



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

CONTROL DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y  
DETERIORATIVOS EN NARANJA (*Citrus sinensis* L.) Y MANGO  
(*Mangifera indica* L.) FRESCOS CORTADOS USANDO SUSTANCIAS  
ANTIMICROBIANAS NATURALES

**Trabajo Especial de Grado**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Patrizia D'Amore Guerra como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología

Tutor (a): Dra. Rosa Raybaudi-Massilia

CARACAS, VENEZUELA

Octubre – 2010

## I. RESUMEN

La demanda de alimentos sanos como las frutas y hortalizas frescas cortadas por parte del consumidor es cada vez mayor, debido a un aumento en la promoción del consumo de estos alimentos como parte de una dieta sana. La industria de alimentos ha respondido a dicha demanda elaborando productos frescos sometidos a un mínimo proceso que limite el crecimiento de los microorganismos y que mantenga los atributos nutricionales y sensoriales. No obstante, un manejo inadecuado de estos alimentos durante su procesamiento podría traer como consecuencia la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* y *E. coli*. Por tal motivo el objetivo principal de esta investigación fue evaluar la efectividad de sustancias antimicrobianas de origen de plantas como una alternativa para reducir los niveles de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7 en naranja variedad “Valencia” y mango variedad “Haden” frescos cortados. Para esto, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de Ginseng, *Ginkgo biloba*, Extracto de semillas y cáscaras de uvas roja y *Aloe vera* por el método de discos de papel de filtro. De estas sustancias seleccionamos Ginseng por su mayor efectividad y lo aplicamos solo o en combinación con ácidos orgánicos (cítrico o málico), una sal (sorbato de potasio) y lactato de calcio mediante un diseño factorial de múltiples niveles (2 x 2 x 2 x 4 x 2 x 2) a naranjas y mangos de madurez intermedia mediante tratamientos de inmersión por 1 a 2 minutos. La aplicación de una combinación de todos los compuestos tuvo un efecto sinérgico en la reducción de la población de los patógenos en ambas frutas, siendo las combinaciones ideales en naranja (máximas reducciones de 2,99 Log UFC/g *Salmonella* y 1,56 Log UFC/g *E. coli*): Ginseng 3%, ác. Málico 1% y sin la adición de sorbato y lactato, mientras que en mango (máximas reducciones de 2,1 Log UFC/g *Salmonella* y 2,0 Log UFC/g *E. coli*) fue Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75%. Además estas combinaciones de sustancias causaron una disminución en el crecimiento de la flora nativa, extendiendo la vida útil desde un punto de vista microbiológico. Sin embargo, algunas características físicas, químicas y sensoriales de las frutas fueron afectadas levemente. Con los resultados obtenidos se puede considerar que el uso de compuestos de origen vegetal solos o combinados resulta efectivo para reducir los niveles de microorganismos patógenos y deteriorativos en frutas frescas cortadas, logrando extender su vida útil.

## II. INTRODUCCIÓN

La demanda de alimentos sanos y frescos como las frutas y hortalizas frescas cortadas por parte del consumidor es cada vez mayor, debido a un aumento en la promoción del consumo de estos alimentos como parte de una dieta sana que previene enfermedades crónicas no transmisibles y que tiene un bajo impacto en el peso corporal. La industria de alimentos ha respondido a dicha demanda elaborando productos frescos sometidos a un mínimo proceso que inactive los microorganismos o limite su crecimiento y que mantenga los atributos nutricionales y sensoriales del producto, de forma tal de lograr productos con una vida útil más extensa. Diferentes métodos de conservación para estos alimentos han sido utilizados a lo largo del tiempo, incluyendo estos: los tratamientos térmicos, reducción de actividad de agua, disminución de pH, refrigeración y uso de antimicrobianos. Sin embargo, dadas las características más vulnerables de estos alimentos a cambios fisicoquímicos como cambios de color y textura, la aplicación de algunos de estos métodos solos ha resultado tener un fuerte impacto en sus características que se traduce en un rechazo por parte del consumidor. Por estos motivos existe una constante búsqueda de métodos alternativos de conservación que permitan lograr una extensión de la vida útil de estos productos garantizando la estabilidad de sus características fisicoquímicas y sensoriales.

Las frutas y hortalizas cuentan con una barrera protectora contra los microorganismos que es su cubierta o cáscara, sin embargo cuando son procesados, esa protección se pierde por lo que se convierten en alimentos más susceptibles a la contaminación microbiana y en posibles vehículos de microorganismos patógenos, entre los que podemos mencionar *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

Una de las alternativas para controlar los microorganismos patógenos ha sido el uso de sustancias antimicrobianas tradicionales y naturales, el cual ha demostrado ser muy efectivo. No obstante las concentraciones necesarias para garantizar una reducción significativa de los niveles de estos patógenos ha demostrado tener un importante efecto sobre los atributos sensoriales, por lo que se está recurriendo a combinaciones de distintas sustancias de forma tal de garantizar un menor impacto sobre las propiedades sensoriales de estos alimentos.

### III. ANTECEDENTES

Las frutas y vegetales frescos cortados son definidos como: frutas y vegetales frescos para consumo humano que han tenido un mínimo procesamiento y han sido alterados en su forma por pelado, cortado, descorazonado, etc., con o sin lavado antes de ser empacados para uso por parte del consumidor o establecimiento de ventas al por menor (como por ejemplo pre-cortado, empacado y ensaladas mixtas listas para comer) (USFDA, 2008).

Diferentes estudios de investigación han demostrado que el consumo de frutas tiene un efecto beneficioso en la salud y contribuye a la prevención de procesos degenerativos como la arteriosclerosis y el cáncer (Temple, 2000; Hashimoto *et al.*, 2002; Gundgaard *et al.*, 2003; Gosslau y Chen, 2004; Calderón, 2009). No obstante, existen una serie de problemas que deben ser controlados para lograr un aprovechamiento exitoso de las frutas, como son: las pérdidas postcosecha ocasionadas por el rápido deterioro durante el manejo, transporte y almacenamiento, además de los efectos causados por los procesos de pelado y cortado, los cuales incrementan la actividad metabólica y enzimática, causando oscurecimiento, ablandamiento, desarrollo de olores y sabores desagradables y deterioro microbiológico (Robles y col. 2007). Además de los cambios de calidad es indispensable controlar la incidencia de microorganismos patógenos, los cuales representan un riesgo para la salud del consumidor. Distintos brotes de enfermedades transmitidas por consumo de frutas frescas han sido reportados en los últimos años (CDC, 2008), entre los cuales se pueden señalar brotes causados por diferentes serovariedades de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, que son bacterias de origen entérico que pueden llegar a la fruta durante su cosecha y procesamiento.

Diferentes métodos de conservación pueden ser utilizados para controlar la presencia y crecimiento de patógenos en alimentos. Sin embargo, actualmente el consumidor prefiere aquellos alimentos poco tratados o de ser posible aquellos tratados con compuestos naturales que mantengan la calidad sin alterar sus atributos sensoriales significativamente.

El uso de sustancias antimicrobianas de origen natural para controlar microorganismos deteriorativos y patogénicos en frutas frescas cortadas, aplicadas en forma directa o incorporadas en recubrimientos comestibles ha sido estudiada (Raybaudi-Massilia, 2007), encontrándose estudios *in vitro* sobre el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural que han demostrado que el extracto de semilla de uva, exhibe un efecto antibacteriano sobre microorganismos como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. coagulans* y *P. aeruginosa*, mostrando ser más eficaz sobre bacterias Gram positivas que sobre Gram negativas (Jayaprakasha, 2002; Rhodes y col. 2006). De la misma forma, estudios realizados con Ginseng, *Aloe vera* y *Ginkgo biloba* demostraron que estas sustancias resultan efectivas contra microorganismos patógenos y deteriorativos (Xie y col., 2003; Ahn y col., 2004; Tan y Vanitha, 2004; Rosca-Casian y col., 2007).

### **1- Microorganismos patogénicos de importancia en frutas frescas cortadas.**

Pocos han sido los estudios de incidencia de microorganismos patogénicos en frutas frescas cortadas reportados en la bibliografía. No obstante, esto no significa que estos microorganismos no estén presentes en estos productos, de hecho existen numerosos brotes de enfermedades reportados en los últimos años asociados al consumo de frutas frescas y jugos de frutas, en los cuales los principales microorganismos involucrados han sido *E. coli* O157:H7 y diferentes tipos de *Salmonella* (Harris y col., 2003 and CDC, 2009). Por otra

parte existen numerosos trabajos de investigación que demuestran la supervivencia y crecimiento de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* y diferentes serovariedades de *Salmonella enterica* en frutas frescas cortadas, incluyendo patilla, papaya, melones, manzanas y naranjas (Raybaudi-Massilia, 2007).

## **2- Características de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella***

### ***Escherichia coli* O157:H7:**

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un organismo Gram negativo, pertenece a la microflora anaerobia facultativa del tracto digestivo de los humanos y animales de sangre caliente.

Es un microorganismo catalasa negativo, oxidasa negativa, fermenta lactosa y glucosa con gran producción de ácido y gas, no produce fluorescencia en presencia de MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido).

Se caracteriza por crecer a 37 °C, con pH a valores entre 4,02 -8,28; con una actividad de agua entre 0,951 – 0,999, rango óptimo > 0.998.

Esta asociada con enfermedades como síndrome urémico hemolítico, causante de dolor abdominal, vómito, diarrea acuosa y sanguinolenta. Puede causar la muerte, lesionando la mucosa intestinal produciendo sangrado sin reacción inflamatoria local (Doyle y col., 1997).

### ***Salmonella:***

Microorganismo aerobio y anaerobio facultativo, Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es móvil ya que posee flagelos peritricos.

*Salmonella* es una bacteria quimiorganotrófica, con la habilidad de metabolizar nutrientes por la ruta de la fermentación y la respiración. Cataboliza D-glucosa y otros carbohidratos con producción de gas. Crece en citrato como la única fuente del carbono, generalmente produciendo sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>), es oxidasa negativo y catalasa positivo. No hidroliza Urea.

Crece a una temperatura óptima de 37 °C y exhibe características psicrotróficas. Tiene la habilidad de crecer en alimentos a temperaturas de 2 a 4 °C (Doyle y col., 1997).

Es un microorganismo patógeno capaz de causar infecciones severas a nivel gástrico causando fiebre entérica, con diarrea prolongada, dolor abdominal, fiebre y dolor de cabeza. Los síntomas se manifiestan luego de un período de incubación de 7 a 28 días.

### **3- Características de las frutas en estudio**

#### **Naranja:**

Es originaria del sureste de China y norte de Birmania.

En Venezuela se conocen algunas especies de naranja como la valencia, la california y la criolla, todas estas naranjas dulces que se utilizan para el consumo fresco y para fines comerciales. También está la naranja agria que se utiliza para la extracción de aceites y en la parte ornamental.

La variedad Valencia (Figura 1) es la más importante en todo el mundo y es una de las más cultivadas en el país. Da frutos de tamaño mediano, corteza fina y consistente de superficie lisa, con pulpa de buen color y elevado contenido en zumo de sabor en ocasiones demasiado ácido y menos de seis (6) semillas por fruto. Madurez tardía, entre abril y julio. De todas las variedades comerciales, es la que posee el mayor rango de adaptación climática.



Gracias a las distintas variedades de naranjas, se puede disfrutar de esta fruta durante todo el año.



**Figura 1.** Naranja (*Citrus sinensis L*) var. Valencia.

Fuente: <http://www.naranjasvitaminadas.com>, 2010.

Entre las características más resaltantes que podemos observar en las frutas de naranja tenemos:

- Forma: fruto en forma esférica, más o menos achatado por los polos.
- Tamaño y peso: diámetro medio de 6 a 10 centímetros. Su peso oscila entre 150 y 200 gramos sin la piel.
- Color: su piel es muy coloreada y está provista de vesículas oleosas. Bajo la piel lisa o rugosa según la variedad aparece una segunda piel blanca que envuelve el fruto protegiendo la pulpa, ésta última muy esponjosa y de color anaranjado.
- Sabor: la pulpa se encuentra compuesta por 8-12 gajos alargados y curvos que proporcionan abundante jugo de sabor dulce con matices acídulos, más o menos pronunciados según la variedad.

En la Tabla N° 1 se puede observar la composición de la naranja

**Tabla N° 1. Composición porcentual de la naranja.**

<b>Composición</b>	<b>Cantidad por 100g de porción comestible</b>
Agua (g)	88,6
Energía (Kcal)	35
Proteínas (g)	0,8
Carbohidratos (g)	8,6
Lípidos (g)	Trazas
<b>Fibra</b>	
Total (g)	1,6
Soluble (g)	0,6
Insoluble (g)	1,0
<b>Vitamina</b>	
Vitamina A (µg)	13
Carotenos totales	104
α-caroteno (µg)	24
β-caroteno (µg)	52
Vitamina E (mg)	0,2
Vitamina B1 (mg)	0,1
Vitamina C (mg)	50
<b>Minerales</b>	
Calcio (mg)	36
Hierro (mg)	0,3
Fósforo (mg)	20
Sodio (mg)	3
<b>Ácidos orgánicos</b>	
Ácido cítrico (mg)	1042
Ácido málico (mg)	89

(Agusti, 2004)

### **Mango:**

El mango (Figura 2) es una fruta tropical obtenida del árbol del mismo nombre, árbol de la familia de las Anacardiáceas.



**Figura 2.** Mango (*Mangifera indica L*) var. Haden.

Fuente: <http://www.mangoecuador.org>, 2010.

Es originario del sudeste de Asia y del Himalaya, en la parte oriental de India.

En su composición destaca igualmente la presencia de una sustancia denominada mangiferina, que en animales de experimentación parece ejercer una acción inmunomoduladora, antiviral y antitumoral.

Por otra parte, el extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica L.* denominado Vimang, rico en polifenoles, ha sido utilizado en numerosos estudios de investigación, demostrándose no solo su acción antioxidante sino también su efecto analgésico y antiinflamatorio.

En la Tabla N° 2, se muestra la composición porcentual del mango. Además, dentro de sus principales características podemos señalar:

- Forma: su forma es variable, pero generalmente es ovalada o arriñonada, notoriamente aplanada, redondeada, con un hueso central grande, aplanado y con una cubierta leñosa.
- Tamaño y peso: de 4-25 centímetros de largo y 1,5-10 de grosor, su peso varía desde 150 gramos hasta los 2 kilogramos.

- Color: el color puede ser entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta, mate o con brillo. Su pulpa es de color amarillo intenso, casi anaranjado.
- Sabor: succulento, muy dulce y aromático.

**Tabla N° 2 Composición porcentual del mango**

<b>Composición</b>	<b>Cantidad por 100g por porción comestible</b>
Agua (g)	82
Energía (Kcal)	57
Proteínas (g)	0,6
Carbohidratos (g)	12,5
Lípidos (g)	0,45
<b>Fibra</b>	
Total (g)	1,7
Soluble (g)	0,63
Insoluble (g)	1,07
<b>Vitamina</b>	
Vitamina A (µg)	201
Carotenos totales	1300
α-caroteno (µg)	37
β-caroteno (µg)	1200
Vitamina E (mg)	1
Vitamina B1 (mg)	0,045
Vitamina C (mg)	37
<b>Minerales</b>	
Calcio (mg)	12
Hierro (mg)	0,4
Fósforo (mg)	13
Sodio (mg)	5
<b>Ácidos orgánicos</b>	
Ácido cítrico (mg)	264
Ácido málico (mg)	74

(Galán, 1999)

#### **4- Compuestos antimicrobianos de origen natural**

Los agentes antimicrobianos naturales, son compuestos que pueden extraerse para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y aumentar la inocuidad para el consumidor, ya que se encargan de inhibir o retardar el crecimiento de los microorganismos, pero también pueden ser letales reduciendo los niveles iniciales de los mismos (Davidson y Zivanovic, 2003).

Muchos alimentos tienen componentes que presentan actividad antimicrobiana y en estado natural dichos componentes desempeñan el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos (Raybaudi-Massilia, 2007).

Las sustancias antimicrobianas naturales pueden clasificarse dependiendo de su origen, las de origen animal incluyen proteínas, enzimas y polisacáridos; las de origen vegetal abarcan compuestos fenólicos originados de la corteza, tallo, hoja y flores, así como también los ácidos orgánicos naturalmente presentes en los frutos de las plantas; por último tenemos las producidas por microorganismos (Beuchat, 2001).

##### **4.1. *Aloe vera***

El *Aloe vera*, comúnmente conocido como sábila, es una planta suculenta semi-tropical original del norte de África que actualmente ha crecido en todo el mundo. Es una de las plantas más antiguas y populares conocidas por el hombre, es mencionada en documentos antiguos en donde se usaba junto con otras hierbas para embalsamar.

La planta de *Aloe vera* está constituida por vitaminas, minerales esenciales, proteínas, polisacáridos, enzimas y aminoácidos, todos éstos componentes constituyen el 1% de la hoja del *Aloe vera*, mientras que la mayor parte de su hoja está llena de un gel que es 99% agua.

En los años 70, se redescubrieron sus increíbles efectos sobre la piel ya que es un excelente hidratante y suministra oxígeno a las células aumentando la fuerza y la síntesis de los tejidos de la piel, por lo que tradicionalmente es usado en ungüentos y cremas para ayudar a la curación de heridas, quemaduras y psoriasis.

*Aloe vera*, también ha demostrado tener propiedades antifúngicas contra el crecimiento micelial de hongos fitopatogénicos aislados en plantas ornamentales (Rosca-Casian y col., 2007).

#### **4.2. Extracto de semillas y cáscara de uvas rojas**

Proviene de las pequeñas semillas (y ocasionalmente de la piel) de las uvas rojas.

El extracto de semillas de uvas rojas es rico en flavonoides fitoquímicos y antioxidantes que reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, actuando como neutralizadores de radicales libres en el cuerpo humano. Se cree también que el extracto de semilla de uva ayuda a combatir los problemas oculares, como la tensión ocular.

Ahn y col. (2007) publicaron que el extracto de semillas y cáscara de uvas rojas presenta actividades antimicrobianas y antioxidantes ya que estudiaron el efecto de extractos de plantas en el crecimiento microbiano, en el cambio de color y en la oxidación de los lípidos de la carne cocida y obtuvieron que el extracto redujo eficazmente el número de patógenos y retardo la pérdida de color rojo en las carnes crudas.

De igual forma 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 log de la población del microorganismo en estudio solo al exponer los vegetales al contacto del jugo de uvas rojas.

### **4.3. *Ginkgo biloba***

El *Ginkgo biloba*, es un suplemento extraído de las hojas del árbol de ginkgo, el cual se considera una de las especies de árbol existentes más antiguas. Hace casi 5.000 años éste árbol era considerado como sagrado para los monjes chinos y ya para aquel entonces era utilizado para preservar las funciones mentales.

Actualmente, hay más de 250 experimentos que demuestran que posee impresionantes cualidades terapéuticas tales como mantener y mejorar la circulación cerebral, además de ser un poderoso antioxidante que neutraliza los radicales libres que pueden dañar las células nerviosas y evita la coagulación excesiva de la sangre. Sin embargo, raramente se ha usado como un agente antimicrobiano.

Xie y col. (2003), estudiaron el efecto antimicrobiano del extracto de la hoja de *Ginkgo biloba* in vitro, sobre *Listeria monocytogenes*, estableciendo que dicho extracto es un eficaz antimicrobiano, debido a que inhibió significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes* obteniendo mejores resultados a bajas temperaturas (4° C), señalando además que en combinación con EDTA mejoraba la actividad antimicrobiana reduciendo los niveles del microorganismo hasta ser indetectable, mostrando por lo tanto un efecto sinérgico.

### **4.4. Ginseng**

La planta de ginseng es una planta medicinal con fabulosos poderes, aunque crece también en otros países, es ampliamente cultivado en Corea. Crece aproximadamente unos 60 centímetros. Posee tallos erectos desprovistos de hojas excepto en el ápice de donde surgen 4 o 5 hojas. La raíz es gruesa y en estado adulto presenta numerosas ramificaciones. Pertenece a la familia *Araliaceae*.

Los beneficios del ginseng se relacionan con la raíz de la planta, ya que la misma concentra gran parte de los nutrientes tales como minerales, vitaminas y ácidos grasos esenciales que son necesarios para el organismo. Estas cualidades hacen que el consumo del ginseng sea recomendado para tratar cuadros de fatiga ya que proporciona energía al organismo, aumenta la capacidad mental, combate el estrés y deficiencias del sistema inmune aumentando la producción de linfocitos, disminuye el colesterol y regula el nivel de azúcar en la sangre.

Los componentes activos del ginseng son los ginsenoides y los polisacáridos, con más de 28 tipos identificados hasta ahora, algunos de ellos son los responsables de la actividad antimicrobiana del ginseng. Algunos de sus polisacáridos han sido aislados, los cuales han mostrado inhibir a *Helicobacter pylori* (Tan y Vanita, 2004).



#### IV. OBJETIVOS

▪ **Objetivo general:**

Evaluar la efectividad antimicrobiana de distintas sustancias naturales para controlar microorganismos patogénicos y deteriorativos en naranjas (*Citrus sinensis* L.) y mangos (*Mangifera indica* L.) frescos cortados.

▪ **Objetivos específicos:**

- i. Evaluar el efecto antimicrobiano de distintas sustancias naturales (*Aloe vera*, extracto de semillas y cáscara de uvas rojas, *Ginkgo biloba* y Ginseng) sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7 mediante el método de difusión con discos y selección de las concentraciones ideales para aplicar a naranjas y mangos frescos cortados.
- ii. Estudiar mediante la aplicación de un diseño factorial multi-nivel el efecto de distintas combinaciones de sustancias naturales (*Aloe vera*, extracto de semillas y cáscara de uvas rojas, *Ginkgo biloba* y Ginseng) con ácidos orgánicos (málico o cítrico), una sal (sorbato de potasio) y un agente conservante de textura (lactato de calcio), sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7 previamente inoculadas en naranjas y mangos frescos cortados.
- iii. Aplicar la combinación que resulte más eficaz de una sustancia natural (*Aloe vera*, extracto de semillas y cáscara de uvas rojas, *Ginkgo biloba* y Ginseng) con un ácido orgánico (málico o cítrico), una sal (sorbato de potasio) y un agente conservante de textura (lactato de calcio) para reducir los niveles de microorganismos patogénicos a naranjas y mangos frescos cortados e

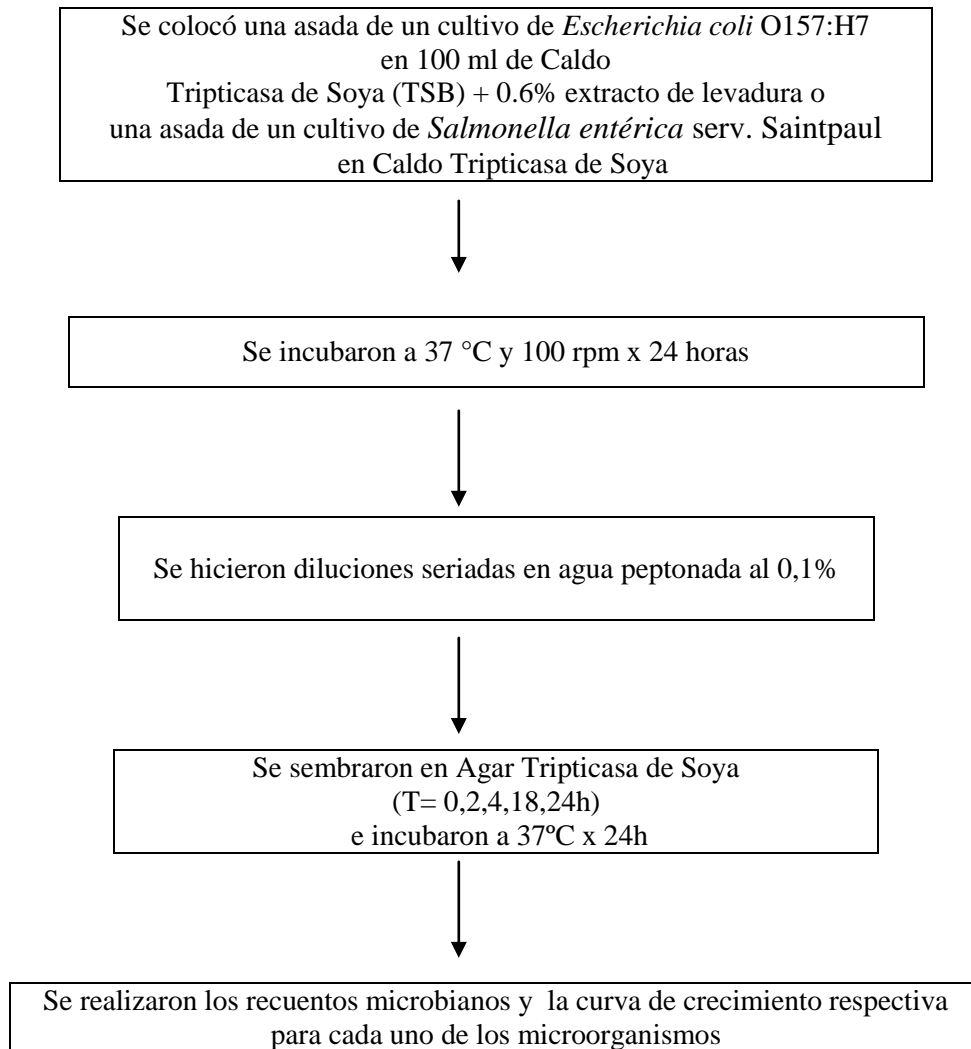
individualmente inoculados con *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7 y evaluar su efecto durante un almacenamiento de 21 días a 5 °C.

- iv. Aplicar la combinación que resulte más eficaz de una sustancia natural (*Aloe vera*, extracto de semillas y cáscara de uvas rojas, *Ginkgo biloba* y Ginseng) con un ácido orgánico (málico o cítrico), una sal (sorbato de potasio) y un agente conservante de textura (lactato de calcio) para reducir los niveles de microorganismos patogénicos a naranjas y mangos frescos cortados no inoculados y evaluar la efectividad contra la flora natural (aerobios mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras).
- v. Evaluar los parámetros físicos y químicos (textura, color y pH) de los trozos de naranjas y mangos con y sin tratamiento.
- vi. Aplicar una prueba de evaluación sensorial afectiva de aceptación utilizando rebanadas de naranja y trozos mango con y sin tratamiento.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Preparación del inóculo

Curvas de crecimiento de cepas de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 procedentes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), se realizaron para conocer el tiempo de incubación necesario para obtener cultivos puros de dichos microorganismos en fase estacionaria temprana y se utilizaron esas condiciones para los ensayos de inoculación de frutas frescas cortadas (ver Fig. 3).



**Figura 3. Metodología utilizada para la elaboración de curvas de crecimiento para *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7.**

## **2. Sustancias naturales a evaluar**

*Ginkgo biloba*, *Aloe vera* y Ginseng provenientes de Laboratorios Arcoiris, Maracay-Venezuela y extracto de semilla y cáscara de uvas rojas de Medifarm, Italia, fueron utilizadas como antimicrobianos en el presente trabajo de investigación.

## **3. Medios de cultivo**

*Agar Trypticase de Soya* (TSA) (HiMedia, Mumbai, India)

*Agar Müeller Hinton* (HiMedia, Mumbai, India) como medio para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

*Agar Entérico Hektoen* (HEA) (HiMedia, Mumbai, India) como medio selectivo y diferencial para *Salmonella*.

*Agar MacConkey Sorbitol* (SMAC) (OXOID, Cambridge, UK) como medio de diferenciación parcialmente selectivo para el aislamiento de *E. coli* O157:H7.

*Agar Plate Count* (PCA) (HiMedia, Mumbai, India) como medio de cultivo para aerobios mesófilos y psicrófilos.

*Agar Glucosa y Cloranfenicol* (CGA) (HiMedia, Mumbai, India) medio utilizado para el recuento de mohos y levaduras.

*Peptona* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para preparación de agua peptonada para las correspondientes diluciones.

#### **4. Estudio de actividad antimicrobiana de diferentes sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7**

Para determinar la actividad antimicrobiana de las sustancias naturales seleccionadas “*In Vitro*” se aplicó el método de difusión en agar descrito por Davidson and Parish (1989) (ver Figura 4), utilizando discos de papel de filtro de 1cm de diámetro impregnados en soluciones de las diferentes sustancias en concentraciones de 0, 1,0; 2.0 y 3,0 % (p/v), y posteriormente se ubicaron sobre placas de Agar Müeller-Hinton, las cuales fueron previamente inoculadas con los cultivos puros de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 (individualmente).

Las placas se incubaron a 37°C por 24h, transcurrido este tiempo, se midieron los halos de inhibición formados.

#### **5. Caracterización de las frutas**

Se escogieron frutas que se encontraban en estado de madurez intermedia de naranjas (*Citrus sinensis* L.) variedad “Valencia” y mangos (*Mangifera indica* L.) variedad “Haden”, las cuales fueron compradas en un supermercado de la ciudad de Caracas.

Se realizó el análisis físico y químico como determinaciones de: firmeza, color, acidez y pH (COVENIN 1151-77) y sólidos solubles (COVENIN 924-83) de la pulpa para verificar que la fruta se encontraba en el estado de madurez intermedia para la investigación (ver Figura 5).

Para el color, se utilizó un colorímetro de marca Macbeth (modelo Color-Eye 2445, UK), con el que se determinaron los valores de los parámetros de la Commission International de l'Eclairage (CIE)  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en la pulpa de naranjas (*Citrus sinensis* L.) variedad “Valencia” y mangos (*Mangifera indica* L.) variedad “Haden”. Se utilizó un iluminante D65 y un observador de 10°, calibrado con una placa blanca, determinando  $L^*$ ,  $a^*$ + (rojo) y  $b^*$ + (amarillo).

La acidez titulable se determinó de acuerdo a la Norma Venezolana COVENIN N° 1151-77 (COVENIN, 1977), expresando los resultados en gramos de ácido por cada 100 gramos de muestra (%).

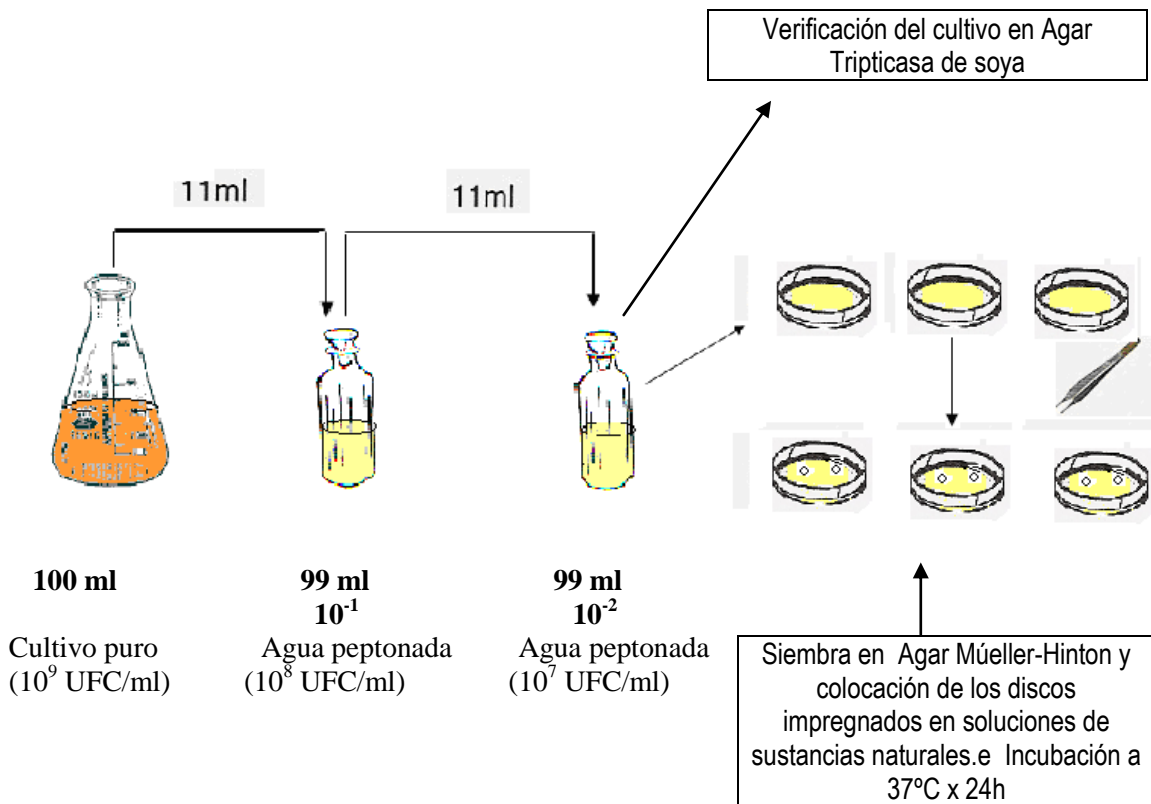
Para el pH se utilizó un potenciómetro digital marca HANNA instruments® USA, modelo pH 2111, USA; el cual fue calibrado con soluciones amortiguadoras “buffer” de pH 4.0 y pH 7.0.

Los sólidos solubles se determinaron con un refractómetro digital marca Atago DBX-55, presentando los resultados en °Brix, considerando lo establecido en la norma Venezolana COVENIN N° 924-83 (COVENIN, 1983).

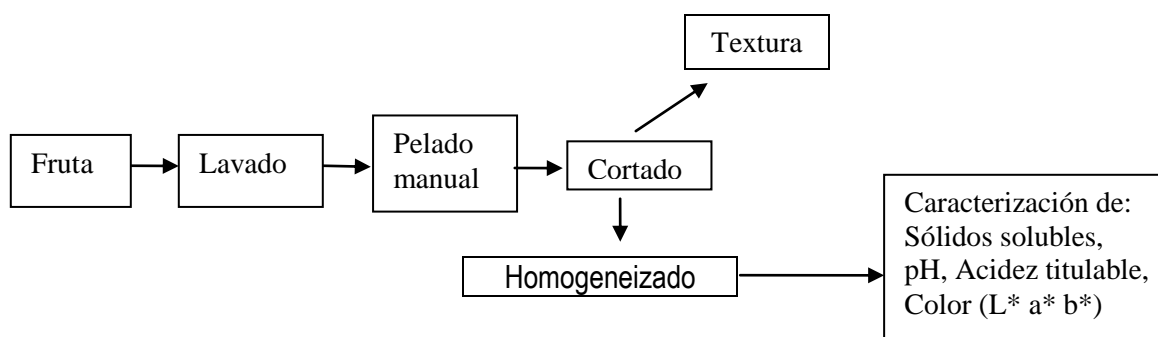
La firmeza fue medida utilizando un texturómetro, Stable Micro Systems (modelo TA-XT2i, Haslemere, Surrey, UK). En la tabla N° 3 se detallan los parámetros utilizados para el análisis de la firmeza.

**Tabla N° 3. Parámetros de ensayo para el análisis de perfil de textura (APT), aplicado a la naranja y mango frescos cortados.**

Condiciones del Ensayo	
Plato de compresión	P/75
Diámetro externo del plato	75 mm
Velocidad de pre-ensayo	2 mm/seg.
Velocidad de ensayo	1 mm/seg.
Velocidad de post-ensayo	10 mm/seg.
Distancia de compresión	25%
Tiempo	5 seg.
Celda	5 Kg.



**Figura 4. Método de difusión de discos para evaluar la efectividad de diferentes sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7.**



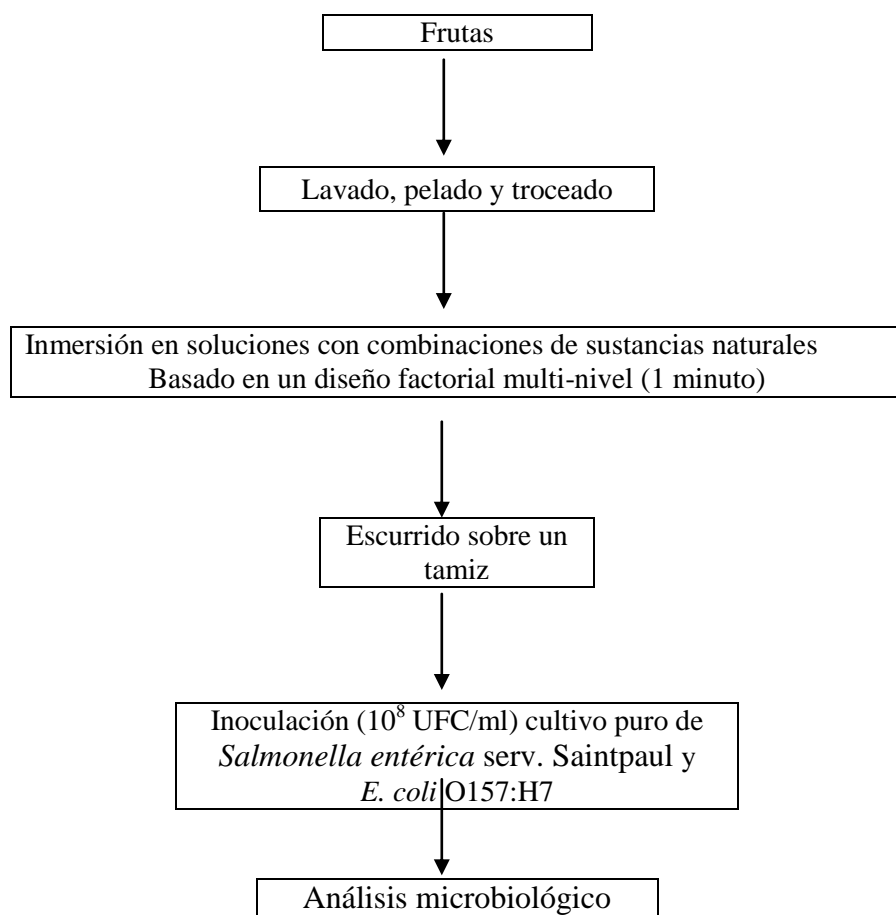
**Figura 5. Análisis físico y químico de la pulpa de frutas**

**6. Evaluación del efecto antimicrobiano de distintas sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 inoculados en naranjas y mangos frescos cortados.**

Rebanadas de naranja y trozos de mango fueron obtenidos a partir de las frutas lavadas y peladas. Seguidamente se sumergieron en soluciones conteniendo combinaciones de una sustancia natural (*Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, Ginseng o extracto de semilla y cáscara de uvas rojas) en cuatro distintas concentraciones (0; 1,0; 2,0 y 3,0), un ácido orgánico (ác. málico o ác. cítrico) en dos concentraciones distintas (0 y 1% p/v) y una sal (sorbato de potasio) en dos concentraciones (0 y 0,05% p/v) como agentes antimicrobianos, además de lactato de calcio en dos concentraciones diferentes (0 y 1,5 %) como agente conservante de la textura, por 1 a 2 minutos, basándonos en un diseño factorial multinivel (ver anexo 1). A continuación se dejaron escurrir en forma natural sobre un tamiz. Cincuenta gramos de la fruta cortada fueron colocados en bandejas de polipropileno y se procedió a realizar la



inoculación con una micropipeta, esparciendo 500 µl de un cultivo puro de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul o *E. coli* O157:H7 sobre la superficie de la fruta. Finalmente se analizaron las muestras microbiológicamente utilizando agares selectivos como Hektoen para *Salmonella* y McConkey sorbitol para *E. coli* O157:H7. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24h (ver Figura 6). Controles en piezas de estas frutas sin tratar (sumergidas en agua destilada estéril) e inoculados también fueron evaluados. La combinación que resultó más efectiva contra los microorganismos patógenos estudiados fue la seleccionada para los experimentos siguientes.



**Figura 6. Efecto antimicrobiano de diferentes sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 inoculadas en naranjas y mangos frescos cortados**

**7. Evaluación del efecto antimicrobiano de la combinación ideal de sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 inoculados en naranjas y mangos frescos cortados y almacenados a 5°C por 21 días.**

Para evaluar el efecto de la combinación ideal de sustancias antimicrobianas naturales (obtenida mediante un diseño factorial multi-nivel) durante el almacenamiento en refrigeración sobre los microorganismos patógenos se procedió de la misma manera que en el punto 6 y se almacenaron las muestras de frutas frescas cortadas tratadas e inoculadas a 5°C por 21 días. Recuentos de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 a diferentes tiempos (0, 3, 7,14, 18 y 21 días) fueron realizados para verificar la acción antimicrobiana de las sustancias en estudio. Controles de muestras de frutas cortadas, tratadas con agua destilada e inoculadas también fueron evaluados.

**8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la combinación ideal de sustancias naturales sobre la flora nativa de naranjas y mangos frescos cortados.**

Rebanadas de naranja y trozos de mango (sin inocular) tratados con la combinación de sustancias que resultó ideal para reducir los niveles de microorganismos patógenos (punto 7) fueron almacenados a 5°C por 21 días. Durante ese período de almacenamiento se realizaron análisis microbiológicos (a los 0, 3, 7,14, 18 y 21 días) para determinar los niveles de aerobios mesófilos/psicrófilos y mohos y levaduras, utilizando plate count agar (PCA) y cloranfenicol glucosa agar (CGA), respectivamente. Las placas de CGA fueron incubadas 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 14 días.

### **9. Análisis fisicoquímicos de naranjas y mangos frescos cortados**

Determinaciones de textura, color y pH de muestras de naranjas y mangos frescos cortados tratados y no tratados con la combinación de sustancias que resultó ideal para controlar los microorganismos patogénicos y deteriorativos y almacenadas a 5°C por 21 días, fueron realizadas a los 0, 3, 7, 14, 18 y 21 días de almacenamiento, de forma tal de evaluar los cambios en estos parámetros debidos a la acción de las sustancias naturales utilizadas como conservantes.

### **10. Evaluación sensorial de las muestras de fruta frescas cortadas.**

Finalmente, se realizó un estudio de evaluación sensorial (prueba afectiva) con muestras de rebanadas de naranja y trozos de mango, tratadas y no tratadas con la combinación de sustancias que resultó más efectiva para controlar los microorganismos patógenos y deteriorativos. Las muestras tratadas y sin tratar fueron aleatoriamente suministradas a 30 panelistas para que evaluaran características de color, sabor, olor y textura, utilizando una escala hedónica de 9 puntos (1 me disgusta extremadamente; 9 me gusta extremadamente) (Figura 7).

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

A continuación se le presentarán muestras de naranjas y mangos frescos cortados. Por favor, empleando la siguiente escala hedónica evalúe los aspectos de color, aroma, textura, sabor y apreciación global a cada una de las muestras suministradas. Después de probar cada muestra sírvase de tomar un sorbo de agua y posteriormente un trozo de galleta de soda.

9. Me gusta extremadamente
8. Me gusta mucho
7. Me gusta moderadamente
6. Me gusta ligeramente
5. Me es indiferente
4. Me disgusta ligeramente
3. Me disgusta moderadamente
2. Me disgusta mucho
1. Me disgusta moderadamente

Muestra	Color	Aroma	Textura	Sabor	Apreciación Global

Comentarios:

---

---

Gracias por su colaboración

**Figura 7. Planilla de tipo “Escala Hedónica”, aplicada a un panel no entrenado para realizar la evaluación sensorial de los mangos y las naranjas frescos cortados tratados y no tratados con antimicrobianos naturales.**

## **11. Análisis Estadístico**

Se aplicó un diseño “Factorial Multi-nivel”, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1. Se realizaron combinaciones de tratamientos como 2 x 2 x 2 x 4 x 2 x

2 (2 niveles de sorbato de potasio, 2 niveles de ácido málico o ácido cítrico, 2 niveles de lactato de calcio, 4 niveles de sustancia natural antimicrobiana, 2 microorganismos y 2 repeticiones) para cada fruta.

Los datos de microorganismos aerobios mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras durante la vida útil, fueron modelados según la ecuación de Gompert'z, que se presenta a continuación:

$$Y = k + A \exp\{-\exp[(\mu_{\max} 2.7182/A)(\lambda - t) + 1]\}$$

Donde, Y: es el recuento de microorganismos ( $\log_{10}$  UFC/g) para un determinado tiempo

k: recuento inicial del microorganismo ( $\log_{10}$  UFC/g)

A: crecimiento máximo del microorganismo alcanzado en la fase estacionaria ( $\log_{10}$  UFC/g)

$\mu_{\max}$ : crecimiento máximo por día [ $\log_{10}$  (UFC / g) / día]

$\lambda$ : tiempo de espera (días)

t: tiempo de almacenamiento (días)

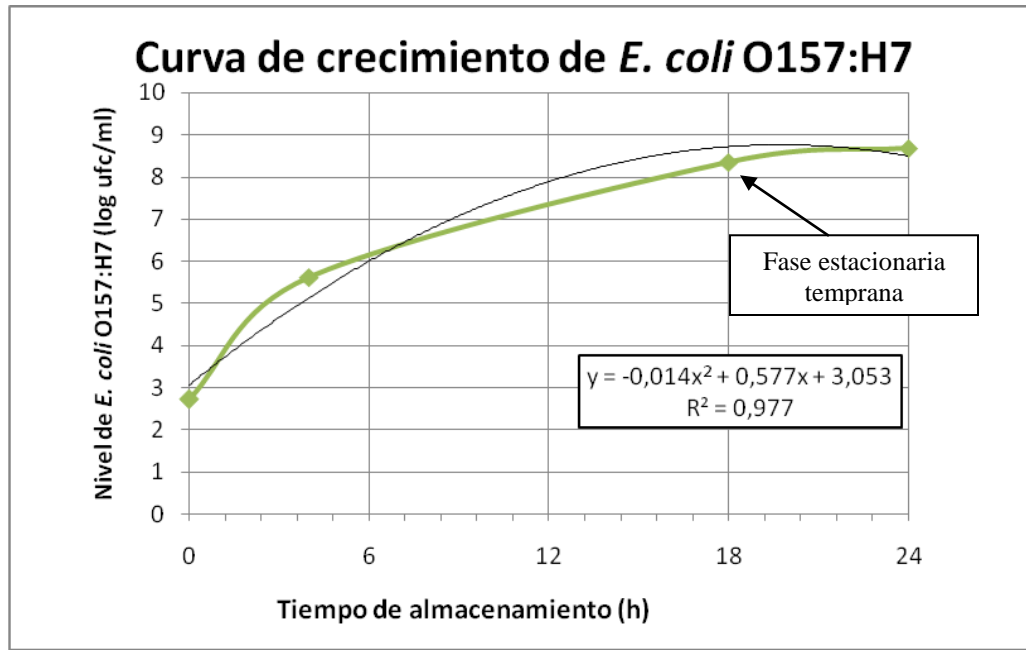
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Realización de las curvas de crecimiento de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7

Curvas de crecimiento de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 fueron elaboradas para conocer el tiempo en el cual alcanza el crecimiento de cada microorganismo la fase estacionaria temprana. Fase en la cual disminuye el volumen celular, se engrosa la pared y se incrementa la resistencia celular a condiciones adversas (Ramírez y col, 2005).

La figura 8 muestra la curva de crecimiento obtenida para un cultivo de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul crecido a 37°C, en la cual se observa que la fase estacionaria temprana se logró a las 18 horas de incubación sin agitación, alcanzándose una población de 8,60 UFC/ml en ese tiempo y partiendo de una población inicial de 10<sup>3</sup> UFC/ml. En la figura se puede observar también que después de las 21 horas de incubación ocurre una rápida disminución en la población bacteriana debido a que se inicia la fase de muerte de las mismas. Estos valores difieren de los obtenidos por Alemany (2009), quien experimentó con *Salmonella* var. Typhimurium incubando el inóculo a una temperatura de 37°C con agitación, obteniendo un tiempo de generación de 30 minutos y empezando la fase estacionaria después de 8 horas de incubación, esto nos demuestra que la agitación favorece la multiplicación y debido a esto se alcanza la fase estacionaria del microorganismo en menos tiempo.





**Figura 9.** Curva de crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 en caldo Trypticase de Soya.

A diferencia de los resultados mostrados en la Figura 9, Ramírez y col. (2005) obtuvieron que la fase estacionaria para *E. coli* O157:H7 fue aproximadamente a las 5 horas y 30 minutos de incubación en agitación, demostrando una vez más que la agitación favorece la multiplicación, por lo que la fase estacionaria temprana alcanzada por el autor fue en menor tiempo.

**2. Evaluación del efecto antimicrobiano de distintas sustancias naturales (*Aloe vera*, extracto de semillas y cáscaras de uvas rojas, *Ginkgo biloba* y Ginseng) sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7**

Para evaluar el efecto inhibitorio de las sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7, se aplicó el método de difusión en agar descrito por Davidson and Parish (1989), el cual demuestra *in vitro* la actividad antimicrobiana de un compuesto. Los antimicrobianos se aplicaron en distintas



concentraciones, donde la concentración 0% equivale al control (agua destilada) y el resto de las concentraciones corresponden a los diferentes tratamientos aplicados con cada compuesto en estudio.

En la Tabla N° 4 se muestran los resultados obtenidos luego de medir los halos de inhibición del crecimiento producidos por las distintas sustancias, dichos halos fueron uniformemente circulares sobre una capa homogénea de crecimiento de los microorganismos en estudio.

**TABLA N° 4. Evaluación del efecto inhibitorio de *Ginkgo biloba*, *Aloe vera*, Ginseng y extracto de semillas y cáscaras de uvas rojas sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *Escherichia coli* O157:H7**

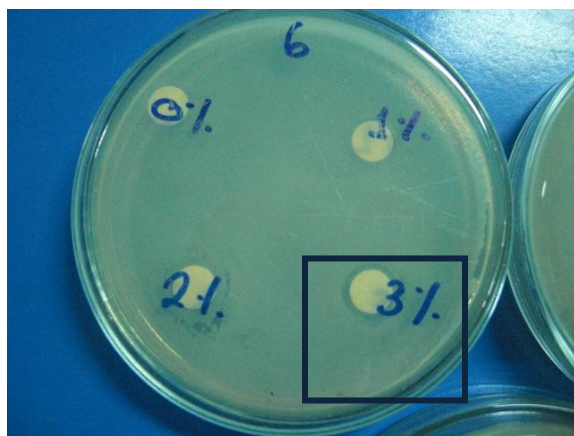
Microorganismo	Sustancia antimicrobiana	Halo de inhibición (cm)*					
		0%	1%	1,50%	2%	2,50%	3%
<i>Salmonella entérica</i> serv. Saintpaul	Extracto de semillas y cáscaras de uvas rojas	0	0,05±0,03	0,08±0,01	0,11±0,02	0,12±0,01	0,15±0,00
	<i>Ginkgo Biloba</i>	0	0,04±0,01	0,06±0,02	0,10±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01
	<i>Aloe vera</i>	0	0,04±0,02	0,05±0,01	0,06±0,00	0,08±0,03	0,12±0,01
	Ginseng	0	0,05±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01	0,15±0,01	0,20±0,01
<i>E. coli</i> O157:H7	Extracto de semillas y cáscaras de uvas rojas	0	0,03±0,02	0,03±0,02	0,03±0,02	0,03±0,02	0,06±0,04
	<i>Ginkgo Biloba</i>	0	0,03±0,00	0,03±0,02	0,05±0,01	0,08±0,01	0,10±0,01
	<i>Aloe vera</i>	0	0,10±0,05	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,13±0,02
	Ginseng	0	0,10±0,03	0,10±0,01	0,13±0,01	0,13±0,00	0,16±0,02

\* Los valores reportados son el promedio de tres determinaciones ± Desviación Estándar

En la Tabla N° 4 se observa que en forma general a medida que aumenta la concentración del compuesto en estudio, el halo de inhibición es mayor. Además, se puede observar que los efectos del Ginseng sobre ambos microorganismos fueron más marcados que los del resto de los compuestos evaluados.

*E. coli* O157:H7 demostró ser ligeramente más resistente a los efectos *Ginkgo biloba*, Ginseng y extracto de semillas y cáscaras de uvas rojas que *Salmonella entérica* serv. Saintpaul, mientras que para *Aloe vera* resultó ser más sensible.

En la Figura 10, se muestran los halos de inhibición producidos por efecto antimicrobiano del Ginseng sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul. La zona de color crema que ocupa la mayor parte de la placa es el crecimiento bacteriano, zonas no inhibidas. Los círculos traslúcidos que rodean los discos de distintas concentraciones son los halos de inhibición producidos por el antimicrobiano, con mayor o menor eficacia. El primer disco (0%) no muestra halo de inhibición a su alrededor debido a que se trata del control (disco impregnado en agua destilada), mientras que el resto de los discos si muestran halos de inhibición. Se puede observar que el halo de mayor inhibición fue producido por la sustancia en una concentración de 3%.



**Figura 10. Efecto antimicrobiano producido por Ginseng sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul.**

### 3. Evaluación de parámetros físicos y químicos del mango (*Mangifera indica* L.) var.

#### “Haden” y de la naranja (*Citrus sinensis* L.) var. “Valencia”

La caracterización inicial de las frutas se realizó con la finalidad de conocer las condiciones iniciales de la fruta antes de comenzar el proceso y de verificar que las mismas se encontraban en el estado de madurez intermedia para la investigación.

En las Tablas N° 5 y 6, se presentan los resultados de pH, acidez titulable, sólidos solubles y firmeza; las cuales son las determinaciones físicas y químicas que se usan comúnmente para la caracterización de las frutas.

**Tabla N° 5. Caracterización del mango (*Mangifera indica* L.) var. “Haden”**

Nivel de Maduración del Mango	Parámetros *			
	pH	Acidez Titulable (% ácido málico)	Sólidos Solubles (°Brix)	Firmeza (g)
Verde	2,94 ± 0,17	0,35± 2,50	9,85 ± 1,23	6,33 ± 0,75
Intermedio	4,02 ± 0,36	0,10± 0,21	12,03 ± 0,61	5,64 ± 0,12
Maduro	4,47 ± 0,06	0,05± 0,10	18,02 ± 2,10	5,54 ± 1,62

\* Valores de **pH**, **Acidez titulable** y **sólidos solubles** son el promedio de cuatro (4) determinaciones ± Desviación Estándar, mientras que los valores de **firmeza** son el promedio de seis (6) determinaciones ± Desviación Estándar

**Tabla N° 6. Caracterización de la naranja (*Citrus sinensis* L.) var. “Valencia”**

Nivel de Maduración de la Naranja	Parámetros *			
	pH	Acidez Titulable (% ácido cítrico)	Sólidos Solubles (°Brix)	Firmeza (g)
Verde	3,31 ± 0,01	1,54 ± 0,12	9,77 ± 0,12	16,05 ± 4,18
Intermedio	3,52 ± 0,02	0,90 ± 0,25	11,10 ± 0,17	15,51 ± 1,37
Maduro	3,59 ± 0,02	0,72 ± 0,15	13,23 ± 0,12	5,99 ± 1,79

\* Valores de **pH**, **Acidez titulable** y **sólidos solubles** son el promedio de cuatro (4) determinaciones ± Desviación Estándar, mientras que los valores de **firmeza** son el promedio de seis (6) determinaciones ± Desviación Estándar

El pH, permite tener una referencia de la estabilidad de la fruta ya que constituye una barrera natural que posee la misma contra el ataque microbiológico, (Tapia y col. 1996). Los valores de pH para el mango y la naranja fluctuaron entre 2,94 a 4,47 y 3,31 a 3,59 respectivamente. En ambas frutas (mango y naranja) se registró un aumento del pH a medida que iba incrementando el estado de madurez, debido a que los ácidos orgánicos disminuyen significativamente a medida que avanza el estado de maduración de la fruta. El caso contrario al parámetro de acidez titulable que presentó una relación inversa con el pH en ambos frutos, a medida que aumentaba el grado de madurez, ésta disminuía, debido al descenso de la cantidad absoluta del ácido y por el aumento gradual del agua en la fruta (Rivera, 2006).

El valor promedio obtenido de pH para la naranja en madurez intermedia fue de 3,52, muy similar al encontrado por Rivera (2006) quien reportó un valor de 3,70 en la pulpa de naranja en el estadio considerado como madurez comercial óptima. De igual manera el valor de acidez titulable observado en la Tabla N° 6, es de 0,90% de ácido cítrico y el obtenido por el autor fue de 0,77%.

Los sólidos solubles (°Brix), están definidos como el porcentaje en peso de sacarosa y presentan una relación directa con el grado de madurez de la fruta, ya que a mayor madurez, mayor contenido de azúcares. En las tablas N° 5 y 6 se observa un aumento progresivo del contenido de sólidos solubles a medida que aumenta el grado de madurez en ambos frutos.

En Venezuela no hay establecido la cantidad de sólidos solubles que debe tener una fruta para asignarle una calidad mínima, pero normalmente se acepta que no debe ser menor a 9° Brix, al observar los resultados obtenidos en las tablas N° 5 y 6, en ambos casos

dicho valor es superior a los 9° Brix, por lo que se considera que los frutos usados para el análisis fueron de buena calidad.

Para la firmeza, se realizó un análisis de perfil de textura, el cual consiste en comprimir dos veces un trozo reducido de un alimento, en un movimiento recíproco que imita la acción de la dentadura. En el caso particular de los trozos de naranja y mango frescos cortados se decidió evaluar el parámetro de firmeza. La firmeza fue disminuyendo gradualmente conforme avanzó la madurez en ambos frutos, como consecuencia de los procesos asociados a la maduración, donde la fracción péctica insoluble en agua disminuye y aumenta la fracción soluble, además, ocurre el desdoblamiento de los carbohidratos a unidades más simples, provocando así la disminución de la firmeza (Dauthy, 1995).

En la Tabla N° 7, se muestran los resultados de color obtenidos al caracterizar los frutos de mango y naranja. El color constituye normalmente las bases de aceptación o rechazo por parte del consumidor, debido a que es una característica de calidad, ya que determina la madurez y vida post-cosecha (Zapata y col., 2007).

Los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  son utilizados para describir objetivamente los cambios de color en los frutos, siendo  $L^*$  el valor que indica la luminosidad de la muestra, donde 100 representa un color blanco ó de máxima brillantez y 0 significa color negro u opaco. El valor  $a^*$  cuando es positivo representa una coloración roja de la muestra, mientras que cuando es negativo representa una coloración verde. De igual forma el valor positivo y negativo de  $b^*$  indica una coloración amarilla y azul, respectivamente (Zapata y col., 2007).

**Tabla N° 7. Caracterización del color en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) var. “Haden” y naranja (*Citrus sinensis* L.) var. “Valencia”**

<b>Fruto</b>	<b><i>L</i>*</b>	<b><i>a</i>*</b>	<b><i>b</i>*</b>
<b>Mango verde</b>	65,44 ± 2,99	15,09 ± 4,02	71,79 ± 0,96
<b>Mango intermedio</b>	63,09 ± 2,57	17,26 ± 0,46	71,87 ± 0,19
<b>Mango maduro</b>	61,05 ± 0,51	22,97 ± 0,68	75,61 ± 2,56
<b>Naranja verde</b>	74,22 ± 1,95	1,85 ± 0,63	34,87 ± 1,13
<b>Naranja intermedia</b>	71,09 ± 3,55	5,78 ± 2,87	38,73 ± 4,04
<b>Naranja madura</b>	67,96 ± 0,35	8,86 ± 1,66	49,27 ± 5,69

\*Valores son el promedio de seis (4) determinaciones ± Desviación Estándar

En la Tabla N° 7, se observa que el valor de *L*\* para ambos frutos en sus distintos estadios (verde, intermedio y maduro), va disminuyendo a medida que aumenta el grado de madurez, es decir, ambos frutos se vuelven más opacos. En el caso del parámetro *a*\*, éste aumenta junto con el grado de madurez, los frutos de mango y naranja se van tornando más rojos a medida que avanza su grado de madurez; al igual que en el caso de los valores mostrados de *b*\*, los cuales indican que en ambos frutos aumenta la coloración amarilla a medida que aumenta el grado de madurez.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el mango y la naranja en su estado de madurez intermedia, se tiene que presentaron un valor de luminosidad (*L*\*) de 63,09; de *a*\* 17,26 y de *b*\* 71,87 y *L*\* de 71,09; de *a*\* 5,78 y de *b*\* 38,73, respectivamente. Dados estos

valores, el mango presenta una coloración que se encuentra dentro de las tonalidades rojizas además de ser opaca, mientras que la naranja está entre las tonalidades más amarillas y es más luminosa.

**4. Evaluación del efecto antimicrobiano de distintas sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 inoculados en naranjas y mangos frescos cortados.**

Para evaluar el efecto antimicrobiano de las distintas sustancias naturales sobre los microorganismos en estudio en las frutas frescas cortadas, se realizó un diseño Factorial Multi-nivel, donde se aplicaron combinaciones de tratamientos utilizando 2 niveles de sorbato de potasio, 2 niveles de ácido málico o ácido cítrico (2), 2 niveles de lactato de calcio, 4 niveles de sustancia natural antimicrobiana, 2 microorganismos, 2 repeticiones para cada tipo de fruta.

En las Tablas N° 8, 8.1, 9 y 9.1, se muestran las diferentes combinaciones de sustancias antimicrobianas empleadas para evaluar su efecto sobre los patógenos en estudio inoculados individualmente en mango y naranja frescos cortados, así como la reducción de ciclos logarítmicos alcanzada mediante la implementación de dichos tratamientos.

**TABLA N° 8. Evaluación del efecto antimicrobiano de la combinación de un ácido orgánico (málico o cítrico), una sal (sorbato de potasio), una sustancia natural (Ginseng) y un compuesto estabilizante de firmeza sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en naranja fresca cortada.**

Sorbato (%)	Ácido (%)	Lactato (%)	Ginseng (%)	<i>Salmonella</i> *(A) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)	<i>Salmonella</i> *(B) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)
0,05	1	1,5	3	2,74 ± 0,13	2,28 ± 0,01
0,05	1	1,5	2	2,24 ± 0,57	2,25 ± 0,01
0,05	1	1,5	1	1,69 ± 0,05	1,81 ± 0,18
0,05	1	1,5	0	1,59 ± 0,00	1,25 ± 0,01
0,05	1	0	3	2,52 ± 0,03	2,45 ± 0,00
0,05	1	0	2	1,88 ± 0,01	1,85 ± 0,00
0,05	1	0	1	1,61 ± 0,01	1,65 ± 0,00
0,05	1	0	0	1,74 ± 0,08	1,50 ± 0,00
0,05	0	1,5	3	1,64 ± 0,01	1,64 ± 0,01
0,05	0	1,5	2	1,62 ± 0,01	1,62 ± 0,01
0,05	0	1,5	1	1,60 ± 0,01	1,60 ± 0,01
0,05	0	1,5	0	1,54 ± 0,02	1,54 ± 0,02
0,05	0	0	3	1,65 ± 0,01	1,65 ± 0,01
0,05	0	0	2	1,61 ± 0,03	1,61 ± 0,03
0,05	0	0	1	1,55 ± 0,01	1,55 ± 0,01
0,05	0	0	0	0,92 ± 0,01	0,92 ± 0,01
0	1	1,5	3	2,31 ± 0,53	1,64 ± 0,01
0	1	1,5	2	1,83 ± 0,09	1,63 ± 0,00
0	1	1,5	1	1,78 ± 0,10	1,56 ± 0,02
0	1	1,5	0	3,34 ± 0,11	3,34 ± 0,09
0	1	0	3	2,74 ± 0,09	2,19 ± 0,00
0	1	0	2	2,73 ± 0,09	2,16 ± 0,01
0	1	0	1	2,66 ± 0,01	1,95 ± 0,00
0	1	0	0	2,24 ± 0,16	2,35 ± 0,00
0	0	1,5	3	0,70 ± 0,02	0,70 ± 0,02
0	0	1,5	2	0,66 ± 0,02	0,66 ± 0,02
0	0	1,5	1	0,65 ± 0,02	0,65 ± 0,02
0	0	1,5	0	0,64 ± 0,00	0,64 ± 0,00
0	0	0	3	1,78 ± 0,00	1,78 ± 0,00
0	0	0	2	1,64 ± 0,03	1,64 ± 0,03
0	0	0	1	0,68 ± 0,02	0,68 ± 0,02
0	0	0	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

\*Valores de reducción de la población microbiana con ácido málico (A) y ácido cítrico (B), los cuales son el promedio de dos (2) determinaciones con sus respectivos duplicados ± Desviación Estándar (n=4)



En la Tabla N° 8, se observa el efecto antibacteriano del ácido málico y el ácido cítrico en combinación con las demás sustancias en la naranja fresca cortada, en la primera parte, se puede ver que al combinar todas las sustancias con la mayor concentración de antimicrobiano (Ginseng 3%) se logró una reducción mayor a 2 ciclos logarítmicos, para ambos ácidos, siendo más efectivo el ácido málico que el ácido cítrico, disminuyéndose la efectividad de manera directamente proporcional al disminuir la concentración de Ginseng. Al aplicar las mismas concentraciones de sustancias pero sin ácidos, se observaron reducciones mucho menores, mientras que cuando se aplican combinaciones de ácido y Ginseng se observa que ocurre una reducción de 1 ciclo logarítmico aproximadamente y cuando se aplica el Ginseng de manera individual en la fruta se obtiene un efecto antibacteriano pequeño pero ligeramente mejor que cuando se aplican el Ginseng y las sales en combinación. Lo que sugiere que existe algún tipo de interacción entre estas últimas sustancias que afecta la efectividad del Ginseng contra la población del microorganismo, esto se puede ver mejor en la tabla cuando se aplicó el ácido con el lactato sin adición de Ginseng que se logra una reducción superior a 3 ciclos logarítmicos. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos se aprecia un efecto sinérgico al combinar el ácido málico y el Ginseng ya que producen un efecto antimicrobiano que es mayor que la suma de los efectos de los mismos de manera individual.

En la Tabla N° 8.1, se muestra el efecto antimicrobiano obtenido al combinar las distintas sustancias con ácido málico o ácido cítrico sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en mango fresco cortado.

**TABLA N° 8.1. Evaluación del efecto antimicrobiano de la combinación de un ácido orgánico (málico o cítrico), una sal (sorbato de potasio), una sustancia natural (Ginseng) y un compuesto estabilizante de firmeza sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en mango fresco cortado.**

Sorbato (%)	Ácido (%)	Lactato (%)	Ginseng (%)	<i>Salmonella</i> *(A) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)	<i>Salmonella</i> *(B) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)
0,05	1	1,5	3	2,51 ± 0,36	2,37 ± 0,49
0,05	1	1,5	2	2,17 ± 0,46	2,56 ± 0,23
0,05	1	1,5	1	1,46 ± 0,14	0,68 ± 0,11
0,05	1	1,5	0	0,72 ± 0,84	1,72 ± 0,57
0,05	1	0	3	1,99 ± 0,46	1,83 ± 0,47
0,05	1	0	2	1,90 ± 0,48	1,78 ± 0,46
0,05	1	0	1	0,39 ± 0,43	1,49 ± 0,48
0,05	1	0	0	0,53 ± 0,23	1,00 ± 0,47
0,05	0	1,5	3	0,78 ± 0,08	0,78 ± 0,08
0,05	0	1,5	2	0,70 ± 0,15	0,70 ± 0,15
0,05	0	1,5	1	0,83 ± 0,37	0,83 ± 0,37
0,05	0	1,5	0	0,66 ± 0,55	0,66 ± 0,55
0,05	0	0	3	1,96 ± 0,56	1,95 ± 0,49
0,05	0	0	2	1,96 ± 0,50	3,91 ± 0,47
0,05	0	0	1	0,91 ± 0,48	0,06 ± 0,49
0,05	0	0	0	0,39 ± 0,51	0,39 ± 0,48
0	1	0	3	2,24 ± 0,00	1,58 ± 0,23
0	1	0	2	1,63 ± 0,16	0,89 ± 0,18
0	1	0	1	1,52 ± 0,58	0,76 ± 0,13
0	1	0	0	2,57 ± 0,58	0,99 ± 0,03
0	1	1,5	3	1,98 ± 0,47	1,72 ± 0,50
0	1	1,5	2	1,14 ± 0,50	1,40 ± 0,48
0	1	1,5	1	0,38 ± 0,50	1,28 ± 0,51
0	1	1,5	0	2,88 ± 0,32	0,49 ± 0,48
0	0	1,5	3	1,28 ± 0,48	1,28 ± 0,47
0	0	1,5	2	0,80 ± 0,44	0,80 ± 0,47
0	0	1,5	1	0,43 ± 0,50	0,43 ± 0,48
0	0	1,5	0	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,15
0	0	0	3	1,04 ± 0,29	0,71 ± 0,76
0	0	0	2	0,95 ± 0,48	0,95 ± 0,48
0	0	0	1	0,68 ± 0,71	0,68 ± 0,71
0	0	0	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

\*Valores de reducción de la población microbiana con ácido málico (A) y ácido cítrico (B), los cuales son el promedio de dos (2) determinaciones con sus respectivos duplicados ± Desviación Estándar (n=4)

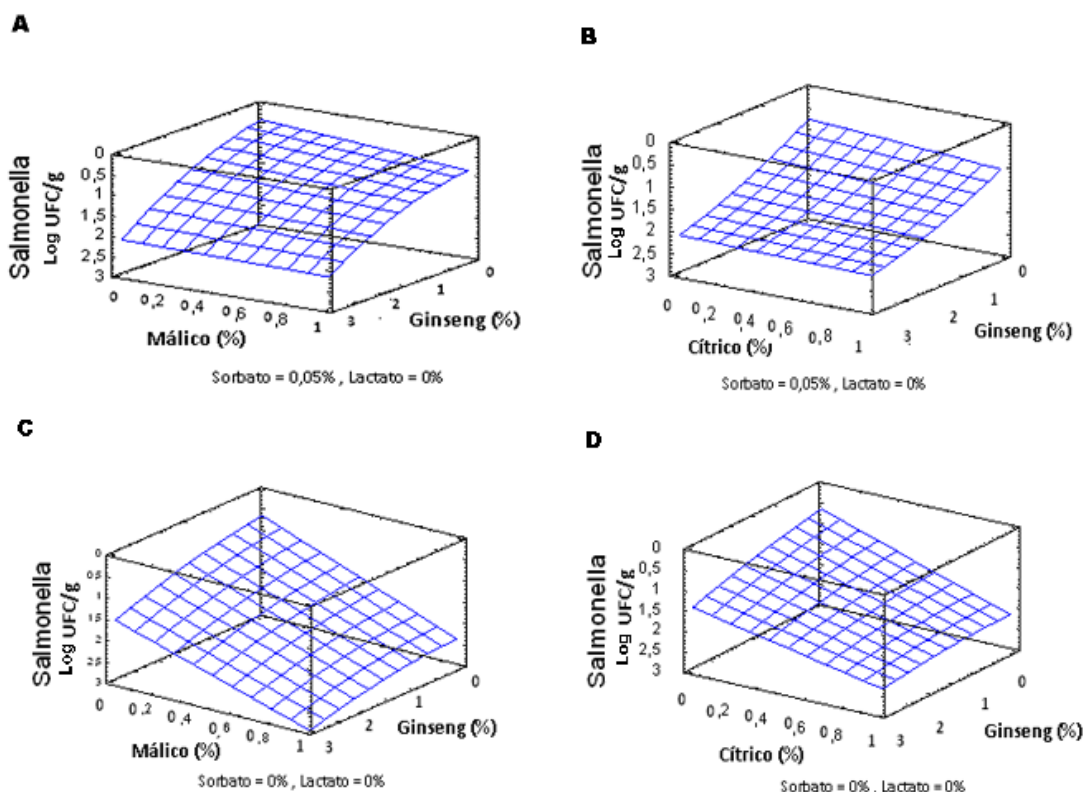
En la Tabla N° 8.1, como en el caso de la naranja, también se observa que los tratamientos aplicados con ácido cítrico tuvieron una menor efectividad al compararlos con los tratamientos con ácido málico sobre la reducción de la población de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en mango fresco cortado. Además se observa que al combinar todas las sustancias también pueden llegar a reducirse más de 2 ciclos logarítmicos de la población, mientras que con las demás combinaciones el efecto antimicrobiano es menor, sobre todo al aplicar las sales con el Ginseng sin adición de los ácidos, donde se observa que ni siquiera se llega a reducir 1 ciclo logarítmico.

Al observar los resultados obtenidos en las tablas N° 8 y 8.1 para el efecto antimicrobiano de las diferentes sustancias sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en naranja y mango respectivamente, se demuestra que los tratamientos efectivos son aquellos que incluyen un ácido orgánico, siendo el efecto del ácido málico más pronunciado que el del ácido cítrico y luego aquellos tratamientos que contemplan el uso del ácido y el Ginseng, siendo la combinación más efectiva aquella cuando se usa la mayor concentración de Ginseng.

Otros investigadores han realizado estudios reportando la efectividad de sustancias naturales en frutas y vegetales. Ejemplo de estos fueron los realizados por Karapinar y col., (2006), donde demostraron que tratamientos con jugo de uva causa reducciones significativas en el número de células de *Salmonella typhimurium* en pepino y perejil, ya que obtuvieron una reducción de 2,5 log UFC/g.

Al realizar el análisis estadístico del diseño experimental, se obtuvieron las curvas de superficie respuesta para cada una de las variables, así como el tratamiento óptimo en términos del efecto deseado en cada una de las respuestas del diseño.

En la figura 11 se observa la superficie obtenida al analizar la reducción de la población microbiana de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en naranjas y mangos frescos cortados tratados con sustancias antimicrobianas como respuesta del diseño.



**Figura 11. Superficie respuesta estimada para la reducción de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en función de la aplicación de diferentes combinaciones de sustancias naturales sobre mangos y naranjas frescos cortados. (A) y (B) Efecto del ácido málico-Ginseng y ácido cítrico-Ginseng en mango, respectivamente y (C) y (D) representan el efecto del ácido málico-Ginseng y ácido cítrico-Ginseng en naranja, respectivamente.**

Como se observa en la figura 11-A y 11-B, las reducciones de la población expresadas en log UFC/g aumentan al aumentar la concentración de ácidos, sin embargo la concentración de Ginseng tiene un comportamiento asintótico. Es decir, las reducciones de la población de *Salmonella* van aumentando a medida que aumenta la concentración de Ginseng pero hasta alcanzar un valor óptimo. Siendo el valor más alto el obtenido en la figura 11-A, con ácido málico ya que se logran reducir 2,16 log UFC/g. Al analizar las

diferentes sustancias aplicadas para el mango en el modelo aplicando ácido málico, las sustancias que presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) fueron el ácido málico, el Ginseng y la combinación de sorbato con Ginseng. Mientras que para el modelo adicionando ácido cítrico, las sustancias con diferencias significativas fueron el sorbato, el ginseng y el ácido cítrico.

En el caso de las gráficas 11-C y 11-D, se observa que a mayor concentración de ácidos, tanto málico como cítrico, también son mayores las reducciones de la población de *Salmonella* alcanzadas en naranja. De igual manera sigue siendo más efectivo el ácido málico ya que logra reducir 2,99 log UFC/g, mientras que para el ácido cítrico sólo se logran reducir 2,37 log UFC/g.

En el caso de la naranja inoculada con *Salmonella*, las sustancias que presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la reducción de la población del patógeno para el modelo con ácido málico, fueron el ácido málico, el Ginseng, la combinación de sorbato con ácido málico, sorbato con lactato y lactato con Ginseng y para el modelo con el ácido cítrico, el sorbato, el ácido cítrico, el Ginseng y la combinación de las sales con el Ginseng.

En la Tabla N° 9 y N° 9.1, se muestra la reducción de ciclos logarítmicos alcanzada mediante la implementación del diseño Factorial Multi-nivel sobre *Escherichia coli* O157:H7 en naranja y mango frescos cortados, respectivamente.

**TABLA N° 9. Evaluación del efecto antimicrobiano de la combinación de un ácido orgánico (málico o cítrico), una sal (sorbato de potasio), una sustancia natural (Ginseng) y un compuesto estabilizante de firmeza sobre *Escherichia coli* O157:H7 en naranja fresca cortada.**

Sorbato (%)	Ácido (%)	Lactato (%)	Ginseng (%)	<i>E. coli</i> *(A) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)	<i>E. coli</i> *(B) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)
0,05	1	1,5	3	1,01 ± 0,08	0,97 ± 0,01
0,05	1	1,5	2	0,99 ± 0,07	0,96 ± 0,01
0,05	1	1,5	1	0,87 ± 0,00	0,95 ± 0,01
0,05	1	1,5	0	0,16 ± 0,03	0,48 ± 0,01
0,05	1	0	3	1,86 ± 0,00	1,02 ± 0,01
0,05	1	0	2	1,85 ± 0,02	1,00 ± 0,03
0,05	1	0	1	1,20 ± 0,02	0,99 ± 0,03
0,05	1	0	0	0,78 ± 0,68	0,96 ± 0,01
0,05	0	1,5	3	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
0,05	0	1,5	2	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,01
0,05	0	1,5	1	0,46 ± 0,09	0,46 ± 0,09
0,05	0	1,5	0	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01
0,05	0	0	3	1,19 ± 0,05	1,19 ± 0,05
0,05	0	0	2	1,14 ± 0,01	1,14 ± 0,01
0,05	0	0	1	1,10 ± 0,02	1,10 ± 0,02
0,05	0	0	0	1,83 ± 0,01	1,83 ± 0,01
0	1	1,5	3	1,49 ± 0,54	0,96 ± 0,03
0	1	1,5	2	1,44 ± 0,57	0,94 ± 0,01
0	1	1,5	1	1,01 ± 0,01	0,91 ± 0,01
0	1	1,5	0	0,69 ± 0,07	0,38 ± 0,00
0	1	0	3	1,05 ± 0,00	1,14 ± 0,02
0	1	0	2	2,23 ± 2,14	0,99 ± 0,02
0	1	0	1	0,46 ± 0,06	0,42 ± 0,11
0	1	0	0	1,00 ± 0,05	0,93 ± 0,04
0	0	1,5	3	0,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01
0	0	1,5	2	0,79 ± 0,08	0,79 ± 0,08
0	0	1,5	1	0,79 ± 0,00	0,79 ± 0,00
0	0	1,5	0	0,66 ± 0,02	0,66 ± 0,02
0	0	0	3	1,13 ± 0,05	1,13 ± 0,05
0	0	0	2	1,02 ± 0,05	1,02 ± 0,05
0	0	0	1	0,97 ± 0,00	0,97 ± 0,00
0	0	0	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

\*Valores de reducción de la población microbiana con ácido málico (A) y ácido cítrico (B), los cuales son el promedio de dos (2) determinaciones con sus respectivos duplicados ± Desviación Estándar (n=4)

En la Tabla N° 9, se observan los resultados obtenidos al combinar el ácido málico y el ácido cítrico con las demás sustancias en naranja fresca cortada, se puede ver que al combinar el sorbato con el antimicrobiano (Ginseng) se logró una reducción de 1 ciclo logarítmico aproximadamente, disminuyéndose la efectividad de manera directamente proporcional al disminuir la concentración de Ginseng. Al aplicar las mismas concentraciones de Ginseng pero con el ácido málico se observaron reducciones mucho menores, cuando se aplican combinaciones de sorbato, ácido y Ginseng se observa que ocurre una reducción de 1 ciclo logarítmico aproximadamente para ambos ácidos y de igual manera que con *Salmonella* cuando se aplica el Ginseng de manera individual en la fruta se obtiene un efecto antibacteriano pequeño pero ligeramente mejor que cuando se aplican el Ginseng y las sales en combinación.

En la Tabla N° 9.1, se muestra el efecto antimicrobiano obtenido sobre *Escherichia coli O157:H7* al combinar las distintas sustancias con ácido málico o ácido cítrico en mango fresco cortado.

**TABLA N° 9.1. Evaluación del efecto antimicrobiano de la combinación de un ácido orgánico (málico o cítrico), una sal (sorbato de potasio), una sustancia natural (Ginseng) y un compuesto estabilizante de firmeza sobre *Escherichia coli* O157:H7 en mango fresco cortado.**

Sorbato (%)	Ácido (%)	Lactato (%)	Ginseng (%)	<i>E. coli</i> *(A) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)	<i>E. coli</i> *(B) (Log <sub>i</sub> UFC/g/Log <sub>f</sub> UFC/g)
0,05	1	1,5	3	1,30 ± 0,05	1,24 ± 0,03
0,05	1	1,5	2	1,26 ± 0,03	1,23 ± 0,03
0,05	1	1,5	1	1,21 ± 0,04	1,19 ± 0,04
0,05	1	1,5	0	0,06 ± 1,36	1,05 ± 0,05
0,05	1	0	3	2,22 ± 0,01	1,37 ± 0,03
0,05	1	0	2	2,17 ± 0,01	1,32 ± 0,01
0,05	1	0	1	2,12 ± 0,04	1,28 ± 0,05
0,05	1	0	0	2,07 ± 0,05	1,22 ± 0,00
0,05	0	1,5	3	1,10 ± 0,06	1,11 ± 0,04
0,05	0	1,5	2	1,07 ± 0,05	1,08 ± 0,04
0,05	0	1,5	1	1,05 ± 0,06	1,07 ± 0,04
0,05	0	1,5	0	1,04 ± 0,05	1,04 ± 0,04
0,05	0	0	3	1,30 ± 0,03	1,30 ± 0,04
0,05	0	0	2	1,27 ± 0,05	1,27 ± 0,05
0,05	0	0	1	1,23 ± 0,02	1,23 ± 0,02
0,05	0	0	0	1,22 ± 0,02	1,22 ± 0,02
0	1	1,5	3	1,31 ± 0,02	1,24 ± 0,04
0	1	1,5	2	1,26 ± 0,02	1,22 ± 0,04
0	1	1,5	1	1,23 ± 0,02	1,20 ± 0,03
0	1	1,5	0	1,47 ± 0,06	1,41 ± 0,01
0	1	0	3	1,21 ± 0,03	1,20 ± 0,03
0	1	0	2	1,19 ± 0,04	1,17 ± 0,02
0	1	0	1	1,16 ± 0,04	1,14 ± 0,03
0	1	0	0	1,12 ± 0,05	1,08 ± 0,03
0	0	1,5	3	1,15 ± 0,05	1,15 ± 0,05
0	0	1,5	2	1,12 ± 0,03	1,12 ± 0,03
0	0	1,5	1	1,09 ± 0,04	1,09 ± 0,04
0	0	1,5	0	2,01 ± 0,07	2,01 ± 0,07
0	0	0	3	1,29 ± 0,05	1,29 ± 0,05
0	0	0	2	1,27 ± 0,03	1,27 ± 0,03
0	0	0	1	1,25 ± 0,01	1,25 ± 0,01
0	0	0	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

\*Valores de reducción de la población microbiana con ácido málico (A) y ácido cítrico (B), los cuales son el promedio de dos (2) determinaciones con sus respectivos duplicados ± Desviación Estándar (n=4)

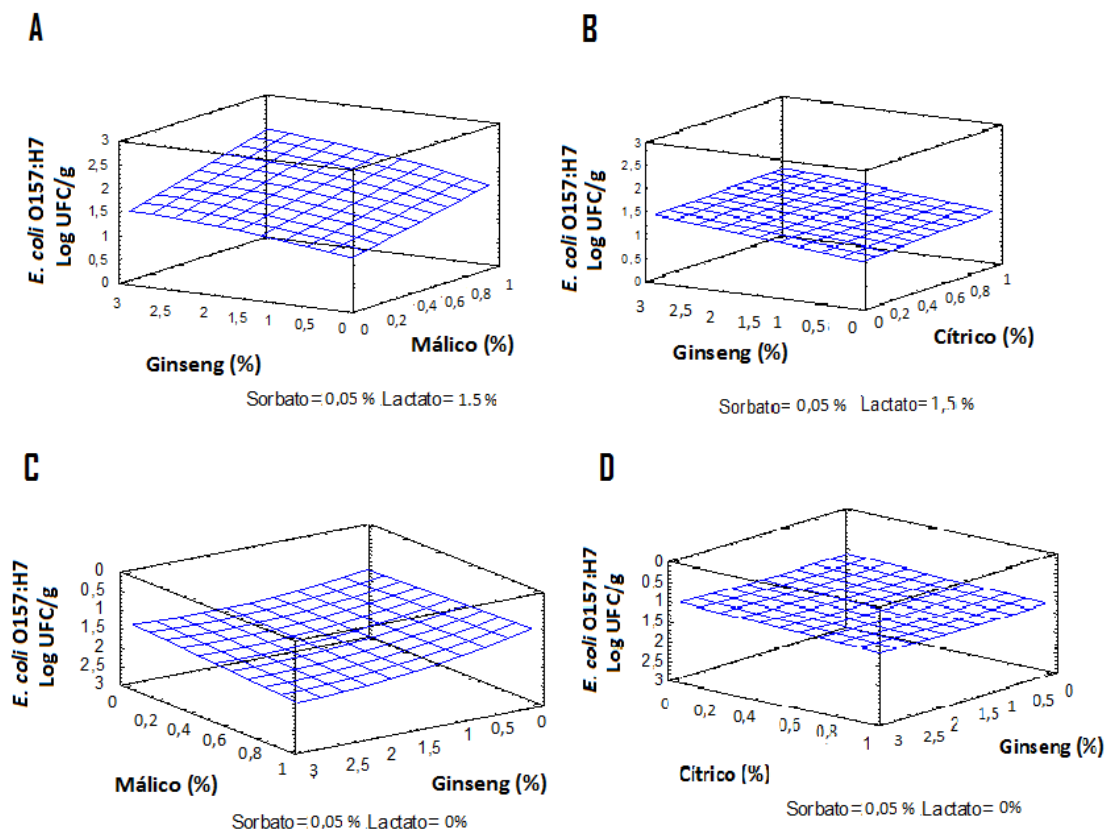


Al observar la tabla N° 9.1, se puede ver que al combinar todas las sustancias sin el lactato de calcio, con la mayor concentración de antimicrobiano (Ginseng 3%) se logró una reducción de más de 2 ciclos logarítmicos de la población de *E.coli* O157:H7 usando ácido málico y de más de 1 ciclo logarítmico usando ácido cítrico, siendo de igual forma a los casos anteriores más efectivo el tratamiento que incluye ácido málico que el que incluye ácido cítrico, disminuyéndose la efectividad al disminuir la concentración de Ginseng, encontrándose que el tratamiento que le sigue en efectividad es aquel donde se combinaron el sorbato y el Ginseng.

Por otra parte se observa que al añadir lactato de calcio con el antimicrobiano Ginseng en ausencia de ácido se disminuye ligeramente la efectividad, lo que sugiere que existe algún tipo de interacción del lactato de calcio que afecta la efectividad del Ginseng sobre la población del microorganismo.

En ambas frutas se observa que existe un efecto un poco mas pronunciado al aplicar el ácido málico en lugar del ácido cítrico. Además, se aprecia que existe un efecto sinérgico al combinar el ácido málico y el Ginseng.

Al analizar estadísticamente los efectos obtenidos para la reducción de *E. coli*, se pueden observar los gráficos que representan la superficie respuesta en la figura 12.



**Figura 12.** Superficie respuesta estimada para la reducción de *E. coli* O157:H7 en función de la aplicación de diferentes combinaciones de sustancias naturales sobre mangos y naranjas frescos cortados. (A) y (B) Efecto del ácido málico-Ginseng y ácido cítrico-Ginseng en mango, respectivamente y (C) y (D) representan el efecto del ácido málico-Ginseng y ácido cítrico-Ginseng en naranja, respectivamente.

Al observar la figura 12, se pueden apreciar las gráficas para mango/ac. málico (12-A), mango/ac. cítrico (12-B), naranja/ac. málico (12-C) y naranja/ac. cítrico (12-D), todos combinados con Ginseng (3%), obteniendo una reducción máxima de 2,31; 1,51; 1,73 y 1,27 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Las reducciones de la población de *E. coli* expresadas como log UFC/g van aumentando a medida que aumenta la concentración de Ginseng. Este comportamiento se observa también al variar la concentración de ácido.

Los resultados mostrados hasta el momento nos indican los efectos logrados aplicando diferentes combinaciones de sustancias antimicrobianas para cada microorganismo individualmente y aplicando un análisis de cada diseño podríamos obtener la combinación óptima para cada uno, pero si aplicamos un análisis para conocer cual es la combinación óptima para lograr controlar ambos microorganismos encontramos los resultados mostrados en las tablas N° 10 y 11.

**Tabla N° 10. Combinación óptima de sustancias antimicrobianas para ambos microorganismos en mango fresco cortado**

Sustancia	Nivel Bajo(%)	Nivel Alto(%)	Valor Óptimo para ác. málico(%)	Valor Óptimo para ác. cítrico(%)
Sorbato	0	0,05	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>
Ácido	0	1,00	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>
Lactato	0	1,50	<b>0,75</b>	<b>0</b>
Ginseng	0	3,00	<b>3,00</b>	<b>3,00</b>

Las combinaciones óptimas obtenidas a través del análisis estadístico nos indican que para el modelo que contiene ácido málico se obtiene una respuesta máxima de reducción de *Salmonella* en mango de 2,1 log UFC/g y para *E. coli* de 2,0 log UFC/g mientras que para el modelo con el ácido cítrico en mango se logra una reducción de 2,31 log UFC/g para *Salmonella* y de 1,51 log UFC/g para *E. coli*.

En el caso del análisis de los dos microorganismos juntos para el estudio de naranja, se obtuvieron las combinaciones óptimas de sustancias antimicrobianas que se observan en la tabla N° 11.

**Tabla N° 11. Combinación óptima de sustancias antimicrobianas sobre ambos microorganismos en naranja fresca cortada**

Sustancia	Nivel Bajo(%)	Nivel Alto(%)	Valor Óptimo para ác. málico(%)	Valor Óptimo para ác. cítrico(%)
Sorbato	0	0,05	<b>0</b>	<b>0,05</b>
Ácido	0	1,00	<b>1,00</b>	<b>0</b>
Lactato	0	1,50	<b>0</b>	<b>0</b>
Ginseng	0	3,00	<b>3,00</b>	<b>3,00</b>

Las combinaciones óptimas obtenidas a través del análisis estadístico nos indican que para el modelo que contiene ácido málico se logra una respuesta máxima de reducción de *Salmonella* en naranja de 2,99 log UFC/g y para *E. coli* O157:H7 de 1,56 log UFC/g mientras que para el modelo con el ácido cítrico en naranja se logra una reducción de 2,23 log UFC/g para *Salmonella* y de 1,25 log UFC/g para *E. coli* O157: H7.

Tomando en cuenta lo antes expuesto se decidió aplicar las combinaciones sugeridas por el análisis estadístico para el modelo del ácido málico, debido a que con ésta se logra una mayor reducción de las poblaciones de los patógenos en estudio, asegurando así productos sanos para el consumidor y con una prolongada vida en anaquel.

Los resultados obtenidos apoyan lo publicado por Karapinar (2006), quien afirma la efectividad de sustancias antimicrobianas naturales incluyendo varios ácidos como acético, ascórbico, cítrico y láctico, en el control de patógenos en frutas y verduras, especialmente en alimentos listos para el consumo.

A pesar de que una reducción de 5 log<sub>10</sub> como es exigida por la FDA para considerar el método apropiado para garantizar la inocuidad del producto no pudo ser alcanzada empleando las combinaciones de sustancias evaluadas a través de los diseños, podemos señalar que el uso combinado de sustancias antimicrobianas se considera efectivo

para el control de microorganismos patógenos, ya que la mayoría de las veces ellos no se encuentran en niveles tan altos en los alimentos.

**5. Evaluación del efecto antimicrobiano de distintas sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul y *E. coli* O157:H7 inoculados en naranjas y mangos frescos cortados y almacenados a 5° C por 21 días.**

Las frutas y vegetales troceados tienden a deteriorarse mucho más rápido que los completos, porque sus superficies están expuestas a los microorganismos. El principal riesgo que afecta a las frutas y vegetales es que microorganismos patógenos puedan tener acceso y/o crecer lo suficiente como para causar enfermedades a los consumidores, ya que estas poblaciones de microorganismos podrían aumentar si no se emplean adecuadas prácticas de procesamiento y conservación.

En las figuras N° 13 y 14, se observan los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antimicrobiano de las combinaciones que resultaron más efectivas para controlar ambos microorganismos en mango y naranja durante 21 días de almacenamiento bajo refrigeración a 5° C. Este experimento se realizó así para poder evaluar la efectividad de esas combinaciones de antimicrobianos a lo largo de un período de almacenamiento refrigerado (5° C) y en presencia de la flora nativa de las naranjas y mangos.

Una pequeña prueba preliminar de 5 días de almacenamiento adicionando lactato de calcio (0,75%) a naranjas fue realizada previamente, de manera de verificar si su firmeza se mantenía mejor, obteniendo que el resultado fue positivo, por lo que se tomó la decisión de añadir Lactato de calcio al 0,75% a la combinación óptima de sustancias antimicrobianas que se había obtenido para la naranja (punto 4).

Observando en la variable independiente el número de días de almacenamiento y en el eje de las ordenadas el log UFC/g de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul o *E. coli* O157:H7, en dichos gráficos se compararon los resultados obtenidos entre las frutas de naranja y mango tratadas con las frutas no tratadas (control).

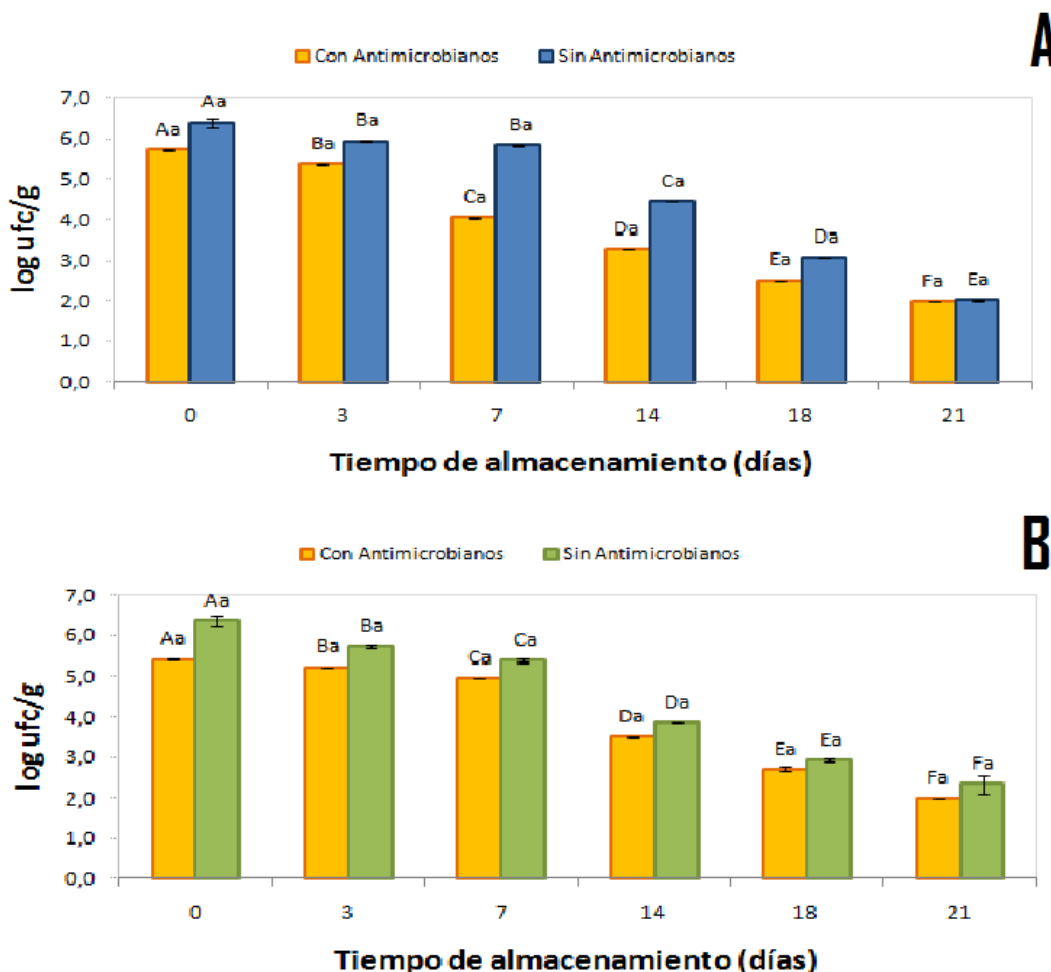


Figura 13. Efecto antimicrobiano de diferentes sustancias naturales sobre *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en naranja sin tratar y tratada con Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% (A) y mango sin tratar y tratado con Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% (B), frescos cortados, durante 21 días de almacenamiento. Las letras mayúsculas, indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los recuentos microbianos de *Salmonella* para un mismo tratamiento y fruta, mientras que las letras minúsculas, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos para un mismo microorganismo y fruta.

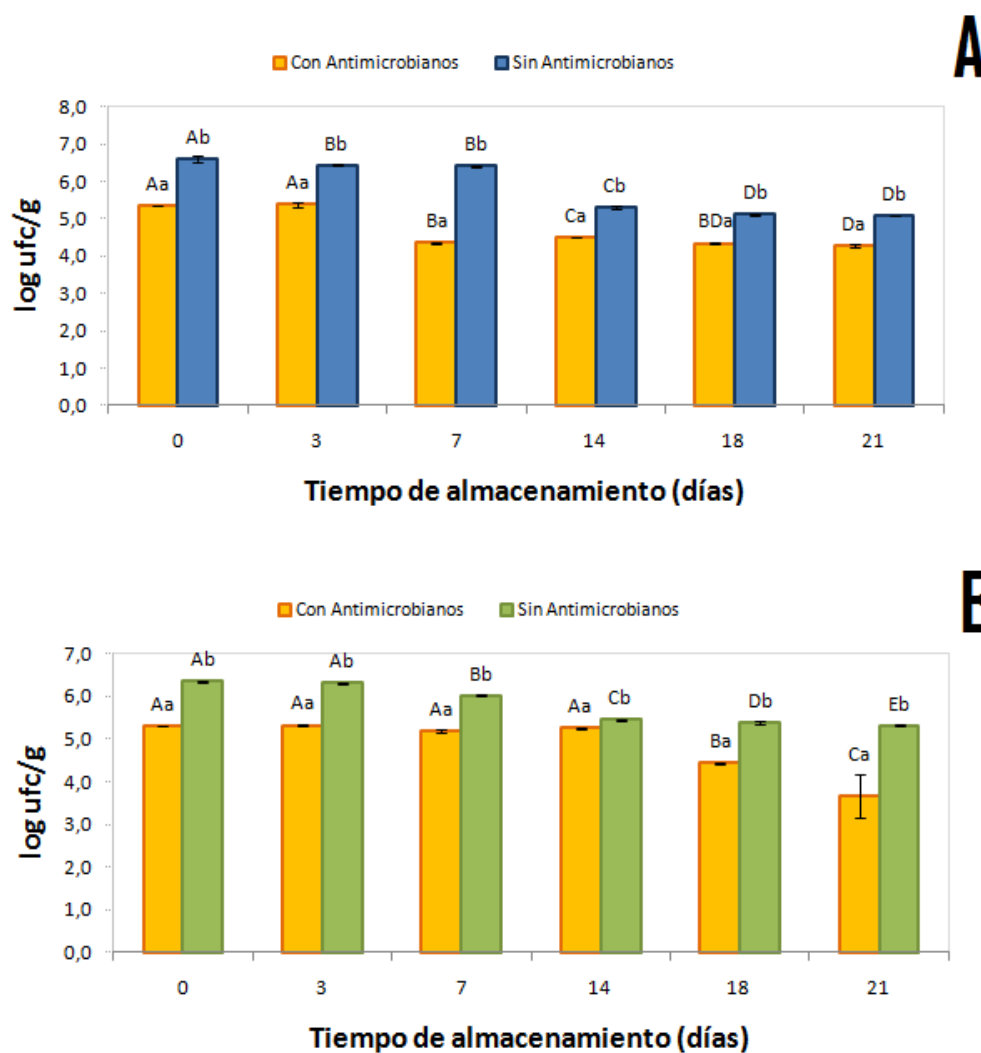
En la figura 13A se observa que los recuentos de *Salmonella* en naranja tratada a lo largo del tiempo de almacenamiento presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), empezando en el día cero (0) con 5,72 log UFC/g y llegando al día 21 con 2,51 log UFC/g. Se observa que en los dos primeros días (día 0 y día 3) se mantiene y luego al transcurrir los días de medición va disminuyendo la población del microorganismo. Un comportamiento similar fue observado para las muestras de naranja sin tratar (control), no obstante si comparamos la fruta tratada y sin tratar se aprecia que las reducciones de la población alcanzadas para cada tiempo son menores en las frutas tratadas, sin embargo esas diferencias resultaron no ser estadísticamente significativas.

Al analizar los resultados obtenidos para el mango (figura 13-B), de igual manera se detectaron diferencias significativas en las frutas tratadas al transcurrir el período de almacenamiento, de la misma forma para las frutas sin tratar (control) donde se observa también que al pasar el tiempo de almacenamiento disminuye la población de *Salmonella*. No obstante, cuando se comparan la fruta tratada y sin tratar no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Interpretando los resultados, se puede decir que el tratamiento aplicado (Ginseng 3%, ácido málico 1%, lactato de calcio 0,75% y sorbato de potasio al 0,05%) por 21 días de almacenamiento refrigerado (5° C) no resultó más efectivo para inactivar la población de *Salmonella* en naranja y mango que el tratamiento instantáneo (punto 4), ya que las disminuciones de la población a lo largo del tiempo en ambas frutas parecen deberse más bien a la temperatura de refrigeración (5° C) y al efecto de la flora nativa. Trepatt, 2002 reportó que la capacidad de crecimiento de *Salmonella* se reduce sustancialmente si la

temperatura es inferior a los 15° C, mientras que el crecimiento de la mayoría de las *Salmonellas* se evita si la temperatura es inferior a 7° C.

En la figura 14, se muestra el efecto de las sustancias antimicrobianas en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el tiempo (barras de color amarillo) y la evolución de éste microorganismo en la fruta sin tratar (barras de color azul y verde para naranja y mango respectivamente).



**Figura 14.** Efecto antimicrobiano de diferentes sustancias naturales sobre *E. coli* O157:H7 en naranja sin tratar y tratada con Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% (A) y mango sin tratar y tratado con Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% (B), frescos cortados, durante 21 días de almacenamiento. Las letras mayúsculas, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los recuentos de *E. coli* para un mismo tratamiento y fruta, mientras



**que las letras minúsculas, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos para un mismo microorganismo y fruta.**

El desarrollo de *E. coli* en naranja tratada (figura 14-A) no presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) en los dos primeros días de medición (día 0 y 3), es decir se mantuvo constante durante este período de almacenamiento (5,35-5,58 log UFC/g), mientras que para el día 7 ya se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con un recuento de 4,04 log UFC/g. Para los puntos siguientes a lo largo del tiempo se siguen observando diferencias significativas en los recuentos de la población de *E. coli* O157:H7 en las frutas tratadas.

En el caso de las frutas sin tratamiento (figura 14-A, barras azules), se observa que a lo largo del tiempo se registra diferencias estadísticamente significativas con excepción del día 7 y día 21, ya que dichos días se mantienen en relación a la medición del día anterior.

Al comparar los valores obtenidos entre los dos tratamientos (frutas tratadas y control), se observa que para todos los días en los que se realizó el conteo de la población de *E. coli* O157:H7 se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), señaladas en la figura con letras minúsculas, lo que nos permite inferir que en el caso de *E. coli* O157:H7 el tratamiento aplicado fue más efectivo.

En el caso del mango tratado (figura 14-B, barras amarillas), la población de *E. coli* O157:H7 se mantuvo constante entre el día cero (5,31 log UFC/g) y el día catorce (5,26 log UFC/g), donde no se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) representando esto con las letras mayúsculas sobre las barras, notándose que a partir del día 18, hasta el día 21 si hubo variaciones en las células viables del patógeno, mostrando

diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de las frutas tratadas durante el tiempo de almacenamiento.

Los resultados obtenidos para las muestras de mango sin tratar (control) (figura 14-B, barras color verde), se mantuvieron sin diferencias estadísticamente significativas entre el día 0 al día 7, con 6 log UFC/g aproximadamente, hasta llegar al día 21 con 5 log UFC/g aproximadamente.

Al comparar las muestras tratadas con las muestras control se observa una diferencia estadísticamente significativa (letras minúsculas sobre las barras), ya que para las muestras sometidas a las sustancias antimicrobianas se lograron reducir 3 ciclos log aproximadamente, mientras que para las muestras control solo se redujo 1 ciclo log aproximadamente.

Además de lo antes expuesto se aprecia que *E. coli* fue capaz de sobrevivir durante todo el tiempo de almacenamiento a 5° C y se mantuvo en el orden de  $10^3$  y  $10^5$  UFC/g para muestras tratadas y entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g para muestras control. Guevara (2000), obtuvo resultados similares, ya que también apreció que *E. coli* O157:H7 no es capaz de crecer bajo las condiciones de almacenamiento descritas, pero si de sobrevivir y mantenerse, convirtiéndola en un patógeno de cuidado para productos de mínimo procesamiento. Pao y col. (1998), también reportaron que los niveles de inóculo de *E. coli* O157:H7 en naranja Hamlin, se mantuvieron constantes en el tiempo de almacenamiento a temperaturas de 4° C y 8° C.

Este trabajo demostró la capacidad de *E. coli* de sobrevivir al tratamiento aplicado y a las condiciones de almacenamiento durante 21 días, 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.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para ambos microorganismos, se observa que para *E. coli* O157:H7, los resultados revelan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la inactivación de su población entre los dos tratamientos durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración, obteniéndose mayores recuentos de células viables en las muestras control, a pesar de que ambas muestras fueron inoculadas con el mismo nivel de inóculo ( $10^6$  UFC/g), mientras que para *Salmonella entérica* serv. Saintpaul, a pesar de obtener un mayor recuento de células viables en las muestras control no se registran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en comparación a los resultados obtenidos en las muestras tratadas para ambas frutas.

Debido a esto se puede decir que *E. coli* O157:H7 resultó ser más sensible como cepa, género y/o variedad al tratamiento de sustancias antimicrobianas aplicado.

Basándonos en los resultados obtenidos en las figuras 13 y 14, se puede señalar que deben tomarse precauciones que eviten la presencia de estos patógenos en frutas o productos mínimamente procesados durante su preparación, debido a que ciertas condiciones de antimicrobianos y la temperatura de refrigeración no son suficientes para prevenir la sobrevivencia de los mismos.

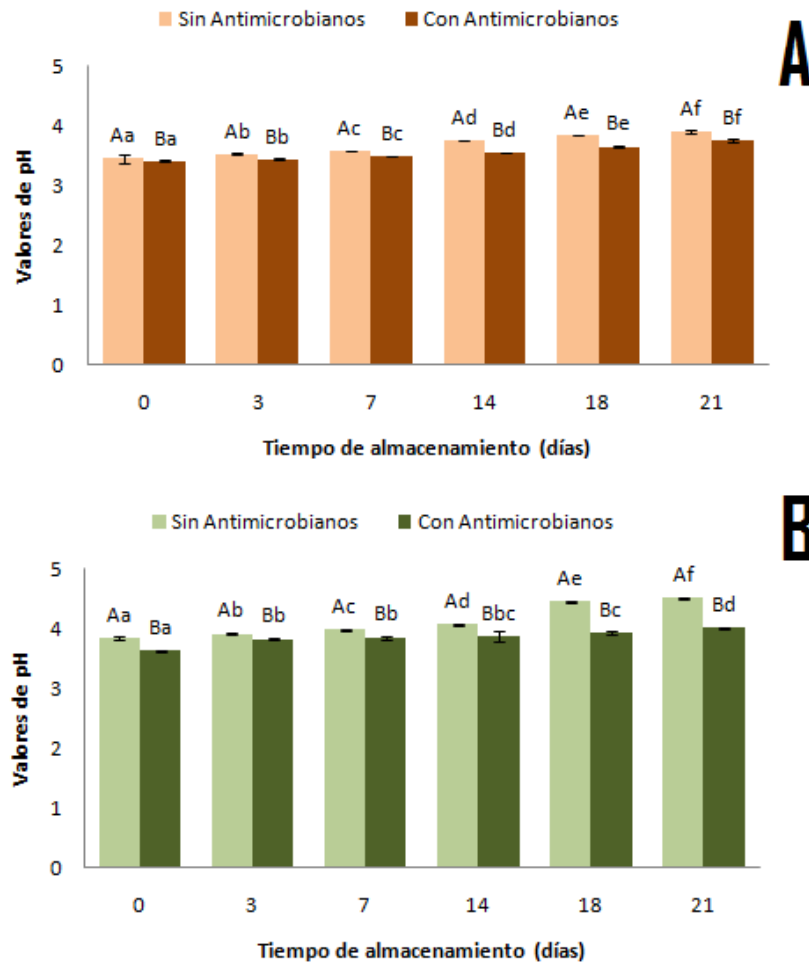
## **6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de diferentes sustancias naturales sobre la flora nativa de naranjas y mangos frescos cortados.**

A la hora de evaluar la vida útil de un producto es necesario conocer las características tanto físicas, químicas y microbiológicas del mismo inicialmente ( $T=0$ ), de

esta manera se puede obtener información si alguno de los parámetros durante el procesamiento y/o durante el tiempo de almacenamiento se ve afectado causando un cambio sobre la calidad de los atributos sensoriales. Para esta evaluación se utilizó de igual manera la combinación de sustancias antimicrobianas que resultó más efectiva en el punto 4 de éste trabajo (Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% en naranja y Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% en mango).

Durante la evaluación de la vida útil, se realizaron determinaciones de pH, firmeza y color, características físicas y químicas que dan una idea sobre la estabilidad de los frutos en estudio en cuanto a su posible deterioro por reacciones químicas, enzimáticas o por acción de microorganismos a lo largo del período de 21 días de almacenamiento en refrigeración.

A partir de los resultados obtenidos para las características evaluadas de naranjas y mangos frescos cortados a lo largo del período de almacenamiento se realizó un análisis estadístico para poder conocer la significancia que tuvo el tratamiento de las sustancias antimicrobianas sobre el pH de las frutas durante el período de almacenamiento en refrigeración. Estos datos se muestran en las figuras 15 y 16, donde se puede observar en el eje de las X los días correspondientes a la medición y en el eje de las ordenadas (Y) el valor correspondiente de pH encontrado.



**Figura 15. Cambios de pH en naranja sin tratar y tratada con Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% (A) y mango sin tratar y tratado con Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% (B), frescos cortados, durante 21 días a 5° C. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) del pH durante el tiempo de almacenamiento para un mismo tratamiento.**

En la figura 15-A se muestra el comportamiento del pH en muestras de naranjas frescas cortadas tratadas y sin tratar con sustancias antimicrobianas (Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75%). En esta figura se observa que el pH fue aumentando a lo largo del tiempo de almacenamiento para ambos tipos de muestras, tratadas y sin tratar, detectándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. Además

se observan diferencias entre los valores de pH de las muestras tratadas y sin tratar, siendo los valores de pH de las muestra tratadas menores como resultado de que una de las sustancias utilizadas en ese tratamiento es ácido málico. El comportamiento de aumento de pH a lo largo del tiempo para ambos tipos de muestras es posible que se deba al proceso de maduración de las frutas el cual continúa aun cuando están frescas cortadas o también a los metabolitos resultantes del crecimiento microbiano.

Por otra parte en la figura 15-B se muestra el comportamiento del pH de en trozos de mango tratados y sin tratar con sustancias antimicrobianas (Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75%), donde se observa que el pH de la fruta sin tratar aumentó significativamente en el tiempo, mientras que en la fruta tratada el pH se mantuvo más o menos constante con ligeras variaciones. Estos resultados nos permiten inferir que el tratamiento con sustancias antimicrobianas de alguna manera retrasó el proceso de maduración de la fruta e inhibió el crecimiento microbiano de la flora nativa lo que influyó para que el pH no aumentara como ocurrió en la fruta sin tratar.

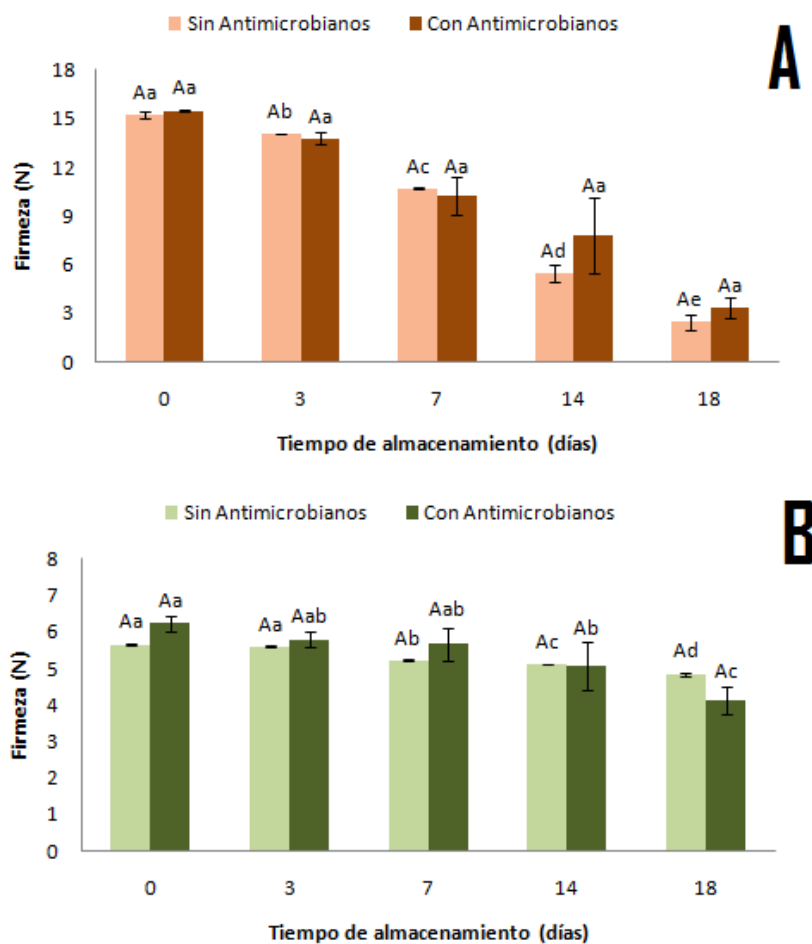
Con lo antes expuesto se verifica que las frutas tratadas siempre mantienen un pH menor en comparación a las frutas sin tratar, esto puede ser influenciado por la adición de ácido málico (1%) entre las sustancias antimicrobianas aplicadas.

En general, el pH de ambas frutas permaneció entre 3,41 y 4,52, siendo ideal para minimizar el oscurecimiento enzimático considerando que el pH óptimo para la actividad enzimática se encuentra entre 6,00 y 7,00 (Araújo, 1999).

Otro parámetro de gran importancia en la caracterización física y química de las frutas frescas es la firmeza, analizada a través de un análisis de perfil de textura (APT). En la figura 16 se presenta el comportamiento de dicho parámetro para la naranja y el mango

frescos cortados con y sin tratamiento. Mostrando una curva de Firmeza (N) vs. Tiempo de almacenamiento en días con el análisis estadístico para poder conocer la significancia que tuvo el tratamiento de las sustancias antimicrobianas sobre la firmeza de las frutas durante el período de almacenamiento en refrigeración.

Los valores de firmeza se registraron hasta el día 18 debido a que para el día 21 los trozos de frutas tenían cambios visibles de deterioro (ver figura 18).



**Figura 16. Cambios de firmeza en naranja sin tratar y tratada con Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% (A) y mango sin tratar y tratado con Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% (B), frescos cortados, durante 21 días a 5° C. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) de la firmeza durante el tiempo de almacenamiento para un mismo tratamiento.**

En el caso de la gráfica representada en la figura 16-A, se observa que para la naranja sin tratamiento existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el tiempo, observando que la firmeza de las muestras (control) fue disminuyendo a medida que avanzaron los días de almacenamiento. Para las muestras tratadas no se registró diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) en la disminución de la firmeza.

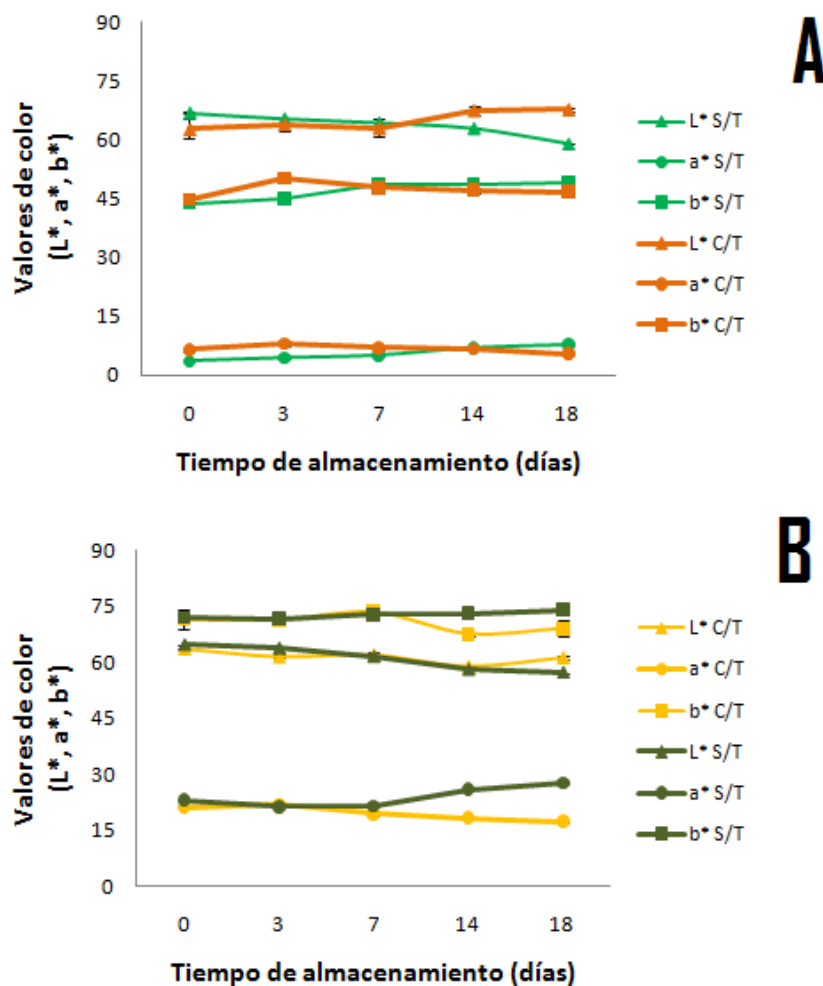
Al comparar los resultados obtenidos entre las muestras de naranja control y las tratadas, se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) a lo largo de los 18 días de almacenamiento, a pesar de que las muestras control obtuvieron los valores mas bajos de firmeza.

Al observar la figura 16-B, para los mangos sin tratamiento, se aprecia que a los dos primeros días se mantiene la firmeza, ya que no se registran diferencias significativas, es a partir del séptimo día que comienzan a registrarse diferencias estadísticamente significativas. Para las muestras tratadas, se observan diferencias significativas al inicio, con cierta estabilidad de la firmeza durante el día 3 al día 14, disminuyendo considerablemente para el día 18.

Las muestras de mango control y sin tratamiento, al igual que en las naranjas, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, pero en el caso del mango las muestras control mantuvieron mas su firmeza, obteniendo los valores mas elevados en el último día de almacenamiento. Esto difiere con lo expresado por Chantanawarangoon (2000), quien experimentó con diferentes tratamientos de calcio (0%, 0.5% y 1%) para la retención de la firmeza de cubos de mango consiguiendo una vida en anaquel de 5, 7 y 9 días respectivamente, y aseguró que los mangos tratados con 1% de  $\text{CaCl}_2$  tuvieron una mayor firmeza de la pulpa que aquellos tratados con 0.5% o agua (control).



Asimismo, se realizó un análisis de color de las naranjas y mangos frescos cortados, tratados con sustancias antimicrobianas y sin tratar, midiendo la luminosidad ( $L^*$ ), la proporción de rojo a verde ( $a^*$ ) y de amarillo a azul ( $b^*$ ). Los resultados de estos análisis se pueden observar en la figura 17.



**Figura 17 . Cambios de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , correspondientes al color en naranja sin tratar y tratada con Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% (A) y mango sin tratar y tratado con Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% (B), frescos cortados, durante 21 días a 5° C. Las siglas C/T significan Con Tratamiento y las S/T indican Sin Tratamiento.**

En la figura 17-A se pueden observar los cambios ocurridos en los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en naranja tratada y naranja control. En las naranjas sin tratamiento (control) hubo una tendencia a la disminución del parámetro  $L^*$  a lo largo del tiempo que se relaciona con el oscurecimiento de la fruta, tornándose más opaca, además de un pequeño aumento del parámetro  $a^*$  y del parámetro  $b^*$ , encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores a lo largo del tiempo.

En las naranjas con tratamiento, el parámetro  $L^*$  aumenta ligeramente a lo largo del período de almacenamiento demostrando así que las sustancias aplicadas pueden influir sobre éste parámetro retardando el oscurecimiento de las frutas. Además, se observa que los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  se mantienen o aumentan muy levemente a lo largo del tiempo de almacenamiento no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ellos. Lo que confirma el efecto positivo que puede tener el uso de las sustancias conservantes aplicadas.

Para el parámetro  $L^*$  de color, las muestras tratadas con sustancias antimicrobianas mostraron un aumento a lo largo del tiempo de almacenamiento (figura 17-A). Este comportamiento no se presentó en las naranjas control (sin tratamiento), donde se observó una disminución, pero para el día 14 la disminución fue más evidente, es decir eran menos luminosas.

Tomando en cuenta el parámetro  $b^*$ , para el día cero se obtuvo valores muy similares para ambos tratamientos, se observa un aumento significativo con respecto a las naranjas tratadas durante el día 3, pero para los últimos días (7, 14 y 18) se observa una disminución, lo que indica que las naranjas tratadas se hacen menos amarillas en comparación a las no tratadas.

En cuanto a los valores registrados para el parámetro  $a^*$  (rojo-verde) se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las naranjas tratadas y las control, donde se encuentra una notable disminución de éste parámetro para las muestras tratadas, este comportamiento nos indica que el producto va pasando de un cierto grado de rojo hacia el verde.

Se puede decir en términos generales, que las naranjas tratadas se hacen mas brillantes, pero disminuye su tono amarillo, lo que hace que la fruta adquiera una apariencia oscura.

En el caso de la figura 17-B, referente a la evolución del color en mango durante el almacenamiento, para el parámetro  $L^*$ , se observan fluctuaciones, donde a lo largo del tiempo no se indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos. Al llegar a los 18 días de almacenamiento las muestras tratadas presentan mayor luminosidad que las muestras control, por lo que se puede decir que en las muestras control estaba ocurriendo una reacción de oscurecimiento.

Tomando en cuenta el parámetro  $b^*$  (amarillo-azul), se determinó que las muestras de mango control y las tratadas no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p > 0,05$ ), sin embargo se observó que para el final del período de almacenamiento el parámetro  $b^*$  para las muestras tratadas disminuyó levemente en comparación a las muestras control, lo cual indica que en el transcurso de los días los trozos de mango con tratamiento fueron perdiendo, en cierto grado, su coloración amarilla, posiblemente por la inestabilidad de los carotenoides frente a la presencia de ácidos (ácido málico añadido).

Por otra parte, se puede observar un aumento del parámetro  $a^*$  para los mangos sin tratar, aumentando el color rojo debido a la degradación de la clorofila por la maduración y la síntesis de los carotenos causando una intensificación del color del fruto que fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el tiempo. Mientras que para los mangos con tratamiento, con el paso del tiempo disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) éste parámetro, por lo que podríamos pensar que el tratamiento aplicado retarda la maduración del fruto y por esto el parámetro  $a^*$  no aumenta. Pero también es importante señalar que los carotenoides que van del color amarillo al rojo en frutas, se vuelven inestables al ser expuestos a ácidos lo que podría explicar la disminución del parámetro  $a^*$  en esta condición de tratamiento.

Para el parámetro de color  $a^*$ , el análisis estadístico de los trozos de mango (figura 17-B) no tratado (control) y tratado con sustancias antimicrobianas, durante el almacenamiento indicó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los dos tratamientos. No obstante, en cuanto a los parámetros  $b^*$  y  $L^*$  estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el control y la fruta tratada. En general, los mangos tratados al final del tiempo de almacenamiento, tienen una mayor luminosidad que las muestras control, pero disminuyen su tonalidad amarilla y su tonalidad roja.

Como se puede apreciar en las figuras 16 y 17 los resultados de textura y color solo se reportan hasta los 18 días debido a que a partir del día 21 de almacenamiento se presentó crecimiento fúngico en la superficie de las frutas (figura 18) lo que impidió realizar estas determinaciones.

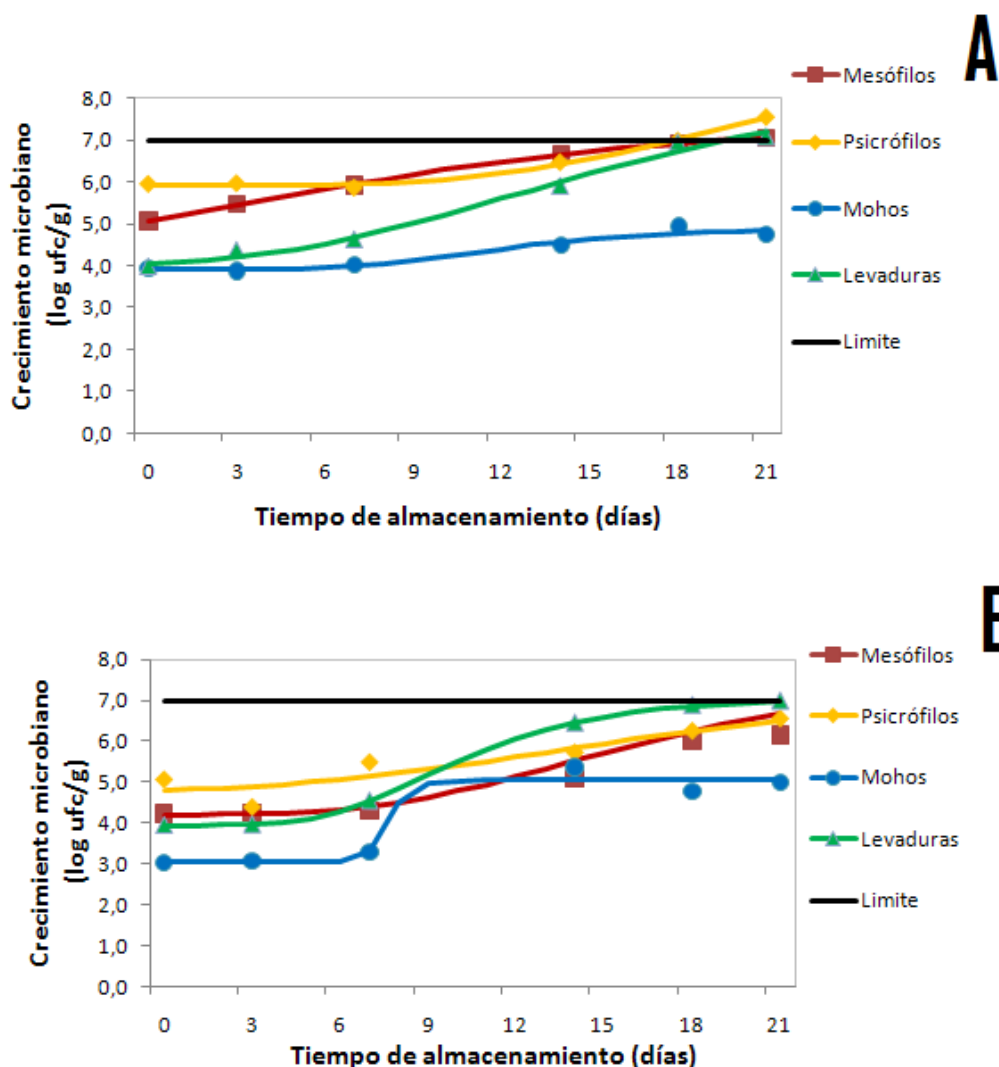


**Figura 18. Muestras de mango (izquierda) y naranja (derecha) tratadas con sustancias conservantes y almacenadas por 21 días de almacenamiento a 5 °C.**

La figura 18 muestra las frutas de mango y naranja tratados con sustancias antimicrobianas para el día 21 de almacenamiento a 5°C, la foto a la izquierda contiene los mangos con presencia visible de crecimiento fúngico. La imagen de la derecha muestra la naranja con un exudado blancuzco, ambas frutas para éste día presentaban un aroma desagradable y cambios visibles en sus características organolépticas. Este resultado podría deberse a que la combinación de sustancias utilizada como conservantes inhibió el crecimiento bacteriano de las frutas ofreciendo menos competencia y favoreciendo el crecimiento de mohos y levaduras que son los responsables de esos cambios físicos observados en las frutas para este tiempo. Esto nos demuestra como puede variar la flora microbiana de un producto dependiendo del tratamiento y nos sugiere que es importante añadir un compuesto antifúngico efectivo a la combinación de antimicrobianos que se use para la conservación de las frutas.

En el presente estudio se evaluó además la actividad microbiológica en el tiempo (0, 3, 7, 14, 18 y 21 días) de almacenamiento en refrigeración (5° C) de naranjas y mangos 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 las frutas, mostrándose el comportamiento de dichos microorganismos

en las figuras 19 y 20. Es importante señalar que estas figuras muestran los recuentos puntuales obtenidos para cada tiempo para cada población y la curva modelada utilizando el modelo de Gompert`z.



**Figura 19. Datos puntuales y curva modelada (Gompert`z) de los recuentos de la flora nativa en naranja fresca cortada sin tratar (A) y naranja fresca cortada y tratada con Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% (B) durante 21 días de almacenamiento a 5° C.**

En la figura 19-A se muestra el comportamiento de las poblaciones de aerobios mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras en naranja fresca cortada sin tratamiento (control), donde se observa que las poblaciones de aerobios mesófilos y levaduras

incrementan desde los primeros días del experimento, mientras que las poblaciones de psicrófilos y mohos se mantienen más o menos constantes hasta los 7 días de almacenamiento, tiempo a partir del cual incrementan. Adicionalmente podemos señalar que el análisis estadístico de los recuentos de cada población a lo largo del tiempo mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellos.

En la figura 19-B se aprecia el comportamiento de las poblaciones de aerobios mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras en naranja fresca cortada tratada con sustancias antimicrobianas (ácido málico, Ginseng y lactato), observándose que las poblaciones de aerobios mesófilos, levaduras y mohos se mantuvieron más o menos constantes durante los primeros 7 días del experimento e incrementaron a partir de este tiempo, mientras que la población de psicrófilos aumentó aunque muy lentamente desde el inicio del experimento. Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) fueron encontradas al comparar los recuentos para cada población de microorganismos en el tiempo.

Si comparamos ahora las gráficas obtenidas para las naranjas tratadas y sin tratar podemos apreciar que inicialmente a tiempo cero se logró una reducción de las poblaciones de aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos en las naranjas tratadas de aproximadamente 1 ciclo logarítmico en comparación con las naranjas no tratadas, lo que demuestra la efectividad del tratamiento con sustancias antimicrobianas. Además observamos que la población de aerobios mesófilos en las naranjas tratadas se mantiene constante durante los primeros 7 días, es decir su crecimiento se ve inhibido, mientras que en las no tratadas esta población incrementa significativamente desde el tiempo cero. Así mismo es importante señalar que únicamente la población de levaduras en las naranjas tratadas es la que alcanza un nivel de  $10^7$  UFC/g a partir de los 18 días de almacenamiento, resultando ser la flora dominante del producto, mientras que en las naranjas sin tratar las poblaciones de aerobios

mesófilos, psicrófilos y levaduras alcanzan ese nivel a partir de los 18 días, siendo los psicrófilos la flora dominante. Todos estos resultados corroboran la efectividad del tratamiento aplicado ya que demuestran que hubo inhibición del crecimiento de la flora nativa.

Se ha reportado por numerosos autores que las levaduras son los microorganismos predominantes encontrados en ensaladas de frutas y los principales causantes del deterioro de las mismas, presentando recuentos entre 2,0 y 9,72 log UFC/g (Tournas y col. 2006).

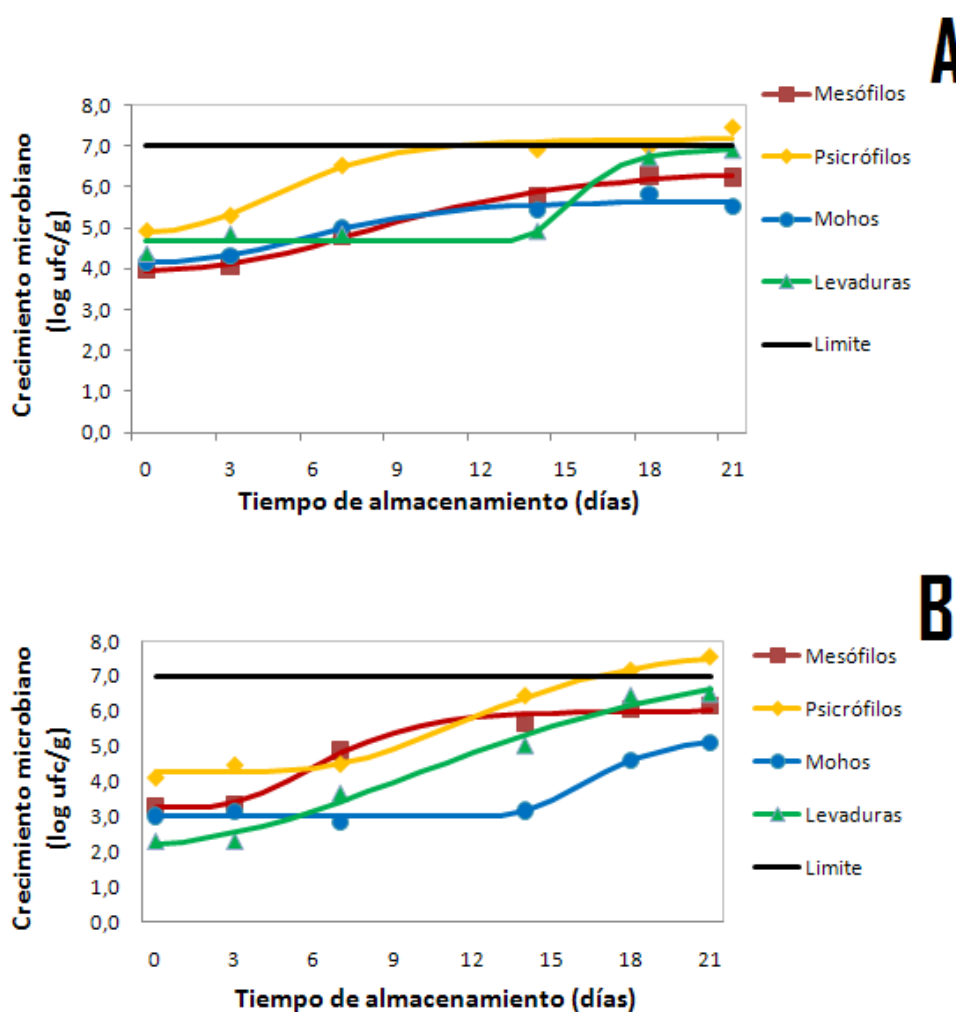


Figura 20. Datos puntuales y curva modelada (Gompert'z) de los recuentos de la flora nativa en mango fresco cortado sin tratar (A) y mango fresco cortado y tratado con Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% (B) durante 21 días de almacenamiento a 5° C.



Al observar la figura 20-A se muestra el comportamiento de las poblaciones de la flora nativa en mango fresco cortado sin tratamiento (control), donde se observa que las poblaciones de aerobios mesófilos, aerobios psicrófilos y mohos aumentan desde los primeros días del experimento, mientras que la población de levaduras se mantiene constante hasta el día 14 de almacenamiento, tiempo a partir del cual incrementa su población.

Al verificar el análisis estadístico a lo largo del tiempo se observó que las únicas poblaciones que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) fueron los aerobios mesófilos y los mohos, con respecto a las otras poblaciones de microorganismos presentes en la flora nativa.

En la figura 20-B se aprecia de igual manera el comportamiento de la flora nativa en mango fresco cortado tratado con Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75%, observándose que las poblaciones de aerobios mesófilos, aerobios psicrófilos y mohos se mantuvieron más constantes al inicio del experimento incrementando su población a partir del día 3, 7 y 14, respectivamente, mientras que la población de levaduras se incrementó desde el inicio del experimento, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en los recuentos para cada población de microorganismos a lo largo del tiempo.

En general, al comparar las gráficas obtenidas para el mango sin tratamiento y con tratamiento apreciamos que al comienzo ( $T=0$ ), al igual que en la naranja, se logró una reducción de las poblaciones de aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos en los mangos con tratamiento de 1 ciclo logarítmico aproximadamente, en comparación con los mangos sin tratamiento, demostrándose una vez más la efectividad del tratamiento aplicado. Al observar que la población de aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos en mangos tratados se

mantiene constante durante los primeros días, se verifica que su crecimiento se ve afectado por las sustancias antimicrobianas.

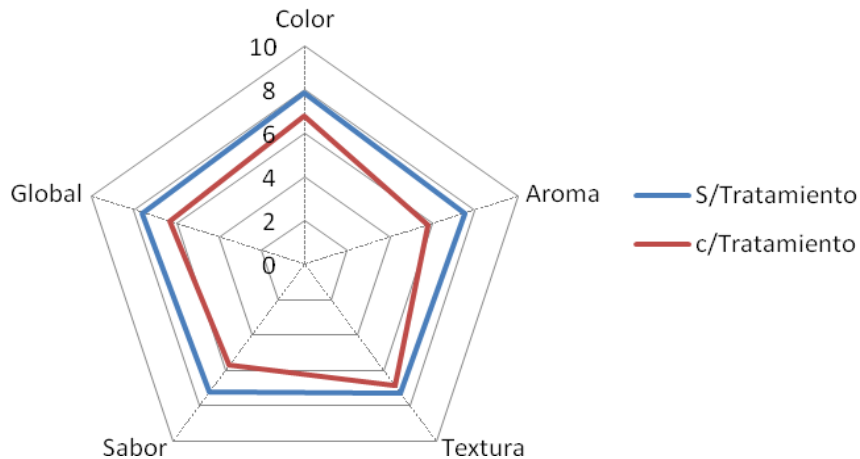
Los psicrófilos resultaron ser la flora dominante en los mangos, ya que fueron la única población que alcanzó un nivel de  $10^7$  UFC/g tanto en mangos sin tratar como en los tratados para los días 14 y 18 de almacenamiento, respectivamente.

Según Brackett y col. (2001), aseguran que las poblaciones de microorganismos aerobios en productos vegetales pueden ser altas alrededor de  $10^6$  UFC/g, aunque el rango típico puede variar entre 4-6 log UFC/g, mientras que los mohos y las levaduras en los vegetales superan los 5 log UFC/g. Al comparar estos resultados y tomar en consideración que la materia prima utilizada se trataba de frutas frescas sin esterilización previa, éstos presentaron un recuento microbiano dentro de los límites reportados para frutas y vegetales, por los autores anteriormente mencionados.

## **7. Evaluación sensorial de las muestras de fruta frescas cortadas.**

Se aplicó una prueba sensorial afectiva con escala hedónica de 9 puntos, con la que se evaluaron atributos como color, aroma, textura, sabor y apreciación global de las naranjas y los mangos frescos cortados con y sin tratamiento. En la misma, el punto 1 correspondía a “me disgusta extremadamente” y el punto 9 “me gusta extremadamente” (ver figura 7).

Con los datos obtenidos se realizó una grafica radial donde se muestran los valores para cada uno de los atributos evaluados en las frutas tratadas y no tratadas (figuras 21 y 22). De igual forma, fueron analizados estadísticamente cada uno de los atributos empleando un análisis de varianza.

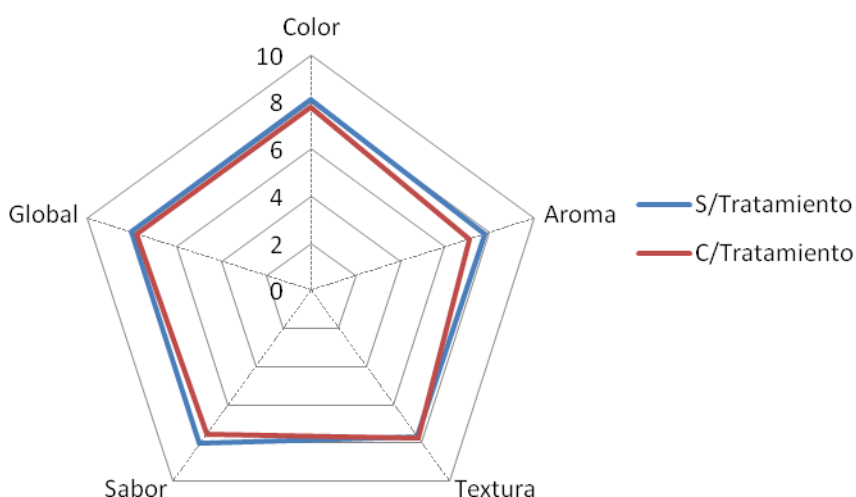


**Figura 21. Evaluación sensorial de la naranja fresca cortada con o sin tratamiento de sustancias antimicrobianas (Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75%)**

En la figura 21 se aprecian diferencias entre los valores otorgados por los panelistas para los atributos evaluados en naranjas frescas cortadas tratadas y sin tratar, observándose que la mayoría de los atributos en las naranjas tratadas muestran valores menores que los encontrados para las muestras sin tratar y al aplicar el análisis estadístico se detectó un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) para los atributos aroma, sabor y apreciación global, mientras que para los atributos de color y textura éstas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ). Además se observa que los valores asignados para las muestras tratadas están en 6 o por arriba de este valor, estando los valores de las muestras sin tratar cercanos o iguales a 8. El hecho de que los valores de las muestras tratadas estén por arriba de 4 (punto en la escala que indicaba que la muestra le es indiferente al panelista) nos dice que el panelista acepta la muestra, es decir no le desagrada.

A partir de los valores obtenidos por la prueba sensorial de mango fresco cortado con y sin tratamiento realizada, se obtuvo una gráfica radial (figura 22) donde se muestra el

puntaje promedio asignado por los panelistas para cada uno de los atributos evaluados, observándose que todos los parámetros mostraron un comportamiento similar entre los mangos frescos cortados sin tratar y los tratados, estando los valores por encima de 4 en la escala hedónica. Además al aplicar el análisis estadístico ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ). Estos resultados demuestran que para el panelista no existen diferencias entre los mangos tratados y sin tratar.



**Figura 22. Evaluación sensorial del mango fresco cortado con o sin tratamiento de sustancias antimicrobianas (Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75%).**

## VII. CONCLUSIONES

- Todas las sustancias naturales evaluadas (*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 sustancias antimicrobianas aplicados basado en un diseño factorial de múltiples niveles que resultaron más efectivos fueron aquellos que incluyeron un ácido orgánico, siendo el efecto del ácido málico mayor que el del ácido cítrico y luego aquellos tratamientos que contemplan el uso del ácido y el Ginseng, siendo la combinación más efectiva cuando se usa la mayor concentración de Ginseng (3%).
- Las combinaciones de sustancias que de acuerdo a los resultados del diseño aplicado resultaron más efectivas contra *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en naranjas y mangos frescos cortados fueron: Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% en naranja y Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% en mango.
- Las combinaciones de sustancias que de acuerdo a los resultados del diseño aplicado resultaron más efectivas contra *E. coli* O157:H7 en naranjas y mangos frescos cortados fueron: Ginseng 3%, ác. Málico 1% y lactato 0,75% en naranja y Ginseng 3%, ác. Málico 1%, sorbato 0,05% y lactato 0,75% en mango.

- Los resultados de las combinaciones de sustancias antimicrobianas aplicados sugieren que existe algún tipo de interacción entre el Ginseng y las sales (sorbato de potasio y lactato de calcio) que afecta negativamente la efectividad del Ginseng contra la población de *Salmonella*.
- El estudio del comportamiento de *Salmonella entérica* serv. Saintpaul en las frutas tratadas y almacenadas a 5°C por 21 días, resultó no ser significativo y la disminución de la población de dicho patógeno parece deberse más bien a la temperatura de refrigeración y a la flora nativa existente en la fruta.
- En la evaluación del comportamiento de *E. coli* O157:H7 en las frutas tratadas y almacenadas a 5°C por 21 días, el tratamiento resultó ser más efectivo, por ser ésta más sensible como cepa, género y/o variedad al tratamiento de sustancias antimicrobianas aplicado.
- El crecimiento de las poblaciones de aerobios mesófilos, psicrófilos, mohos y levaduras, en los trozos de naranja y mango tratados y almacenados por 21 días a 5°C fue retardado por efecto de la aplicación de una combinación de sustancias antimicrobianas, lo que se traduce en un aumento de la vida útil de los mismos.
- El pH de las frutas tratadas se mantuvo más o menos constante, debido a que el tratamiento con sustancias antimicrobianas retrasó el proceso de maduración de la fruta e inhibió el crecimiento microbiano de la flora nativa.
- En el análisis de color, aumentó ligeramente L\* y disminuyeron a\* y b\*, demostrando que las sustancias antimicrobianas retardan el oscurecimiento de las frutas y a su vez, la madurez de las mismas.

- El estudio de evaluación sensorial demostró que la aplicación de una combinación de sustancias antimicrobianas influyó ligeramente sobre los atributos de las frutas frescas cortadas evaluadas, resultando ambas frutas ampliamente aceptadas por los panelistas.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

- ❖ Deben realizarse más estudios para evaluar los efectos antimicrobianos sobre diferentes frutas debido a que la concentración efectiva de cada antimicrobiano dependerá del tipo de fruta al cual se va a incorporar, así como el microorganismo sobre el cual se espera que manifieste sus efectos inhibitorios.
  
- ❖ Deben realizarse otros estudios con las sustancias antimicrobianas empleadas pero realizando la extracción de forma natural de los distintos compuestos, con el fin de reducir los costos y posiblemente obtener mejores resultados suponiendo que el efecto antimicrobiano sea mayor.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agusti, M. 2004. Fruticultura. Primera Edición. Editorial Mundiprensa. Madrid, España.
- Ahn, J., Grün, I., Mustapha, A. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. *J. Food Protect.* **67**: 148-155.
- Ahn, J., Grün, I., Mustapha, A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiol.* **24**: 7-14.
- Aleman, M. 2009. Efectividad de diferentes tratamientos desinfectantes sobre *Salmonella* Typhimurium y la probabilidad de infiltración en tomates hidropónicos durante operaciones de lavado. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.
- Araújo, J. 1999. Química de alimentos. Teoría e Práctica. Visçosa: UFV.
- Beuchat, L. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. In: Wilson, C., Droby, S. (Ed). Microbial Food Contamination. CRC Press. London, UK. p: 149-169.
- Brackett, R., Splittstoesser, D. 2001. Fruits and Vegetables. En: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Fourth Edition. APHA. New York. Chapter 49. 515–518p.
- Calderon G, MI. 2009. Impacto del consumo de frutas en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles. Seminario II de Maestría. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- CDC [Centers for Disease Control and Prevention]. Annual listing of foodborne disease outbreaks, United States, 1990-2006.

[[http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak\\_data.htm](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak_data.htm)]. [Consulta: 28 de abril de 2009].

Chantanawarangoon, S. 2000. Quality maintenance of fresh-cut mango cubes. M.S. Thesis in Food Science, University of California at Davis.

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 (1ª Revisión). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Venezuela.

Dauthy, M. 1995. Fruit and vegetable processing. Cap. 2. Bulletin Service, FAO, Roma.

Davidson, P.M., Parish, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* **43**:148-155.

Davidson P., Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. In: Zeuthen P., Bogh-Sorensen, L. (Ed.). Food preservation techniques. Washington, DC., USA. P 5-29.

D'Aoust, J. 1997. *Salmonella* species. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T. J. (2ª Edition). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington DC: ASM Press. p: 129-158

Doyle, M.P, Zhao, T., Meng, J., Zhao, S. 1997. Escherichia coli O157:H7. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington DC: ASM Press. P: 171-191.

Galán, V. 1999. El Cultivo del Mango. Primera Edición. Editorial Mundiprensa. Madrid, España.

- Gossiau A., Chen, K.Y. 2004. Nutraceutical, apoptosis and disease prevention. *Nutrition* **20**: 95-102.
- Guevara, L. 2000. Sobrevivencia y crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 en ensaladas con procesamiento mínimo empacadas en atmósferas modificadas. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Gundgaard, J., Nielsen, J.N., Olsen J., Sorensen, J. 2003. Increased intake of fruit and vegetables. Estimation of impact in terms of life expectancy and healthcare costs. *Public Health Nutr.* **6**: 25-30.
- Harris LJ, Farber JN, Beuchat LR, Parish ME, Suslow TV, Garrett EH and Busta FF. 2003. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *CRFS&FS.* **2**(1): 78-141.
- Hashimoto, K., Kawamata, S., Usui, N., Tanaka, A., Uda, Y. 2002. *In Vitro* induction of the of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in human hematoma cells by food extracts. *Cancer Lett.* **180**: 1-5.
- [Http://www.mangoecuador.org](http://www.mangoecuador.org) [Consulta: 22 de Julio de 2010]
- [Http://www.naranjasvitaminadas.com](http://www.naranjasvitaminadas.com) [Consulta: 22 de Julio de 2010]
- ICMSF. 1996. Intentionally pathogenic *Escherichia coli*. Microbiol especifications of food pathogens. First Edition. Blackie Academic & Professional London.
- IFPA 2002. International Fresh-cut Produce Asociation. Http: www. fresh- cuts.org.
- Jayaprakasha, G., Selvi, T., Sakariah, K. 2002. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res. Int.* **36**: 117-122.
- Karapinar, M., Sengun, I. 2006. Antimicrobial effect of koruk (unripe grape-*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables. *Food control.*

- Pao, S., Brown, E. y Schneider, K. 1998. Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *J Food Sci.* **63**:359-362.
- Ramírez, J., Contreras, G., Gómez, M. 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Lat Am. Microbiol.* **47**: 92-101.
- 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. Universidad de Lleida. Lleida, España.
- Rivera, J. 2006. Determinación de los índices de maduración de la naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) para la elaboración de un vino de frutas. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.
- 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.
- Robles-Sanchez, M., Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Astiazarán-García, H., Gonzalez-Aguilar, G., Cruz-Valenzuela, R. 2007. Frutos tropicales mínimamente mprocesados: potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia.* **32**: 227-232.
- Rosca-Casian, O., Parvu, M., Vlase, L., Tamas, M. 2007. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia.***78**: 219-222.
- Tapia, M., Almazora, S., Welti, J. 1996. Combination of preservation factors applied to minimal processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36(6)**: 629-659.

- Tan, B.K.H., Vanitha, J. 2004. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: A review. *Curr. Med. Chem.* **11**: 1423-1430.
- Temple, N.J. 2000. Antioxidant and disease: More questions than answers. *Nutr. Res. Rev.* **20**: 449-459.
- Trepat, M. 2002. Incidencia y Comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Tournas, V., Heeres, J., Burgess, L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology.* **23**: 684-688.
- USFDA [U.S. Food and Drug Administration]. Guide for industry: Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables. February 2008. [<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodgui4.html#ch4>]. [Consulta: 28 de abril de 2009].
- 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.
- Zapata, L., Gerard, L., Davies, C., Oliva, L., Schvab, M. 2007. Correlación matemática de índices de color del tomate con parámetros texturales y concentración de carotenoides. Ciencia, Docencia y Tecnología. Universidad Nacional de Entre Ríos. Argentina. Pp. 207-226. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/>. Ultima consulta: Diciembre 2009.

## X. ANEXO

### Diseño Factorial Multi-nivel

Repeticiones	Sorbato K	Ac Malico o Cítrico	Lactato Ca	Antimicrobiano	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
1	2	2	2	2	_____	_____
1	1	1	1	2	_____	_____
1	2	1	2	2	_____	_____
1	1	1	1	3	_____	_____
1	2	1	2	4	_____	_____
1	2	1	2	3	_____	_____
1	2	1	2	1	_____	_____
1	2	2	2	1	_____	_____
1	2	1	2	1	_____	_____
1	1	1	1	4	_____	_____
1	1	2	1	1	_____	_____
1	1	1	1	1	_____	_____
1	1	1	1	3	_____	_____
1	1	1	1	4	_____	_____
1	1	2	1	3	_____	_____
1	2	2	2	1	_____	_____
1	2	2	2	2	_____	_____
1	1	2	1	4	_____	_____
1	1	1	1	1	_____	_____
1	2	2	2	4	_____	_____
1	2	2	2	3	_____	_____
1	1	2	1	1	_____	_____
1	1	2	1	2	_____	_____
1	2	2	2	3	_____	_____
1	2	1	2	4	_____	_____
1	1	2	1	3	_____	_____
1	2	1	2	3	_____	_____
1	2	2	2	4	_____	_____
1	1	2	1	4	_____	_____
1	1	2	1	2	_____	_____
1	2	1	2	2	_____	_____
1	1	1	1	2	_____	_____

Repeticiones	Sorbato K	Ac Malico o Cítrico	Lactato Ca	Antimicrobiano	Salmonella	<i>E. coli</i> O157:H7
2	2	1	2	3	_____	_____
2	1	1	1	4	_____	_____
2	2	2	2	4	_____	_____
2	1	1	1	2	_____	_____
2	2	2	2	3	_____	_____
2	1	2	2	3	_____	_____
2	2	1	2	4	_____	_____
2	1	2	2	1	_____	_____
2	2	2	2	3	_____	_____
2	1	2	1	2	_____	_____
2	1	2	1	4	_____	_____
2	1	1	1	3	_____	_____
2	1	1	1	1	_____	_____
2	2	2	1	4	_____	_____
2	1	2	1	4	_____	_____
2	1	1	2	2	_____	_____
2	1	2	2	3	_____	_____
2	2	1	1	2	_____	_____
2	2	2	1	1	_____	_____
2	1	1	2	1	_____	_____
2	1	2	2	2	_____	_____
2	2	2	1	1	_____	_____
2	2	2	1	2	_____	_____
2	2	2	2	2	_____	_____
2	2	1	2	1	_____	_____
2	2	1	1	3	_____	_____
2	2	1	2	1	_____	_____
2	2	1	2	4	_____	_____
2	1	2	1	1	_____	_____
2	1	1	1	4	_____	_____
2	1	1	2	3	_____	_____
2	2	1	1	2	_____	_____