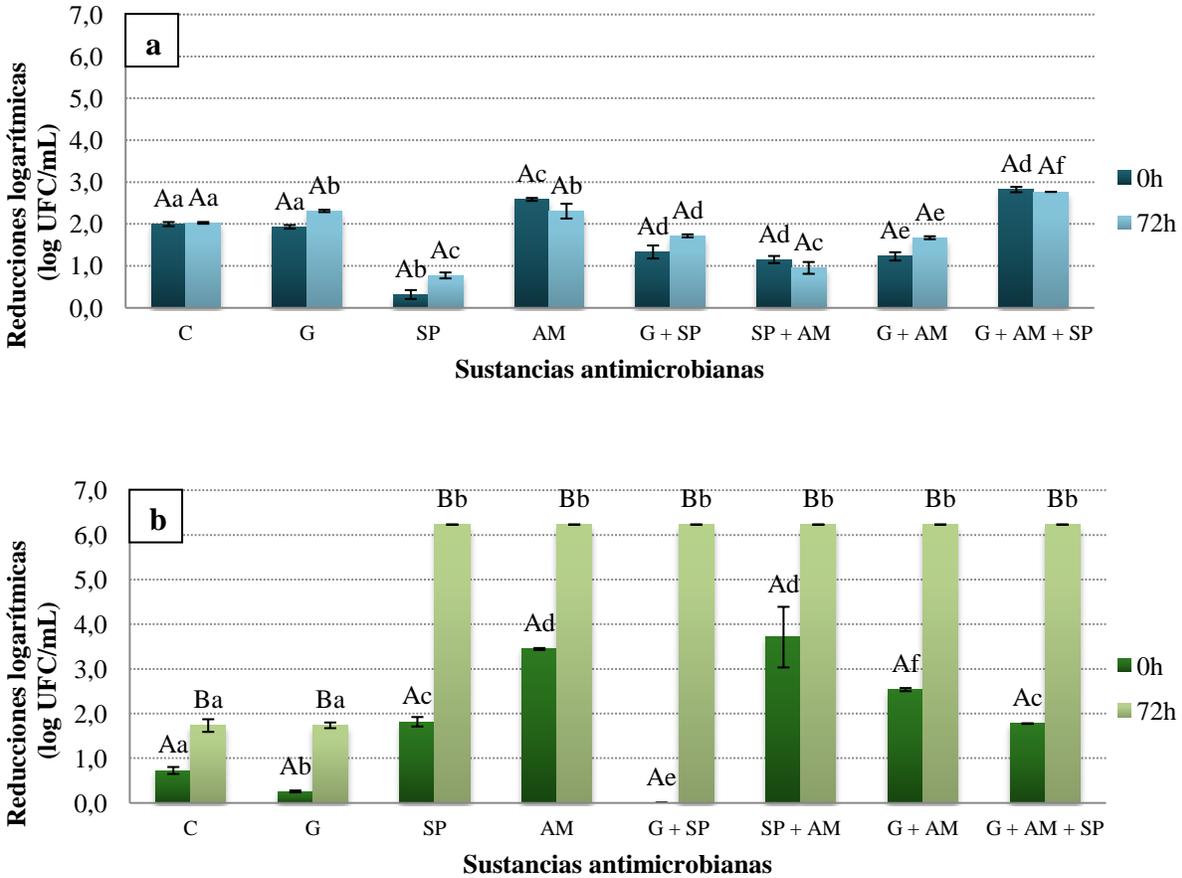


Figura 9. Reducción de la población de *Escherichia coli* O157:H7 (a) y *Salmonella enterica* serv. Saintpaul (b) en jugo de naranja (*Citrus Sinensis L.*) var. “Valencia”, por acción de diferentes sustancias antimicrobianas y sus combinaciones inmediatamente luego de ser añadidas (0h) y después de 72h de almacenamiento a 5°C. Control (C), Ginseng (G), Sorbato de Potasio (SP), Ácido málico (AM). Las letras mayúsculas (A, B) sobre las barras indican diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento. Las letras minúsculas (a, b, c, d, e) indican diferencia significativa entre los agentes antimicrobianos por cada tiempo de almacenamiento. Los valores son el promedio de dos determinaciones realizadas por duplicado \pm desviación estándar (n=4).

El pK del sorbato es 4,80 y a un pH de 4,0 el 86% del compuesto se encuentra en forma no disociada, de ahí la efectividad antimicrobiana observada en un jugo de naranja caracterizado con un pH de $3,52 \pm 0,02$ inicialmente, ya que su forma no disociada es la que atraviesa la membrana celular del microorganismo y actúa en su interior. Este compuesto inhibe determinadas enzimas en la célula microbiana como la enolasa y lactodeshidrogenasa, así como otras enzimas presentes en el ciclo de Krebs. Además se mantiene activo frente a catalasas y oxidasas (Cubero y col., 2002), a diferencia de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 es catalasa positiva. Simultáneamente se observó el sinergismo al emplear el ácido málico en conjunto con el sorbato de potasio, ya que el primero completa el efecto antimicrobiano ampliando el espectro de acción, debido a que éste actúa como un regulador de pH, secuestrador de iones metálicos y conjuntamente como antioxidante y saborizante (Cubero y col., 2002).

5.4.2 Actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal en Jugo de mango (*Mangifera indica L.*) var. “Haden” clarificado y esterilizado.

A continuación se muestra la tabla 7 dónde se evidencia el efecto antimicrobiano expresado como una relación entre las unidades logarítmicas iniciales y finales microbianas al emplear las diferentes combinaciones de los compuestos antimicrobianos añadidos, donde se observa que al usar las máximas concentraciones de los antimicrobianos en combinación con el *ginseng* se obtienen las máximas reducciones, conjuntamente este efecto se ve aumentado a las 72 horas de incubación a 5°C, observado en las diferencias significativas obtenidas entre los tiempos de almacenamiento ($p < 0,05$) para ambos microorganismos.

Tabla 7. Efecto antimicrobiano de diferentes sustancias añadidas solas o combinadas determinado inmediatamente al ser añadidas (0h) y a las 72 h de ser almacenados a 5 °C sobre *E. coli* O157:H7 y *S. Saintpaul* en jugo de mango (*Mangifera indica* L.) var. “Haden” clarificado y esterilizado.

Concentración del compuesto			Promedio de reducciones		Promedio de reducciones	
			<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. Saintpaul</i>	
			(Log _{ini} / Log _{fin})		(Log _{ini} / Log _{fin})	
SP (%)	AM (%)	G (%)	t = 0 h	t = 72 h	t = 0 h	t = 72 h
0	0	0	1,90 ± 0,08 ^{Aa}	2,98 ± 0,11 ^{Ba}	0,54 ± 0,16 ^{Aa}	1,12 ± 0,67 ^{Ba}
0	0	2	2,08 ± 0,18 ^{Ab}	2,59 ± 0,06 ^{Bb}	0,15 ± 0,03 ^{Ab}	2,09 ± 0,04 ^{Bb}
0	0,5	0	2,55 ± 0,05 ^{Ac}	4,57 ± 0,05 ^{Bc}	0,87 ± 0,00 ^{Aa}	6,91 ± 0,00 ^{Bd}
0	0,5	2	2,21 ± 0,01 ^{Aae}	4,38 ± 0,06 ^{Be}	6,91 ± 0,04 ^{Ad}	6,91 ± 0,00 ^{Bd}
0,05	0	0	0,62 ± 0,08 ^{Ab}	2,89 ± 0,08 ^{Ba}	0,58 ± 0,06 ^{Aa}	6,44 ± 0,00 ^{Bc}
0,05	0	2	1,18 ± 0,05 ^{Ad}	2,23 ± 0,14 ^{Bd}	0,70 ± 0,01 ^{Aa}	6,44 ± 0,00 ^{Bc}
0,05	0,5	0	1,26 ± 0,16 ^{Ad}	4,13 ± 0,16 ^{Be}	2,10 ± 0,01 ^{Ac}	6,44 ± 0,00 ^{Bc}
0,05	0,5	2	1,32 ± 0,11 ^{Ad}	6,68 ± 0,00 ^{Bf}	2,66 ± 0,10 ^{Ae}	6,44 ± 0,00 ^{Bc}

G: ginseng; AM: ácido málico; SP: sorbato de potasio

A, B: las letras mayúsculas indican las diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento ubicados en filas ($p < 0,05$).

a, b, c, d, e, f: las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre las combinaciones de agentes antimicrobianos ubicados en columnas y cada tiempo de almacenamiento ($p < 0,05$).

Los valores son el promedio de dos determinaciones por duplicado ± desviación estándar (n=4).

El jugo mango es un sustrato con abundantes nutrientes para el crecimiento microbiano, es rico en carbohidratos, calcio, magnesio, potasio, fósforo, y algunos aminoácidos, así como un alto contenido de humedad. Sin embargo se observa que hay una reducción microbiana inicial en los jugos controles tanto para *E. coli* O157:H7 como para *S. Saintpaul*, esto puede ser atribuido al pH del jugo ($4,02 \pm 0,36$). La reducción menor observada inicialmente para *S. Saintpaul* puede deberse a que a pesar de que el pH óptimo de crecimiento de éste microorganismo se halla en

torno a la neutralidad, siendo bactericidas los valores por encima de 9,0 y por debajo de 4,0; un pH mínimo de crecimiento de 4,05 ha sido registrado (con predominancia de ácidos HCl y cítrico) para éste patógeno (Jay, 2000).

Inicialmente el jugo de mango clarificado y esterilizado fue inoculado con un nivel de 10^6 UFC/mL de cada microorganismos individualmente, obteniéndose reducciones logarítmicas en todos los casos incluyendo a jugos no tratados con los antimicrobianos (controles) atribuido con anterioridad al pH, a su vez se evidenció el poder antimicrobiano del *ginseng* que al ser incorporado individualmente en el jugo logró una reducción de $2,08 \pm 0,18$ unidades logarítmicas de UFC/mL a las 0 h y $2,59 \pm 0,06$ a las 72 h de almacenamiento a 5°C para *E. coli* O157:H7 y $0,15 \pm 0,03$ y $2,09 \pm 0,04$ para *S. Saintpaul* respectivamente, indicando que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la reducción de los microorganismos para los tiempos de almacenamiento y para el efecto del antimicrobiano *ginseng* en cada tiempo, que además de ser inmediato continúa durante el tiempo del almacenamiento, análogo a lo observado en jugos de naranja.

En la figura 10 se muestran las reducciones microbianas obtenidas a las 0 y 72 horas de almacenamiento a 5°C en jugos de mango (*Mangifera indica L.*) tratados y no tratados con los antimicrobianos según el diseño factorial multinivel. En el gráfico (a) de la figura 10 se observan los niveles de *E. coli* O157:H7 determinándose un efecto sinérgico al incorporar el ácido málico 0,5% más sorbato de potasio 0,05% más el *ginseng* 2%, siendo la combinación más efectiva para reducir las poblaciones de este microorganismo, con un nivel de reducción de 6 ciclos logarítmicos a las 72 horas de incubación.

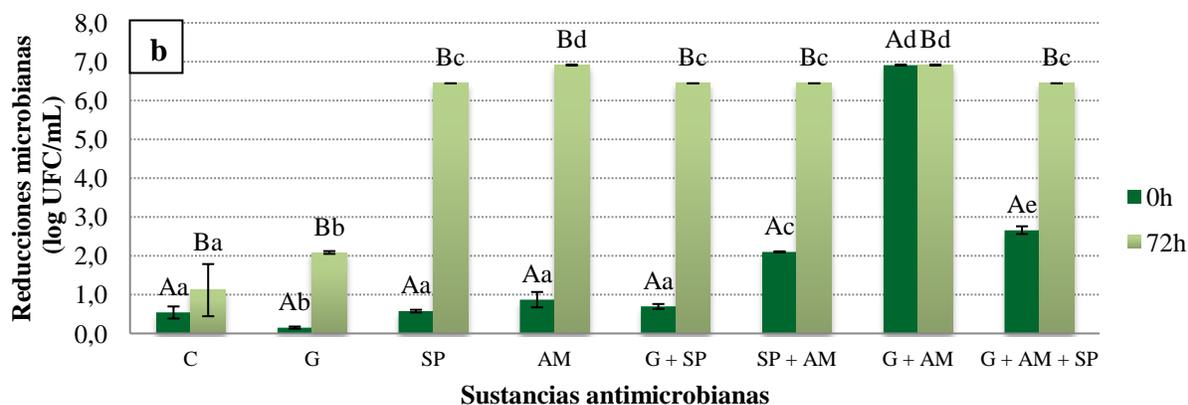
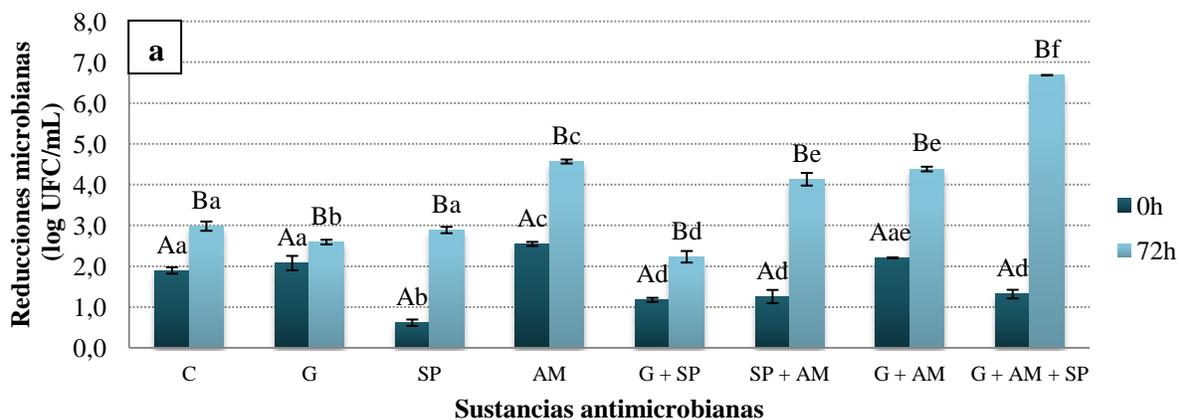


Figura 10. Reducción de la población de *Escherichia coli* O157:H7 (a) y *Salmonella enterica* serv. Saintpaul (b) en jugo de mango (*Mangifera indica* L.) var. “Haden”, por acción de diferentes sustancias antimicrobianas y sus combinaciones inmediatamente luego de ser añadidas (0h) y después de 72h de almacenamiento a 5°C. Control (C), Ginseng (G), Sorbato de Potasio (SP), Ácido málico (AM). Las letras mayúsculas (A, B) sobre las barras indican diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento. Las letras minúsculas (a, b, c, d, e) indican diferencia significativas entre los agentes antimicrobianos por cada tiempo de almacenamiento. Los valores son el promedio de dos determinaciones realizadas por duplicado \pm desviación estándar (n=4).

En el gráfico (b) de la figura 10 se observan las reducciones logarítmicas determinadas para *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en jugos de mango (*Mangifera indica* L), determinándose que las mayores reducciones logarítmicas del microorganismo a las 0 horas de almacenamiento ($6,91 \pm 0,00$) fueron obtenidas al incorporar únicamente ácido málico más ginseng, luego de avanzadas las 72 horas de almacenamiento a 5 °C se logra la reducción de la totalidad de la población incorporada inicialmente en todos los tratamiento a excepción del control y a aquel que se le incorporó únicamente *ginseng*.

El efecto bactericida determinado fue más significativo cuando se utilizaron algunas sustancias antimicrobianas solas y aun más cuando se aplicaron en combinación, representado en los gráficos comparativos que demuestran la alta efectividad en la mayoría de los ensayos a diferencia del uso individual de los compuestos en los jugos estudiados. Además hay que señalar que el efecto bactericida fue mayor después de un período de incubación de 72 h a 5°C. Por otra parte, el análisis estadístico de los datos nos permitió determinar las combinaciones ideales de las sustancias necesarias para lograr la mayor reducción logarítmica de cada microorganismo en cada tipo de jugo, gracias a ello se seleccionó la siguiente combinación de antimicrobianos (sorbato de potasio al 0,05%, ácido málico al 0,5% y Ginseng al 2%).

5.5 Estudio de la actividad antimicrobiana de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en jugos de mango y naranja frescos almacenados a 5°C por 21 días.

La combinación de los compuestos estudiados que de acuerdo al diseño factorial de múltiples niveles resultó más efectiva para reducir los niveles de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 (0,5% de ácido málico + 0,05% de sorbato de potasio + 2% de *Ginseng*), fue la empleada en este experimento en jugos frescos incubados a 5°C por 21 días junto con controles de jugos (sin compuestos añadidos), los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

El crecimiento microbiano en los alimentos es afectado por los parámetros intrínsecos y extrínsecos de éstos, las plantas y los animales que sirven como fuente de alimento, han desarrollado mecanismos de defensa contra la invasión y proliferación de microorganismos, y algunos de éstos actúan en los alimentos frescos. Tanto el pH, contenido de humedad, potencial de óxido-reducción, contenido de nutrientes, constituyentes antimicrobianos y estructuras biológicas forman parte de los parámetros intrínsecos en los alimentos que afectan la supervivencia y desarrollo de los microorganismos (Jay, 2000). Así pues, se pudo evidenciar a través de nuestros resultados como el pH del jugo causó reducciones de la población de *S. Saintpaul* inicialmente inoculada (10^6 UFC/mL). Otros factores que también pueden haber influido en la inhibición del crecimiento y las reducciones de la población que se observan a lo largo del tiempo de almacenamiento son la temperatura de almacenamiento y la flora microbiana

nativa en la cual predominan mohos y levaduras los cuales tienen amplios rangos de pH y temperatura para crecer.

Tabla 8. Comportamiento de *Salmonella Saintpaul* y *Escherichia coli* O157:H7 en jugos de naranja y mango frescos tratados y no tratados con antimicrobianos y almacenados a 5°C por 21 días.

Tiempo (días)	<i>Salmonella Saintpaul</i> (Log ₁₀ UFC/mL) ¹				<i>E. coli</i> O157:H7 (Log ₁₀ UFC/mL) ¹			
	Jugo de naranja		Jugo de mango		Jugo de naranja		Jugo de mango	
	ST	CT*	ST	CT*	ST	CT*	ST	CT*
0	5.31±0.11 ^{Aa}	ND ^{Ab}	6.34±0.15 ^{Aa}	4.31±0.19 ^{Ab}	5.37±0.17 ^{Aa}	4.77±0.10 ^{Ab}	6.90±0.08 ^{Aa}	6.06±0.04 ^{Ab}
1	5.14±0.09 ^{Aa}	ND ^{Ab}	6.41±0.03 ^{Aa}	ND ^{Bb}	6.01±0.02 ^{Ba}	4.49±0.02 ^{Bb}	6.48±0.03 ^{Ba}	5.40±0.11 ^{Bb}
3	4.87±0.04 ^{Aa}	ND ^{Ab}	4.98±0.03 ^{Ba}	ND ^{Bb}	5.69±0.12 ^{Ca}	3.72±0.10 ^{Cb}	5.46±0.02 ^{Ca}	4.85±0.01 ^{Cb}
7	4.08±0.12 ^{Ba}	ND ^{Ab}	2.74±0.13 ^{Ca}	ND ^{Bb}	5.74±0.05 ^{Ca}	ND ^{Db}	5.12±0.00 ^{Da}	ND ^{Db}
14	1.39±0.12 ^{Ca}	ND ^{Ab}	3.32±0.01 ^{Da}	ND ^{Bb}	5.72±0.03 ^{Ca}	ND ^{Db}	3.02±0.04 ^{Ea}	ND ^{Db}
21	2.00±0.06 ^{Da}	ND ^{Ab}	2.45±0.21 ^{Ca}	ND ^{Bb}	5.71±0.08 ^{Ca}	ND ^{Db}	3.01±0.15 ^{Ea}	ND ^{Db}

*Una combinación de sorbato de potasio (0.05% p/v), ácido málico (0.5% p/v) y *ginseng* (2% p/v) fue añadida como agente antimicrobiano.

¹ Los valores son el promedio de dos determinaciones por duplicado ± desviación estándar (n=4).

Las letras mayúsculas (A, B, C, D, E) en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) durante el tiempo de almacenamiento.

Las letras minúsculas (a, b) entre columnas por jugo y microorganismo indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (p < 0.05).

ST: Sin tratamiento; CT: Con tratamiento.

Por otra parte, los recuentos de *Salmonella* en jugo de naranja con tratamiento presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los jugos controles, no detectándose el microorganismo desde el primer día de tratamiento, día cero (0), manteniéndose el microorganismo no detectado hasta el día 21 de almacenamiento, indicando una alta efectividad del tratamiento para llegar hasta niveles ausentes de *Salmonella* en jugo de naranja. Por otra parte en el jugo de naranja sin tratamiento se observa que la población del microorganismo disminuye, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los recuentos obtenidos a diferentes tiempos de almacenamiento.

Al comparar los resultados obtenidos para el mango, de igual manera se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los jugos con tratamiento y jugos controles así como también entre los recuentos al transcurrir el período de almacenamiento. Partiendo de una reducción de 3 ciclos logarítmicos decimales en el día cero (0), al cabo de un día de almacenamiento en las muestras tratadas y disminuyendo la población de *Salmonella* hasta niveles no detectados.

La población de *E. coli* O157:H7 en jugo de naranja sin tratamiento no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a lo largo de los 21 días de almacenamiento, manteniéndose el nivel de la población entre $5.37 \pm 0.17 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ para el día cero y $5.71 \pm 0.08 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ para el día 21. Las frutas y jugos de frutas con pH menores de 4.0 no son consideradas generalmente como sustratos para soportar el crecimiento de bacterias patogénicas (Beuchat, 2002), sin embargo se puede observar en nuestros resultados que la cepa

de *E. coli* O157:H7 con la cual trabajamos fue capaz de sobrevivir durante los 21 días de almacenamiento a 5°C.

Al analizar los valores obtenidos entre los jugos tratados y no tratados de naranja, los niveles de *E. coli* O157:H7 varían entre ambos tratamientos, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), lográndose la reducción de la población a niveles no detectados a los siete días de almacenamiento en jugos con tratamiento, lo cual se mantuvo hasta el día 21 de almacenamiento, indicando que la efectividad del tratamiento aplicado aumenta en el tiempo. Reducciones del microorganismo en jugo de mango con tratamiento fueron semejantes, obteniéndose reducciones a niveles indetectables del microorganismo a partir de los siete días de almacenamiento, demostrándose diferencias significativas con los jugos de mango controles, en dónde se observa la supervivencia del microorganismo durante los 21 días.

Como se mencionó anteriormente la supervivencia y crecimiento de un patógeno en la producción de productos crudos o no pasteurizados están dictados por sus capacidades metabólicas. Sin embargo, la manifestación de esas capacidades puede ser ampliamente influenciada por los factores intrínsecos y extrínsecos naturalmente presentes en el producto o por factores impuestos en uno o varios puntos durante todo el sistema de producción, como en este caso sería su procesamiento (incorporación de aditivos) y almacenamiento (en refrigeración). *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, son conocidas por su adaptación a pH reducidos y subsecuentemente exhiben una tolerancia incrementada en ambientes con altos niveles de estrés (Beuchat, 2002).

No obstante, la coexistencia con los microorganismos presentes naturalmente en las frutas y vegetales pueden afectar de forma positiva o negativa su desarrollo. Wells y Butterfield (1997)

determinaron que vegetales co-inoculados con *Pseudomonas viridiflava* y *S. typhimurium*, contenían poblaciones de *Salmonella* aproximadamente tres veces mayor que vegetales inoculados con *Salmonella* únicamente. A diferencia de ello, Janisiewicz y col. (1999) reportaron que la inoculación de *Pseudomonas syringae* en manzanas previene el crecimiento de *E. coli* O157:H7.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para ambos microorganismos, con diferencias significativas ($p < 0,05$) en la inactivación de las poblaciones en jugos tratados con los antimicrobianos durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración, *E. coli* O157:H7 resultó ser más resistente al tratamiento aplicado, tal como lo expone Ahn y col (2007) donde afirman que dicha bacteria es capaz de crecer y/o mantenerse a bajas temperaturas y en condiciones ácidas. Por otra parte *S. Saintpaul* es inactivada en ambos jugos desde el día 0 para jugo de naranja y el día 1 para jugos de mango, lo cual indica que los factores intrínsecos del alimento afectan la supervivencia del microorganismo, siendo este efecto más notable en jugos de naranja frescos lo cual puede deberse al contenido de ácidos orgánicos así como de otras sustancias antimicrobianas propias del alimento y por factores extrínsecos mencionados con anterioridad.

5.6 Evaluación del efecto antimicrobiano de compuestos de origen de plantas en combinación con un ácido orgánico y una sal sobre la flora nativa y características fisicoquímicas de jugos de mango y naranja frescos durante 21 días de almacenamiento a 5° C.

Finalmente se estudió el efecto de las sustancias seleccionadas sobre la flora nativa y características fisicoquímicas de los jugos frescos. Se añadió la combinación de sustancias que

resultó ideal para reducir los niveles de patógenos estudiados y se incubaron por 21 días a 5°C, los resultados obtenidos se muestran en las figura 11-14 y las tablas 9 y 10.

5.6.1 Evaluación del efecto antimicrobiano en jugos de naranja frescos.

En la figura 11 se observa el pH medido durante el tiempo de almacenamiento para jugos de naranja tratados y no tratados con los antimicrobianos (*ginseng* 2%, ácido málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05%). Observándose que el pH se mantuvo en el tiempo para los jugos con tratamiento con valores mínimos de $3,28 \pm 0,01$ y máximos de $3,54 \pm 0,08$, detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los jugos controles (sin antimicrobianos) donde el pH inicial (0 días) es de $3,93 \pm 0,04$ valor superior al obtenido en los jugos con tratamiento, debido a la adición de ácido málico en los últimos, además se observó una tendencia a disminuir el pH al avanzar el tiempo de almacenamiento en los jugos controles, lo cual puede deberse al efecto de los productos del metabolismo de la flora nativa del jugo, la cual se ve inactivada en jugos con tratamiento. Los valores obtenidos en jugos de naranja se encuentran entre los intervalos reportados por Gebdhart (1972), que indica un pH entre 3,0 – 4,5 para el zumo de naranjas.

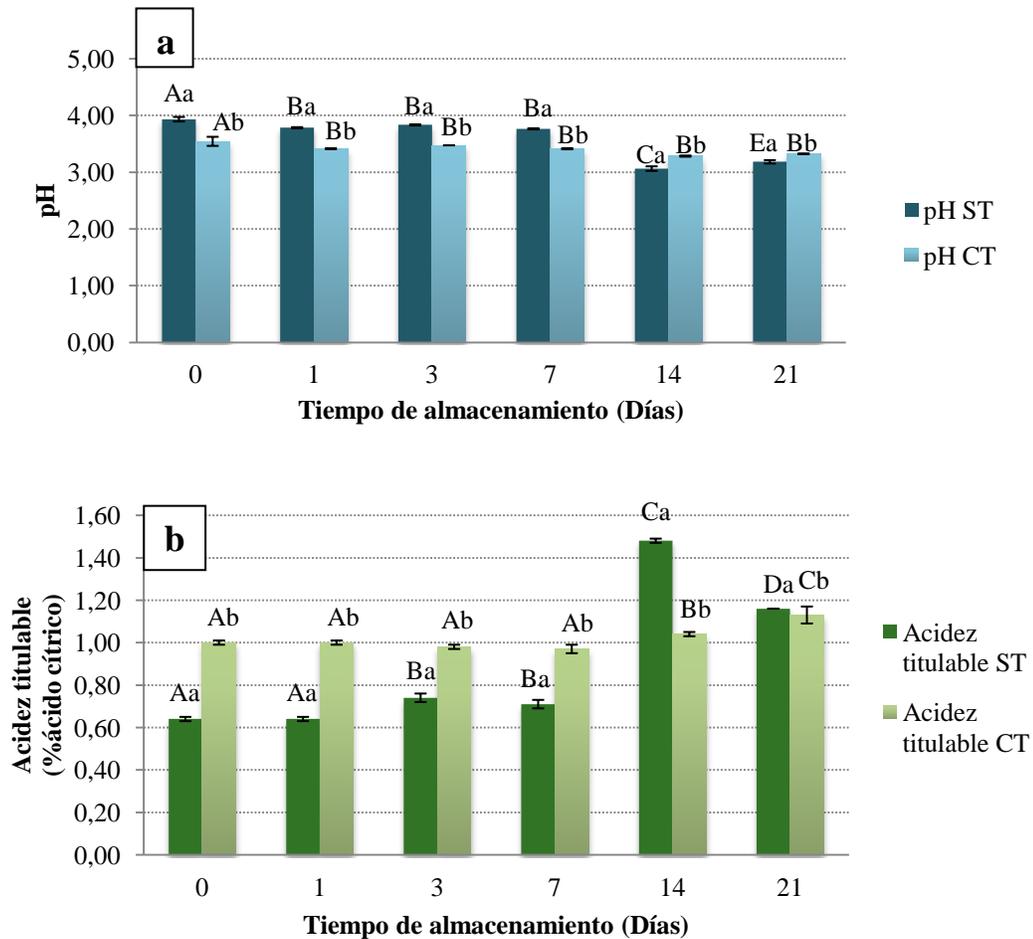


Figura 11. Cambios en los parámetros pH (a) y acidez titulable (b), de jugo de naranja tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C por 21 días. Con tratamiento (CT) (*Ginseng* 2%, Sorbato de Potasio 0,05%, Ácido málico 0,5%), Sin tratamiento (ST) (controles). Las letras mayúsculas (A, B, C, D, E) sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de almacenamiento. Las letras minúsculas (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos por cada tiempo de almacenamiento. Los valores son el promedio de dos determinaciones realizadas por duplicado \pm desviación estándar ($n=4$).

Los valores de acidez titulable expresados en gramos de ácido cítrico por cada 100mL de jugo de naranja con tratamiento se mantienen sin diferencias significativas ($p < 0,05$) hasta los 7 días y luego cambian mientras que entre tratamientos se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) desde el principio del experimento, lo cual se muestra en la gráfica b de la figura 11. Los jugos controles presentaron una variación de acidez de $0,64 \pm 0,01$ inicialmente (0 días) a $1,16 \pm 0,00$ al finalizar el tiempo de almacenamiento, evidenciándose la presencia de bacterias productoras de metabolitos reductores del pH y aumento de la acidez como es el caso de las bacterias ácido lácticas.

En el gráfico a de la figura 12 se expresan los valores obtenidos durante el tiempo de almacenamiento (21 días) a 5°C de los sólidos solubles expresados como $^{\circ}\text{Brix}$. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los jugos con antimicrobianos y los jugos controles. Además se encontró que los sólidos solubles tendieron a aumentar ligeramente a medida que pasaba el tiempo. Valores reportados por Palomino (2003) de sólidos solubles en jugo de naranja comercial se encuentra entre $10,20$ - $10,80$ $^{\circ}\text{Brix}$, valores inferiores a los obtenidos inicialmente para jugos controles ($11,68 \pm 0,07$) y jugos con tratamiento ($11,17 \pm 0,09$). Estas diferencias posiblemente se deben a la variedad de naranja utilizada por cada autor.

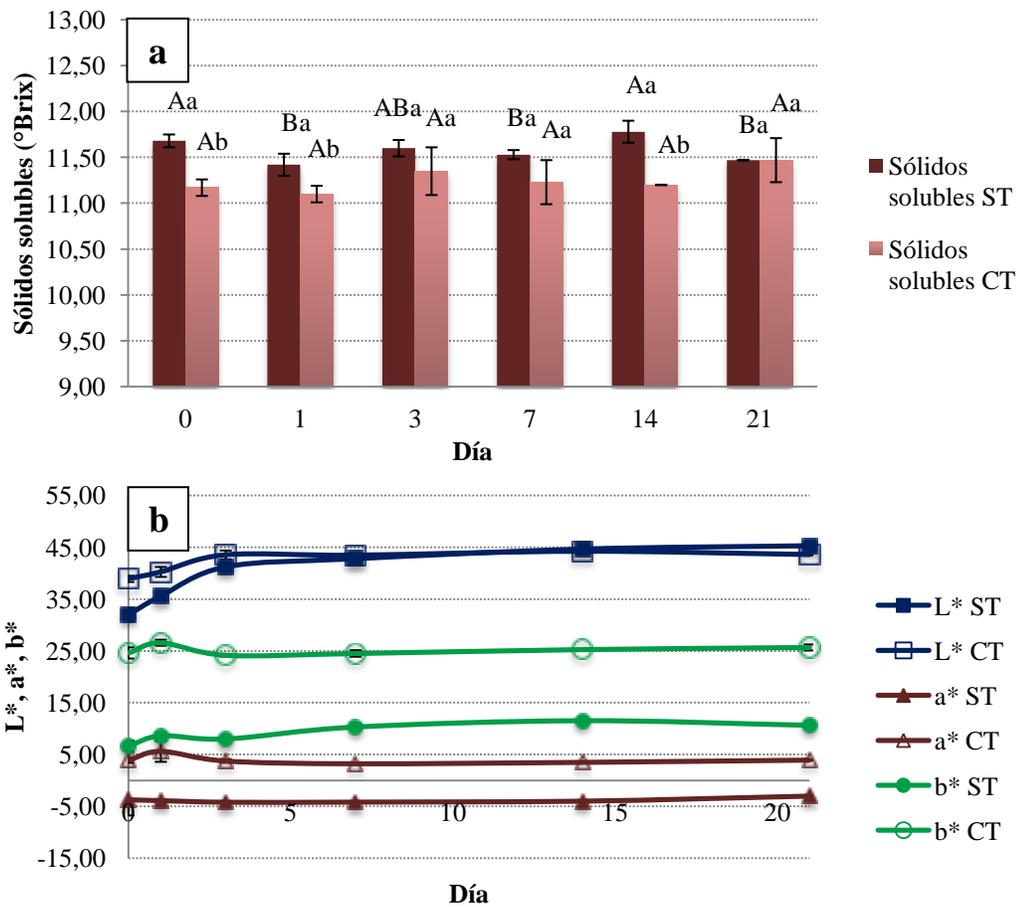


Figura 12. Cambios en los parámetros sólidos solubles (a) y color (b), en jugo de naranja tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C. Con tratamiento (CT) (*Ginseng* 2%, Sorbato de Potasio 0,05%, Ácido málico 0,5%), Sin tratamiento (ST) (controles). Las letras mayúsculas (A, B) sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de almacenamiento. Las letras minúsculas (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los agentes antimicrobianos. Los valores son el promedio de seis determinaciones \pm desviación estándar.

Las variaciones de los parámetros luminosidad (L^*) y cromacidad (a^* y b^*) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los jugos controles y los jugos con antimicrobianos, expresado en el gráfico b de la figura 12, donde se observa que los parámetros con mayores diferencias son el a^* y b^* , indicando que el jugo control presentó una menor intensidad de color que los jugos con aditivos añadidos, lo cual sugiere que los compuestos empleados impartieron un aumento en la coloración.

En el presente estudio se evaluó además la actividad microbiológica en el tiempo (0, 1, 3, 7, 14, y 21 días) de almacenamiento en refrigeración (5°C) de jugos de naranja tratados y sin tratar mediante el conteo de los microorganismos aerobios mesófilos, aerobios psicrófilos, mohos y levaduras, con el fin de evaluar la calidad o vida útil microbiológica de los jugos. Los aspectos climáticos y agrícolas que afectan al ecosistema microbiano son ubicación geográfica, historia de precipitación, viento, prácticas de riego, precosecha, cosecha, y las prácticas post-cosecha, así como también presencia de insectos, animales y aves. En la Tabla 9 se muestra la evolución de la flora nativa en jugos de naranja con antimicrobianos y jugos controles.

Se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los jugos tratados y sin tratar demostrando el efecto inhibitorio ejercido por los agentes antimicrobianos añadidos al jugo. Además se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de incubación las poblaciones de los diferentes microorganismos aumentan principalmente en los jugos sin tratamiento.

Tabla 9. Evolución de la flora nativa en jugos de naranja (*Citrus sinensis* L.) var. “Valencia” tratados y no tratados durante 21 días de almacenamiento a 5°C.

Tiempo (días)	Jugo de naranja (control)			Jugo de naranja tratado con antimicrobianos *		
	Aerobios mesófilos ¹	Psicrófilos ¹	Mohos y levaduras ¹	Aerobios mesófilos ¹	Psicrófilos ¹	Mohos y levaduras ¹
	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)
0	<1,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Aa}
1	<1,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Aa}
3	2,90±0,03 ^{Ba}	2,04±0,06 ^{Ba}	2,29±0,40 ^{Ba}	<1,00 ^{Ab}	<1,00 ^{Ab}	<2,00 ^{Ab}
7	3,56±0,08 ^{Ca}	3,19±0,41 ^{Ca}	2,58±0,68 ^{Ba}	<1,00 ^{Ab}	<1,00 ^{Ab}	<2,00 ^{Ab}
14	4,94±0,02 ^{Da}	5,29±0,05 ^{Da}	4,82±0,03 ^{Ca}	<1,00 ^{Ab}	3,03±0,11 ^{Bb}	<2,00 ^{Ab}
21	6,10±0,02 ^{Ea}	6,24±0,09 ^{Ea}	4,06±2,38 ^{BCa}	<1,00 ^{Ab}	2,91±0,04 ^{Bb}	2,63±0,73 ^{Bb}

* Una combinación de sorbato de potasio 0.05%, ácido málico 0.5% y ginseng 2% fue usado como agente microbiano.

¹ Los valores son el promedio de dos determinaciones por duplicado (n= 4) ± desviación estándar

Letras mayúsculas (A, B, C, D, E) en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) durante el tiempo de almacenamiento.

Letras minúsculas entre columnas por microorganismo indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p<0,05)

5.6.2 Evaluación del efecto antimicrobiano en jugos de mango frescos.

En el gráfico a de la figura 13 se observa el pH medido durante el tiempo de almacenamiento para jugos de mango tratados y no tratados con los antimicrobianos (*ginseng* 2%, ácido málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05%). Observándose que el pH se mantuvo en el tiempo para los jugos con tratamiento con valores iniciales (0 días) de $3,14 \pm 0,05$ y finales (21 días) de $3,46 \pm 0,01$. Por otra parte, se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los jugos con antimicrobiano y jugos sin antimicrobianos (controles), donde el pH del jugo control inicialmente (0 días) es de $4,72 \pm 0,06$ valor superior al obtenido en los jugos con tratamiento, debido a la adición de ácido málico en los últimos, además se observó una tendencia a disminuir el pH al avanzar el tiempo de almacenamiento en los jugos controles, lo cual puede deberse al efecto de los productos del metabolismo de la flora nativa del jugo, semejante a lo obtenido en jugos de naranja controles, la cual se ve inhibida en jugos con tratamiento.

La acidez titulable expresada en gramos de ácido cítrico por cada 100mL de jugo de mango con tratamiento se mantiene sin diferencias significativas ($p < 0,05$) hasta el tercer día de almacenamiento observándose una tendencia a aumentar en el tiempo restante, además entre tratamientos se determinaron diferencias significativas ($p < 0,05$) desde el inicio del tiempo de almacenamiento, lo cual se muestra en la gráfica b de la figura 13, con valores iniciales de $0,16 \pm 0,02$ para jugos controles y $0,37 \pm 0,01$ para jugos con tratamiento, debido a la adición de ácido málico en los últimos.

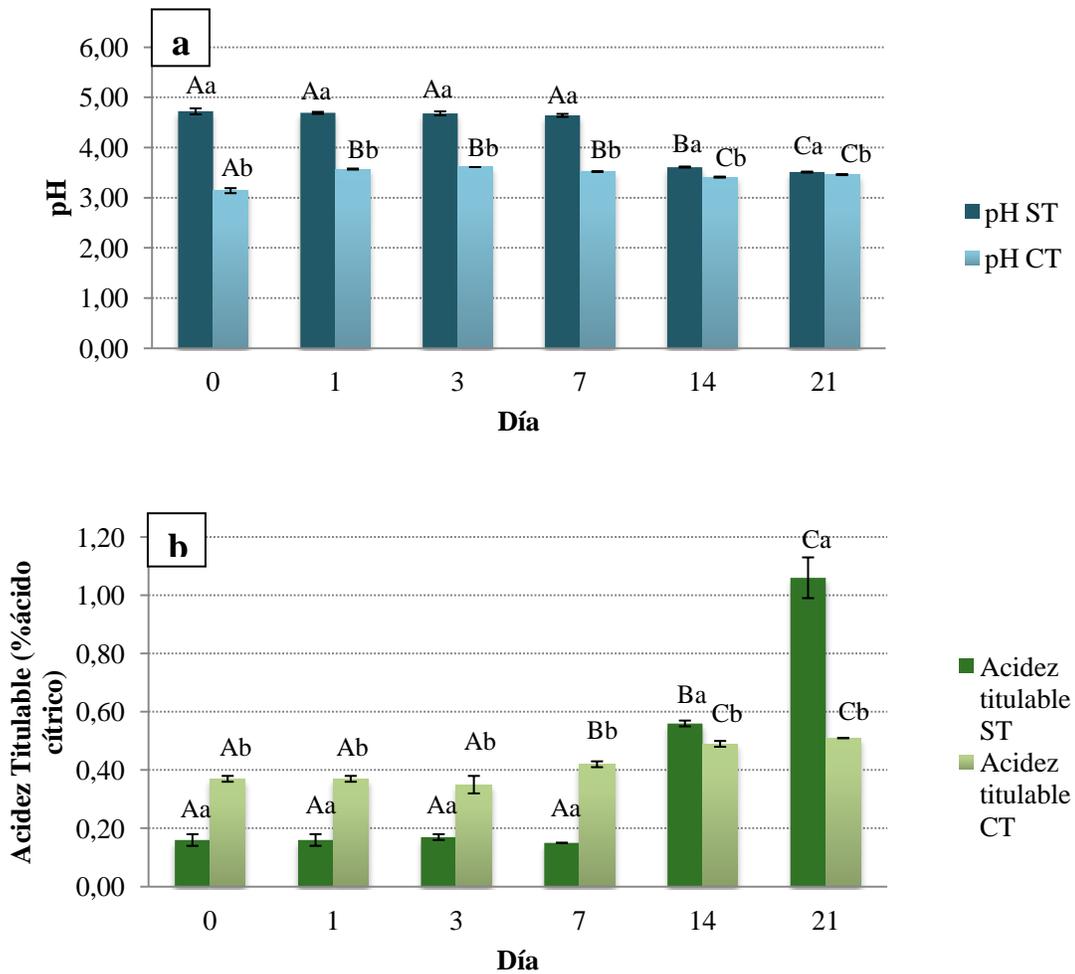


Figura 13. Cambios en los parámetros pH (a) y acidez titulable (b), en jugo de mango tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C. Con tratamiento (CT) (*Ginseng* 2%, Sorbato de Potasio 0,05%, Ácido málico 0,5%), Sin tratamiento (ST) (controles). Las letras mayúsculas (A, B, C) sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de almacenamiento. Las letras minúsculas (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los agentes antimicrobianos por cada tiempo de almacenamiento. Los valores son el promedio de seis determinaciones \pm desviación estándar.

En la figura 14 se muestran los valores obtenidos de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) y de color (L^* , a^* y b^*) determinados en jugos de mango con tratamiento y sin tratamiento (controles). En el gráfico a de la figura 14 se observa la variación de los sólidos solubles, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados en jugos de mango. Se observa que la composición de sólidos solubles tiende levemente a aumentar al avanzar el tiempo de almacenamiento en jugos con tratamiento, lo cual puede indicar degradación de carbohidratos como almidones por hidrólisis ácida aumentando el contenido de sólidos solubles o azúcares.

Los parámetros de luminosidad y cromaticidad en jugos de mango con y sin antimicrobianos se muestran en el gráfico b de la figura 14, determinándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los parámetros estudiados (L^* , a^* y b^*) entre tratamientos, estableciéndose un aumento en la luminosidad (L^*) y en el color rojo ($+a^*$) en los primeros 14 días de almacenamiento en los jugos con tratamiento, los cuales tienden a disminuir ligeramente al avanzar el tiempo restante de almacenamiento, indicando que los antimicrobianos empleados favorecen tanto la luminosidad como el color en los jugos de mango.

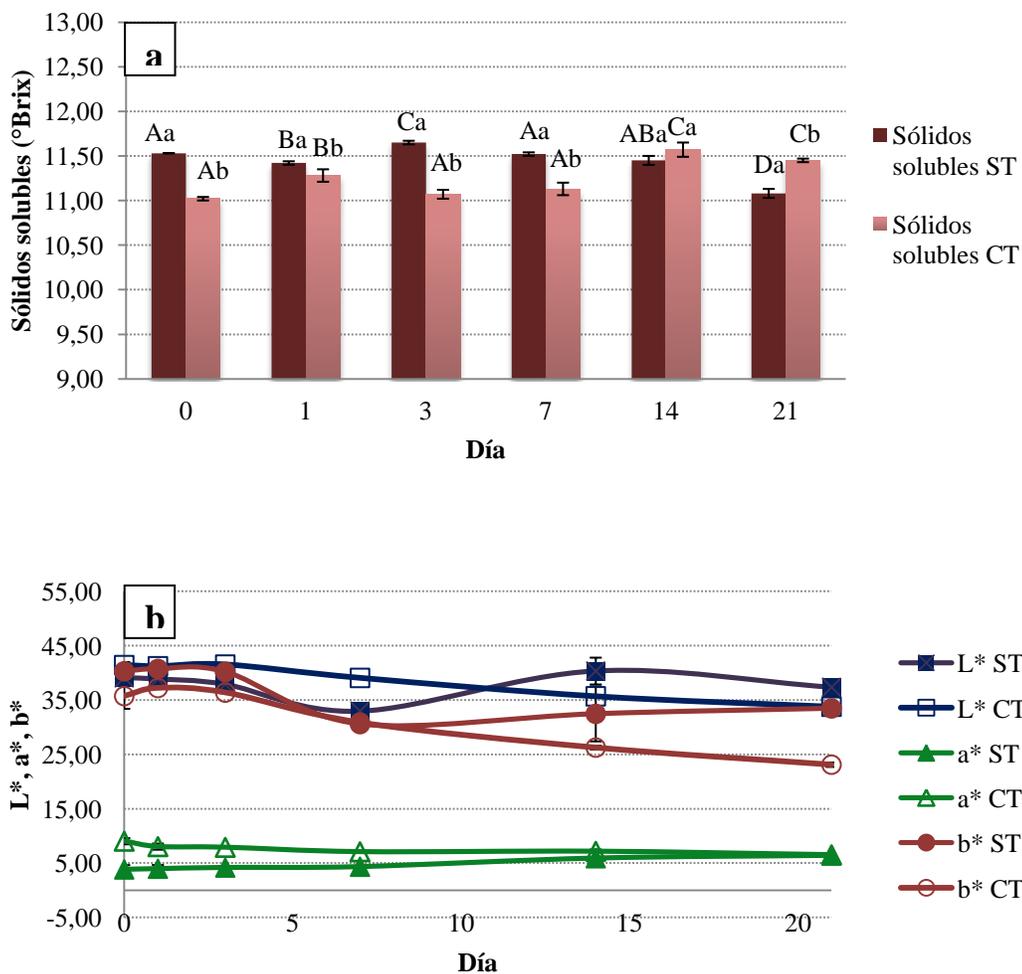


Figura 14. Cambios en los parámetros sólidos solubles (a) y color (b), en jugo de mango tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C. Con tratamiento (CT) (*Ginseng* 2%, Sorbato de Potasio 0,05%, Ácido málico 0,5%), Sin tratamiento (ST) (controles). Las letras mayúsculas (A, B, C, D) sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de almacenamiento. Las letras minúsculas (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los agentes antimicrobianos por cada tiempo de almacenamiento. Los valores son el promedio de seis determinaciones \pm desviación estándar.

A fin de conocer la calidad microbiológica de jugos de mango, se realizaron determinaciones de microorganismos aerobios mesófilos, aerobios psicrófilos, mohos y levaduras, en el tiempo (0, 1, 3, 7, 14, y 21 días) de almacenamiento en refrigeración (5° C) de jugos de mango tratados y sin tratar. En la Tabla 10 se muestra la evolución de la flora nativa en jugos de mango con antimicrobianos y sin antimicrobianos añadidos.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a partir del primer día de almacenamiento a 5°C hasta el día 21 entre los jugos tratados y sin tratar evidenciándose la actividad antimicrobiana de los compuestos empleados en los jugos con tratamiento. Dichas diferencias se observan principalmente en el aumento de las poblaciones de microorganismos en los jugos a los cuales no se les añadieron los compuestos antimicrobianos señalados.

Tabla 10. Evolución de la flora nativa en jugo de mango (*Mangifera indica L.*) var. “Haden” tratado y sin tratar con antimicrobianos durante el almacenamiento a 5°C por 21 días.

Tiempo (días)	Jugo de mango sin antimicrobianos			Jugo de mango con antimicrobianos*		
	Aerobios mesófilos ¹	Psicrófilos ¹	Mohos y levaduras ¹	Aerobios mesófilos ¹	Psicrófilos ¹	Mohos y levaduras ¹
	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)
0	<1,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Aa}
1	2,41±0,07 ^{Ba}	<1,00 ^{Aa}	2,23±0,29 ^{Ba}	<1,00 ^{Ab}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Ab}
3	2,45±0,05 ^{Ba}	<1,00 ^{Aa}	2,15±0,17 ^{Ba}	<1,00 ^{Ab}	<1,00 ^{Aa}	<2,00 ^{Ab}
7	3,62±0,04 ^{Ca}	1,18±0,10 ^{Ba}	2,00±0,20 ^{Ba}	<1,00 ^{Ab}	<1,00 ^{Ab}	<2,00 ^{Ab}
14	4,68±0,09 ^{Da}	3,41±0,05 ^{Ca}	2,50±0,58 ^{Ba}	<1,00 ^{Ab}	<1,00 ^{Ab}	<2,00 ^{Ab}
21	6,99±0,02 ^{Ea}	5,26±0,12 ^{Da}	2,22±0,26 ^{Ba}	<1,00 ^{Ab}	2,20±0,03 ^{Ab}	<2,00 ^{Ab}

*Una combinación de sorbato de potasio al 0,05%, ácido málico al 0,5% y ginseng al 2% fue añadida como antimicrobianos.

¹ Los valores son el promedio de dos (2) determinaciones en duplicado (n=4) ± Desviación estándar

Letras mayúsculas (A, B, C, D, E) en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) durante el tiempo de almacenamiento.

Letras minúsculas diferentes entre columnas por microorganismo indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p<0,05)

A partir de los resultados obtenidos de la efectividad antimicrobiana así como de la constancia en los parámetros físicos químicos del tratamiento aplicados tanto en jugos de naranja como en jugos de mango en el período del almacenamiento durante 21 días a 5°C, se observó que las características como pH y acidez titulable se mantienen casi constantes en el tiempo de almacenamiento, en cuanto a color se determinó un aumento inicial principalmente en los índices de luminosidad y color rojo, además se observó que los pigmentos responsables del color amarillo, naranja y rojo se mantienen durante el período de vida útil analizado en contraste a la

disminución de dichos índices (a* y b*) en los jugos controles. Por otra parte la inhibición de la flora nativa en jugos de naranja tratados fue bastante notable, los psicrófilos, mohos y levaduras fueron inactivados hasta el día 14 y 21 respectivamente con contajes de 3,03 y 2,63 unidades logarítmicas decimales al culminar el tiempo de almacenamiento, a diferencia de la inhibición de aerobios mesófilos en el transcurso y en su totalidad del tiempo de almacenamiento. En cambio en jugos de mango la inhibición de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras por parte de los antimicrobianos empleados fue efectiva en la totalidad del tiempo de almacenamiento (21 días), a diferencia de los microorganismos psicrófilos los cuales se detectaron a partir del día 21 con un nivel de $2,20 \pm 0,03$ unidades logarítmicas decimales, a diferencia del aumento de las poblaciones de los microorganismos evaluados en los jugos sin tratamiento.

5.7 Evaluación sensorial de jugos de mango y naranja frescos con y sin antimicrobianos añadidos.

La evaluación sensorial se realizó aplicando una prueba sensorial afectiva a jugos de mango y naranja tratados y no tratados con los antimicrobianos (*ginseng* 2%, ácido málico 0,5%, sorbato de potasio 0,05%), empleando una escala hedónica del 1 (me disgusta mucho) al 9 (me gusta mucho) con un panel piloto de consumidores de 30 personas no entrenadas, en una edad comprendida entre 20 y 60 años, con la que se evaluaron atributos como olor, color, sabor, acidez y apreciación global. En la tabla 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos para la aceptación de jugos de mango y naranjas tratados y no tratados con los compuestos antimicrobianos.

Tabla 11. Evaluación sensorial del jugo de mango tratado y sin tratar con antimicrobianos el mismo día de su preparación.

Atributos	Valores ¹	
	Jugo de mango sin antimicrobianos	Jugo de mango con antimicrobianos*
Olor	7,66 ± 2,44 ^a	8,40 ± 2,31 ^a
Color	8,72 ± 1,44 ^a	7,06 ± 1,38 ^a
Sabor	7,76 ± 2,05 ^a	6,16 ± 1,94 ^a
Acidez	5,62 ± 1,98 ^a	8,74 ± 2,47 ^b
Global	7,08 ± 2,42 ^a	4,70 ± 2,44 ^b

*Una combinación de sorbato de potasio al 0,05%, ácido málico al 0,5% y ginseng al 2% fue añadida como antimicrobianos.

¹Los valores son el promedio de 30 determinaciones ± Desviación Estándar

Letras minúsculas diferentes entre columnas por atributo indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p<0,05)

A partir de los valores provenientes de la prueba sensorial de los jugos de mango con y sin tratamiento, preparadas el mismo día se puede concluir que hay diferencias entre ambas muestras en cuanto a la aceptación, observándose que el sabor, el olor y el color no mostraron diferencias significativas entre jugos tratados y no tratados, sin embargo el atributo acidez y la aceptación global si mostraron diferencias estadísticamente significativas (p<0,05), con una mayor aceptación global en jugos de mango no tratados. Este resultado podría ser atribuido al hecho de que los jugos no contenían azúcar añadida lo que permitió que se detectara más fácilmente la característica de acidez, la cual fue la que influyo notablemente en la aceptación por parte del consumidor.

En la tabla 12 se muestra la aceptación en jugos de naranja con y sin antimicrobianos añadidos, evidenciándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el atributo acidez, siendo éste más aceptado en jugos sin tratamiento, asimismo no se determinaron diferencias en cuanto a los demás atributos, no obstante la aceptación global de ambos tipos de muestra es bastante baja siendo menor para jugos de naranja con antimicrobianos añadidos. Este resultado puede ser consecuencia de la materia prima utilizada para la elaboración del jugo, ya que el valor promedio de aceptación del jugo control (sin antimicrobianos) se encontró por debajo de 5,00 que sería el punto medio en la escala hedónica empleada.

Tabla 12. Evaluación sensorial del jugo de naranja tratado y sin tratar con antimicrobianos el mismo día de su preparación.

Atributos	Valores ¹	
	Jugo de naranja sin antimicrobianos	Jugo de naranja con antimicrobianos*
Olor	6,82 ± 2,03 ^a	7,92 ± 2,96 ^a
Color	8,32 ± 2,04 ^a	7,34 ± 2,07 ^a
Sabor	7,10 ± 2,20 ^a	6,26 ± 2,46 ^a
Acidez	8,02 ± 2,58 ^a	5,18 ± 1,76 ^b
Global	4,64 ± 2,72 ^a	2,15 ± 2,48 ^a

*Una combinación de sorbato de potasio al 0,05%, ácido málico al 0,5% y ginseng al 2% fue añadida como antimicrobianos.

¹Los valores son el promedio de 30 determinaciones ± Desviación Estándar

Letras minúsculas diferentes entre columnas por atributo indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

6. CONCLUSIONES

- La totalidad de los extractos de plantas estudiados (*Aloe vera*, extracto de semillas y cáscara de uvas rojas, *Ginkgo biloba* y *Ginseng*) mostraron actividad antimicrobiana contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 pero en diferentes niveles, siendo el *Ginseng* el que resultó más efectivo.
- Los tratamientos con compuestos antimicrobianos aplicados según un diseño factorial de múltiples niveles que resultaron más efectivos fueron aquellos que incluían las mayores concentraciones de ácido málico (0,5%), sorbato de potasio (0,05%) y *Ginseng* (2%), determinándose un efecto sinérgico bactericida al emplear las sustancias en conjunto, siendo el efecto mucho mayor que al emplear individualmente cada antimicrobiano.
- La combinación de compuestos antimicrobianos que de acuerdo a los resultados del diseño factorial multinivel resultó más efectiva contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 en jugos de naranja y mango filtrados y esterilizados fue: *ginseng* 2%, ác. málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05%.
- Reducciones de la población de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul hasta niveles indetectables en jugos de naranja y mango frescos almacenados a 5°C por 21 días fueron encontradas a los 0 y 1 día de almacenamiento respectivamente.
- *E. coli* O157:H7 resultó ser más resistente al tratamiento con *ginseng* 2%, ác. málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05% en jugos de naranja y mango frescos almacenados a 5°C por 21 días observándose una reducción total de la población a los 7 días.
- El empleo de *ginseng* 2%, ác. málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05% en jugos de naranja almacenados por 21 días a 5°C mostró un efecto bactericida en poblaciones de

aerobios mesófilos, y una inhibición del crecimiento en psicrófilos, mohos y levaduras, demostrando aumentar la vida útil de este producto.

- El empleo de *ginseng* 2%, ác. málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05% en jugos de mango almacenados por 21 días a 5°C mostró un efecto bactericida en poblaciones de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, mientras que solo inhibió el crecimiento de psicrófilos, demostrando aumentar la vida útil de este producto.
- Los parámetros fisicoquímicos como pH y acidez titulable de los jugos de frutas tratadas se mantuvieron casi constantes en el tiempo, debido a que el tratamiento con sustancias antimicrobianas retrasó el proceso de senescencia del jugo e inhibió el crecimiento de la flora nativa.
- Los índices de color L*, a* y b* aumentaron significativamente en los jugos de frutas tratados con los antimicrobianos, favoreciendo las características como luminosidad, color amarillo y rojo principalmente.
- Los resultados obtenidos en el estudio de evaluación sensorial demostraron que el tratamiento con *ginseng* 2%, ác. málico 0,5% y sorbato de potasio 0,05% influyó en la aceptación de los jugos de mango y naranja por el consumidor, siendo el atributo más afectado la acidez.

7. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar más estudios para evaluar el efecto antimicrobiano de diferentes compuestos de origen natural, aplicados solos o en combinación con otros métodos de conservación para garantizar la calidad e inocuidad y reducir el impacto sobre los atributos sensoriales de los jugos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ahn, J., Grün, I.U., Mustapha, A. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and ground beef. *J. Food Prot.* 67:148-155.
- ❖ Anaya, A. L. (2003). *Ecología química*. México: Plaza y Valdes.
- ❖ Aranceta, J., & Pérez-Rodrigo, C. (2006). *Frutas, verduras y salud*. Barcelona, España: Elsevier, MASSON, S.A.
- ❖ Ariza Flores, R., Tejacal, I.A., Beltrán, M.N., Ambriz Cervantes, R., Lugo Alonso, A., Barrios Ayala, A., Barbosa, F. (2010). Calidad de los frutos de naranja "valencia" en Morelos, México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*; 11148-153. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=81315809006> [Consultado: 26 de junio de 2011].
- ❖ Avilan, L., & Rengifo, C. (1987). *Los cítricos*. Caracas, Venezuela: Editorial América.
- ❖ Avilan, L., Leal, F., & Escalante, E. (1981). Áreas potenciales para el desarrollo de diferentes especies frutícola en el país. II. El Mango. *Revista de la Facultad de Agronomía Maracay, Venezuela. Vol. 12* , 123-135.
- ❖ Azocar, J. (1977). Caracterización fisicoquímica de cuatro variedades de mango y su utilización en la fabricación de néctares enlatados. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- ❖ Badui, S. (1990). *Química de los Alimentos*. México: Alhambra Mexicana. Segunda Edición.
- ❖ Banwart, G.J. (1989). *Basic Food Microbiology*, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.
- ❖ Barreiro, J., & Sandoval, A. (2006). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. Caracas, Venezuela: Equinoccio.
- ❖ Bello, J. (2005). *Calidad de vida, alimentos y salud humana: fundamentos científicos*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- ❖ Bello, J. (2000). *Ciencia bromatológica. Principios generales*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- ❖ Berk, A., y Lodish, H. (2006). *Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana. Quinta edición.
- ❖ Beuchat, L.R., Golden, D.A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology* 43, 134-142.
- ❖ Beuchat, L.R. (2001). Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. En: *Microbial Food Contamination*. Wilson CL, S Droby. (Ed.). CRC Press. London, UK. Chap. 11: 149-169.
- ❖ Beuchat, L. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection. Vol. 4* , 413-423.
- ❖ Bordas, J. (1984). Evaluación de naranjadas comerciales vendidos en la zona metropolitana (II). Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela
- ❖ Center for Disease Control and Prevention (CDC), (2007). *Annual Listing of Foodborne Disease Outbreaks, United States, 1990-2004*. http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks /outbreak _data.htm [Consulta: 30 de Octubre de 2010].
- ❖ Ceylan, E., Fung, D.Y.C (2004). Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Sci.* **69**: FMS102-106.

- ❖ Corbo, M.R., Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., Guerzoni, M.E. (2000). Effects of hexanal, trans-2-hexenal, and storage temperature on shelf life of fresh sliced apples. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2401-2408.
- ❖ Corbo, M., Campaniello, D., & D'Amato, D. (2005). Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* in fresh-sliced cactus-pear fruit. *Journal of Food Safety* **25** , 157-162.
- ❖ COVENIN. (1977). Norma Venezolana 1151-77. Frutas y Productos derivados. Determinación de la acidez. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela
- ❖ COVENIN. (1983). Norma Venezolana 924-83. Frutas y Productos derivados. Determinación de sólidos solubles por refractometría (1era. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
- ❖ COVENIN. (1985). Norma Venezolana 1030-85. Jugos y néctares. Características generales (1era. Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
- ❖ COVENIN. (1985). Norma Venezolana 2278-85. Alimentos comercialmente estériles. Evaluación de la esterilidad comercial. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.
- ❖ Cubero, N., Monferrer, A., & Villallta, J. (2002). *Aditivos Alimentarios*. Madrid, España: Mundi-Presa Libros, S.A.
- ❖ Davidson, P.M., Parish, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Tech.* **43**:148-155.
- ❖ Davidson, P.M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *In*: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington DC: ASM Press. p 520 - 556.
- ❖ Deroever, C. (1998). Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh cut produce. *Food Control* **9**, 321–347.
- ❖ Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista española de quimioterapia*. Vol. 16 (nº4) , 385-393.
- ❖ Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T.(1997). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Whashington D.C.: ASM Press.
- ❖ D'Amore, P. (2010). *Control de microorganismos patógenos y deteriorativos en naranja (Citrus sinensis L.) y mango (Mangifera indica L.) frescos cortados usando sustancias antimicrobianas naturales*. Caracas, Venezuela: Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
- ❖ FAO. (2004). Proposed draft minimum brix levels for reconstituted juices and reconstituted purées and minimum juice and/or purée content for fruit nectars (% V/V) - lemon, lime, orange and pineapple juices. *Codex Alimentarius Commission, CX/FJ 04/5-Add.1* , 1-10.
- ❖ Fernandes, J., Gomes, F., Couto, J. A., & Hogg, T. (2007). The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Science direct. Food control* **18** , 1477–1483.
- ❖ Food and Drug Administration (1998)a. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; food labelling: *Warning and notice statements; labelling of juice products; final rules*. *Fed. Regist.* **63**, 37029–37056.
- ❖ Food and Drug Administration. (1998)b. *Food labeling: warning and notice statements; labeling of juice products*. *Federal Register* **63**:20486–20493.
- ❖ Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E. (2004). Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem.* **52**: 6042–6048.
- ❖ Gebdhart, L. (1972). *Microbiología*. México: Nueva Editorial Interamericana, S.A.
- ❖ Gil, A., & Ruiz, M. (2010). *Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Madrid, España: Editorila Médica Panamericana Segunda Edición.
- ❖ Gómez, C. (2006). Respuesta celular al estrés. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48 (2) , 162-172.

- ❖ Hanf, V., and Gonder, U. 2005. Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. Review. *Eur. J. Obstetrics Gynecol. Repr. Biol.* **123**: 139–149.
- ❖ Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garrett, E. H., Busta, F. F., 2003. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol 2 (supplement) Chapter III. Blackwell Publishing Professional, Iowa, pp. 78-141.
- ❖ IICA. (1999). *Estudio global para identificar oportunidades de mercado de frutas y hortalizas para los países de Centroamérica*. Guatemala: Agritrade.
- ❖ IICA. (1987). *Tecnología del Manejo de Postcosecha de Frutas y Hortalizas*. Colombia: Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA).
- ❖ INN. (1999). *Tabla de composición de alimentos para uso práctico*. Publicación No 54, Serie Cuadernos Azules, Caracas-Venezuela.
- ❖ Iu, J., Mittal, G.S., Griffiths, M.W. 2001. Reduction in levels of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by pulsed electric fields. *J. Food Prot.* **64**:964-969.
- ❖ Janisiewicz, W., Conway, W., & Leverentz, B. (1999). Biological control of postharvest decays of apple can prevent growth of *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds . *J. Food Prot.* Vol. 62 , 1372–1375.
- ❖ Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., Sakariah, K.K.(2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* **36**: 117-122.
- ❖ Jay, J. (1992). *Microbiología moderna de lo alimentos*. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA. Tercera Edición.
- ❖ Jay, J. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*. Zaragoza, España: ACRIBIA, S. A. Cuarta edición.
- ❖ Karapinar, M., Sengun, I. (2006). Antimicrobial effect of koruk (unripe grape-*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables. *Food control*.
- ❖ Kim, H., & Bhunia, A. K. (2008). SEL, a Selective Enrichment Broth for Simultaneous Growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 74, No. 15 , 4853–4866.
- ❖ Lai, S. M., Gray, J., Smith, D., Booren, A., Crackel, R., & Buckley, D. (1991). Effects of oleoresin rosemary Tertiary butyl-hydroquinone and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *J. Food Sci.* **56** , 616-620.
- ❖ Liang, Z., Mittal, G.S., Griffiths, M.W. 2002. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *J. Food Prot.* **65**:1081-1087.
- ❖ Little, E., & Marrero, J. (2001). *Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes*. San Juan, Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico, Segunda edición.
- ❖ López, A., García, M., Quintero, R., & López-Munguía, A. (2004). *Biotecnología alimentaria*. México: Editorial Limusa. Noriega Editores.
- ❖ Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2003). *Brock, Biología de Los Microorganismos*. Madrid, España: Pearson education 10ª Edición.
- ❖ Mahan, K., & Escott Stump, S. (2001). *Nutrición y dietoterapia de Krause*. . México DF: Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A.
- ❖ Mazzanti, G., Mascellino, M., Battinelli, L., & Coluccia, D. (2000). Antimicrobial investigation of semipurified fractions of Ginkgo biloba leaves. *Journal of Ethnopharmacology* **71** , 83-88.
- ❖ Mosqueda, J. (2003). Evaluación de la calidad e inocuidad microbiológica de dos pulpas de frutas sin pasteurizar: Guayaba (*Psidium guajava* L.) y lechosa (*Carica papaya* L), expandidas a nivel de supermercado. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

- ❖ Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O. (2008)a. Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. *Food Microbiol.* **25**: 479-491
- ❖ Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O. (2008)b. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **9**: 328-340
- ❖ Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O. (2008)c. Inactivation of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis in tomato juice by combining of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *J. Food Sci.* **73**: M47-M53.
- ❖ Murphy, M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. Oxford, Ohio. *Clinical microbiology reviews. Antimicrobial plant chemicals.* Vol. 12, (n°4) , 564-582.
- ❖ Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardo-Da Silva, F., & Laureano, O. (2010). Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds and Skins from Carménere and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 58 , 3591–3599.
- ❖ Ojeda, N. (2003). *Determinación de la calidad microbiológica del jugo de naranja [Citrus sinensis (L.) Obs.] expandido en puestos de ventas ambulantes del área Metropolitana de Caracas.* Caracas, Venezuela: Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
- ❖ OMS. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. *Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO.*
- ❖ Palomino, C. (2003). Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en jugo de naranja (*Citrus sinensis*) expandido en un puesto de venta ambulante del área metropolitana. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- ❖ Pao, S., Brown, E., & Schneider, K. (1998). Studies with selected pathogenic Bacteria on Freshly peeled hamlin Orange. *Journal of Food Science* Vol. **63**, No.2 , 359-362.
- ❖ Parish, M.E. (1996). Incidence of coliforms, *E. coli* and *Salmonella* associated with a citrus processing facility. *Presented at Ann. Mtg., Inst. of Food Technologists*, New Orleans, La., June 22-26.
- ❖ Parish, M.E. (1997). Public health and nonpasteurized fruit juice. *Crit. Rev. Microbiol.* **23**, 109–119.
- ❖ Planella-Villagra, I. (1983). *Agroindustria y desarrollo económico.* Bogotá, Colombia: IICA.
- ❖ Pelayo, C. (2003). Las frutas y hortalizas como alimentos funcionales. *Contactos*, **47**: 12-19
- ❖ Ramírez, J., Contreras, G., & Gómez, M. C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2005; Vol. 47, No. 3-4 , 92-101.
- ❖ Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O. (2006). Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in fruit juices. *J. Food Prot.* **69**: 1579-1586.
- ❖ Raybaudi-Massilia, R.M. 2007. Uso de sustancias antimicrobianas naturales en combinación con compuestos estabilizadores de la calidad para controlar microorganismos patógenos y extender la vida útil de las frutas frescas cortadas. Tesis de Doctorado. Universitat de Lleida. Lleida, España.
- ❖ Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O. (2009). Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control.* **20**: 105-112.
- ❖ Rhodes, P.L., Mitchell, J.W., Wilson, M.V., Melton, L.D. 2006. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. *Int. J. Food Microbiol.* **107**:281-286.
- ❖ Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **18**: 373-386.
- ❖ Rosca-Casian, O., Parvu, M., Vlase, L., Tomas, M., 2007. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia* **78**:219-222.

- ❖ Schlegel, H. G., & Zaborosch, C. (1997). *Microbiología general*. Barcelona, España: Ediciones Omega, S. A.
- ❖ Schnee, L. (1984). *Plantas comunes en Venezuela*. Caracas: Ediciones de La Biblioteca. Universidad Central de Venezuela.
- ❖ Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (1992). *Microbiología*. Barcelona, España: Reverté, S. A. Segunda edición.
- ❖ Stevens, N. (2000). *Aloe vera*. Málaga, España: Editorial Sirio, S.A. Séptima edición.
- ❖ Stratford, M., Hoffman, P.D., y Cole, M. (2000). Fruit Juices, fruit drinks and soft drinks. The microbiological Safety and Quality of Food. Lund, B., Paired-Parker, A., Tony, C. y Gould, G. Eds. Aspen Publishers INC. Vol. 1. Maryland. Usa. Cap 35. pp 839-869.
- ❖ Tapia, M. S., Alzamora S. M. y Welti, J. (1996). Combination of preservation factors applied to minimal processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36(6): 629-659.
- ❖ Tan, B.K.H, Vanitha, J. (2004). Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: A review. *Current Med. Chem.* **11**:1423-1430.
- ❖ Theivendran, S., Hettiarachchy, N.S., Johnson M.G. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. *J. Food Sci.* **71**:M39-M44.
- ❖ Ukuku, D.O., Sapers, G.M. (2001). Effect of sanitizer treatments on Salmonella Stanley attached to the surface of Cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. *J. Food Prot.* **64**: 1286-1291
- ❖ Uljas, H., & Ingham, S. (1999). Combinations of interbention Treatments Resulting in 5-log₁₀-Unit Reductiones in Numbers of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104
- ❖ Wells, J., & Butterfield, J. (1997). Salmonella contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the market place. *Plant Dis. Vol. 81* , 867–872.
- ❖ Xie, L., Hettiarachchy, N. S., Jane M. E., Johnson, M. G. (2003). Antimicrobial activity of *Ginkgo biloba* leaf extract on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* **68**: 268-270.
- ❖ Xu, L.-L., Hana, T., Wub, J.-Z., Zhanga, Q.-Y., Zhanga, H., Huanga, B.-H., y otros. (2009). Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of Panax ginseng and it sendophytic fungus. *Science direct. Phytomedicine: 16* , 609–616.
- ❖ Yuste, J., Fung, D.Y.C. (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. *J. Food Prot.* **65**: 1663-1666.
- ❖ Zambrano, D. 1989. Elaboración de tajadas de mango (*Mangifera indica* L.) variedad “Haden” de humedad intermedia con el uso de métdos combinados: I. Ósmosis-secado con aire caliente; II. Infusión-equilibración. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- ❖ Zambrano, J., Quintero, I., Álvarez, R., Hortegano, R., & Sáenz, M. (2001). Evaluación de frutos de naranjo “Valencia” provenientes de tres pisos altitudinales del estado Trujillo. *Agronomía tropical. Vol.51 (1)* , 107-117.

9. ANEXO

9.1 Diseño factorial multi-nivel

Repeticiones	Sorbato K.	Ác. Málico	Antimicrobiano	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
1	2	2	2	_____	_____
1	1	1	2	_____	_____
1	2	1	2	_____	_____
1	2	1	1	_____	_____
1	2	2	1	_____	_____
1	2	1	1	_____	_____
1	1	2	1	_____	_____
1	1	1	1	_____	_____
1	2	2	1	_____	_____
1	2	2	2	_____	_____
1	1	1	1	_____	_____
1	1	2	1	_____	_____
1	1	2	2	_____	_____
1	1	2	2	_____	_____
1	2	1	2	_____	_____
1	1	1	2	_____	_____
2	2	2	2	_____	_____
2	1	1	2	_____	_____
2	2	1	2	_____	_____
2	2	1	1	_____	_____
2	2	2	1	_____	_____
2	2	1	1	_____	_____
2	1	2	1	_____	_____
2	2	2	1	_____	_____
2	2	2	2	_____	_____
2	1	1	1	_____	_____
2	1	2	1	_____	_____
2	1	2	2	_____	_____
2	1	2	2	_____	_____
2	2	1	2	_____	_____
2	1	1	2	_____	_____

9.2 Evaluación sensorial

9.2.1 Encuesta empleada:

PRODUCTO: Jugo de Naranja ó Mango Fecha: _____

Juez n° _____

Muestra: _____

OLOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
COLOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
SABOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
ACIDEZ	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
GLOBAL	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho

Muestra: _____

OLOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
COLOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
SABOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
ACIDEZ	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
GLOBAL	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho

Muestra: _____

OLOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
COLOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
SABOR	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
ACIDEZ	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho
GLOBAL	1	9	
Me desagrada mucho	_____ _____	_____ _____	Me gusta mucho

De acuerdo a los atributos evaluados en las muestras, en qué orden de preferencia compraría los productos probados.

1° _____

2° _____

3° _____

Comentarios:

MUCHAS GRACIAS

.....

9.2.2 Tabla de números aleatorios para la designación de las muestras de la evaluación sensorial.

N° J	Muestras			Códigos		
	A	B	C			
1	A	B	C	480	582	245
2	B	A	C	368	725	492
3	C	B	A	130	011	363
4	C	A	B	167	976	001
5	A	C	B	570	763	062
6	B	C	A	921	567	295
7	A	B	C	562	955	591
8	B	A	C	301	503	392
9	C	B	A	579	157	213
10	C	A	B	475	577	418
11	A	C	B	918	011	711
12	B	C	A	553	573	884
13	A	B	C	429	360	795
14	B	A	C	365	093	948
15	C	B	A	119	975	473
16	C	A	B	085	907	595
17	A	C	B	368	905	349
18	B	C	A	011	977	584
19	A	B	C	162	342	634
20	B	A	C	056	857	765
21	C	B	A	663	578	536
22	C	A	B	164	961	595
23	A	C	B	639	969	527
24	B	C	A	334	129	243
25	A	B	C	488	336	837
26	B	A	C	525	765	008
27	C	B	A	676	382	420
28	C	A	B	742	092	463
29	A	C	B	366	916	661
30	B	C	A	921	628	342