

CONTENIDO

“USO DE ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA MANTENER LA INOCUIDAD DE VEGETALES MINIMAMENTE PROCESADOS”

Hector Gomez Gomez
Montevideo, Octubre 2015



- Introducción
- Microorganismos presentes en VMP
- Fuentes de Antimicrobianos Naturales y algunos resultados
- Consideraciones finales



El consumo de vegetales



Los vegetales frescos constituyen un componente importante de una dieta saludable (compuestos funcionales) y son una forma fácil de aumentar el consumo de productos frescos.



Vegetales Mínimamente Procesados (VMP)

Vegetales mínimamente procesados



La ausencia de tratamientos letales, pérdida de la resistencia natural y su alto contenido de agua y nutrientes, los vuelve susceptibles al ataque microbiano (de Oliveira et al., 2011).



Alimentos contaminados están relacionados con la muerte de cerca de 2 millones de personas al año, la mayoría niños (FAO, 2015).



Contaminación de los vegetales

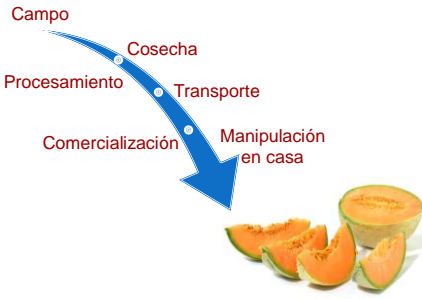


FOTO: CEBE - CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOSEGURIDAD S.L.



Foto: S. M. de la Cruz Interfaz (Honduras)



Microorganismos asociados a VMP



PATOGENOS	GENERO
Bacterias	
gram positivo	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
gram negativo	<i>Salmonella</i> sp. <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Vibrio cholerae</i>
Hongos	<i>Fusarium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i> <i>Penicillium</i>
Virus	Virus de la hepatitis A

(Francis et al., 1999; Gleason y O'Brien, 2005; Berger et al., 2010; Oliveira et al., 2011; van Boxtael et al., 2013; Snell et al., 2015)



Conservación de VMP



Necesitan un mínimo o ningún tratamiento adicional antes de su consumo, altamente inestables, son menos procesado y el tiempo de preservación es corto (Artes y Allende, 2005)

Conservantes químicos y antimicrobianos sintéticos

Algunos microorganismos han desarrollado resistencia;

Reacción con otros compuestos orgánicos, puede conducir a la formación de subproductos tóxicos;

Alimentos **naturales**, libres de productos artificiales y perjudiciales (Simões et al., 2009; Joshi et al., 2013; Calo et al., 2015).

Antimicrobianos Naturales



Antimicrobianos naturales



Variedad de fuentes naturales que poseen compuestos con potencial para ser utilizados como antimicrobianos (Gyawali y Ibrahim, 2014).



Plantas
Animales
Bacterias
Algas
Hongos



Antimicrobianos de origen vegetal



Derivados de plantas y hierbas aromáticas y/o especiarias (Fitoquímicos)

Aceites Esenciales (AE)

Monoterpenos
Sesquiterpenos
Fenilpropanoides
(Naturaleza poco soluble)
(Marques, 2015)



Otros Metabolitos Secundarios

Compuestos polifenólicos,
Ácidos fenólicos,
Quinonas, Saponinas, Taninos,
Cumarinas, Alcaloides
(Propiedades funcionales)
(Brenes y Roura, 2010; Ciocan y Băra, 2007).



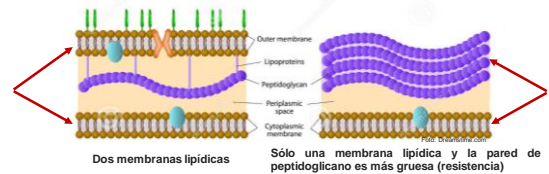
Acción de los antimicrobianos de origen vegetal



Se debe a daños en la membrana celular, afectada por los compuestos fenólicos y a la capacidad de AE para penetrar las membranas bacterianas (interactúan con la membrana lipídica) y entran al interior de la célula e inhiben su funcionalidad (Calo et al., 2015).

GRAM-NEGATIVE

GRAM-POSITIVE



Dos membranas lipídicas

Sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglucano es más gruesa (resistencia)



Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce

Lorenzo Siroli^a, Francesca Patrignani^{a,c}, Diana I. Serrazanetti^b, Silvia Tappi^a, Pietro Rocculi^{a,b}, Fausto Gardini^{a,b}, Rosalba Lanciotti^{a,b}

^aDepartment of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Campus of Food Science, Piazza Godanich 46, 47521 Cesena, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 September 2014
Received in revised form 14 January 2015
Accepted 28 February 2015

Keywords:
Lamb's lettuce
Minimally processed vegetables
Natural antimicrobials
Shelf life

ABSTRACT

Plant essential oils (EOs) and their components, generally recognized as safe and endowed with a wide antimicrobial activity, have been investigated in this paper as natural sanitizer alternatives to chlorine to control spoilage bacteria and naturally occurring pathogens associated with minimally processed vegetables. From this perspective, the efficacy of oregano and thyme EOs and carvacrol was evaluated in comparison with chlorine for lamb's lettuce decontamination. Their effects were evaluated on mesophilic aerobic bacteria, yeasts, LAB, color parameters and volatile molecule profiles demonstrating the same efficacy of chlorine. A further optimization of the process highlighted that thyme and oregano EOs controlled minimally processed lamb's lettuce spoilage microflora without negatively affecting the quality and sensory properties of the products. These results demonstrate the potential of washing treatments based on natural antimicrobials, as alternatives to chlorine for the sanitization of minimally processed vegetables.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



Antimicrobianos de origen vegetal



Oregano: *Origanum vulgare* (250 mg L⁻¹)
Tomillo: *Thymus vulgaris* (250 mg L⁻¹)
Cloro (120 mg L⁻¹)

Canónigo MP
(*Valerianella locusta*)

Bact. mesófilas aeróbicas,
Bact. ácido lácticas,
Levaduras
Color

- No se observaron diferencias significativas en bacterias aerobias mesófilas.
- Levaduras y bacterias lácticas se mantuvieron inferiores a 3,0 log UFC g⁻¹, durante 8 días de almacenamiento a 6 °C, y a 14 días de almacenamiento osciló entre 2 y 3 log UFC g⁻¹, independiente del antimicrobiano.
- Ningún tratamiento afectó negativamente las propiedades sensoriales.

Food Control 46 (2014) 403–411



Antimicrobianos de origen vegetal



Oliveira *et al.* (2015),

1. Combinación de **carvacrol** y **1,8-cineol** (presentes en AE de oregano y romero)
2. Control (agua destilada estéril)

Listeria monocytogenes,
Aeromonas hydrophila,
Pseudomonas fluorescens,
(presentes en hortalizas frescas)

- Concentración mínima inhibitoria fue de 1,25 µL mL⁻¹ y 40 µL mL⁻¹ de carvacrol y 1,8-cineol respectivamente.
- La aplicación redujo células viables de todas las cepas probadas e inoculadas experimentalmente.
- Variación de células viables después de 24h de aplicación fue desde 4,1 hasta 5,3 log UFC g⁻¹, y el control fue entre 6,1 y 6,8 log UFC g⁻¹.
- Cambió la permeabilidad de la membrana y causó cambios estructurales en las superficies de las células bacterianas.

Food Control 47 (2015) 334–339



Antimicrobianos de origen vegetal



Ma *et al.* (2015),

Carotol, **sabineno** y **β-cariofileno** (presentes en AE de jugo de zanahoria) (disolución de sulfóxido de dimetil del AE, 4 mg mL⁻¹),

Bacterias gram positivas,
bacterias gram negativas,
hongos y levaduras

Presentó efecto sobre el diámetro de las zonas de inhibición

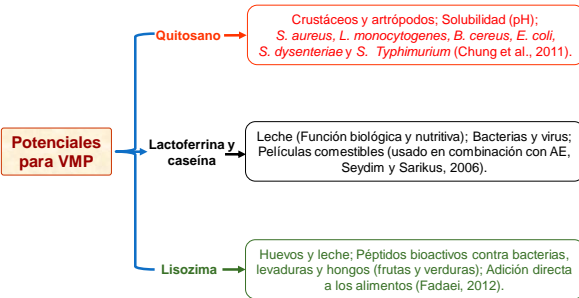
- Después de 24 horas de incubación a 37 °C para las bacterias.
- Después de 5 días de incubación a 28 °C para *Aspergillus niger*.
- Después de 24 horas de incubación a 25 °C para las levaduras.

- Gran potencial para ser aplicado como un agente antimicrobiano natural en VMP.

Food Chemistry 170 (2015) 334–400



Antimicrobianos de origen animal



Acción de antimicrobianos de origen animal



- **Quitosano:** Interacción entre las moléculas con carga positiva del quitosano y las membranas celulares microbianas cargadas negativamente, conduce a la fuga de componentes intracelulares.
- La unión de quitosano al ADN, inhibe la síntesis de RNAm a través de la penetración a los núcleos microbianos por quitosano e interfiriendo con la síntesis de ARNm y proteínas en las bacterias (Chung et al., 2011).
- **Lactoferrina:** Inhibe la unión de los microorganismos con el hierro, haciendo que no esté disponible para el desarrollo microbiano (Valencia-Chamorro et al., 2011).



Food Microbiology 21 (2004) 703–714

FOOD MICROBIOLOGY
www.elsevier.com/locate/jfoodmic

Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables

F. Devlieghere*, A. Vermeulen, J. Debevere

Laboratory of Food Microbiology and Preservation, Department of Food Technology and Nutrition, Ghent University, Coupure links 653, Ghent 9000, Belgium

Received 3 September 2003; accepted 19 February 2004

Abstract

Chitosan has recently gained more interest due to its applications in food and pharmaceuticals. Among others, the antimicrobial activity of chitosan has been pointed out as one of its most interesting properties of chitosan. The aim of this study was twofold: (1) the quantification of the antimicrobial effect of chitosan with a deacetylation degree of 94% and a molecular weight of 43 kDa on different psychrotrophic spoilage organisms and food pathogens; (2) The determination of the influence of different food components (starch, whey protein, NaCl and oil) on the antimicrobial effect of chitosan and (3) the investigation of the effects of chitosan coating on controlling decay of minimally processed fruits and vegetables (strawberry and lettuce). For the first aim several bacteria and yeast were exposed to chitosan concentrations varying from 40 to 750 mg/l. Generally, Gram-negative bacteria seemed to be very sensitive for the applied chitosan (MIC: $0.0005\% \text{ (w/v)}$) while the sensitivity of Gram-positive bacteria was highly variable and that of yeast was intermediary (0.01% (w/v)). To achieve the second aim, the media, with one of these components added, were inoculated with *Candida lambica* ($\pm 2 \log \text{ cfu/ml}$) and were incubated at 7 °C until the yeast reached the stationary phase. Starch, whey protein and NaCl had a negative effect on the antimicrobial activity. Oil conversely had no influence. For the third aim, the chitosan coating was formed by dipping the products in a chitosan-lactic acid/Na-lactate solution from which the pH was adjusted to the pH of the products. These products were equilibrated modified atmosphere (EMA)-packaged, stored at 7 °C and during storage sensitivity and microbiologically evaluated. A chitosan coating on strawberries was applicable while on mixed lettuce the chitosan coating was not applicable due to the development of a bitter taste. The microbiological load on the chitosan-dipped samples was lower for both products. The antimicrobial effect of chitosan on lettuce disappeared after 4 days of storage, while it maintained on the strawberries during 12 days.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Antimicrobianos de origen animal



Recubrimiento por inmersión de quitosano, al 2% (v/v) en solución de ácido láctico/lactato de sodio

Descomposición de fresas y lechugas MP bajo atmosferas modificadas en equilibrio

- 12 días después, el total psicrótrofos aeróbicos en las fresas fue de 3,48 UFC mL⁻¹, resultados menores que muestras no tratadas (5,35 UFC mL⁻¹).
- Levaduras 3,01 UFC mL⁻¹ también menos que 5,11 UFC mL⁻¹ sin tratar, además, el tratamiento resultó factible sensorialmente en las fresas.
- En lechuga modificó las características sensoriales al desarrollar un sabor amargo.

Food Microbiology 21 (2004) 703–714



Antimicrobianos de origen bacteriano



Bacterias ácido lácticas producen una amplia gama de derivados químicos con actividad antimicrobiana
Son compuestos proteínicos, llamados bacteriocinas

- Por *Lactococcus lactis*,
- Aprobado en mas de 50 países;
- Inhibe bact. gram positivas;
- Permeado de la membrana;
- gram negativas, (resistencia), presencia de una membrana protectora exterior que forma la capa más externa de la membrana celular (ayudada por AE).
- Por *Lactobacillus reuteri* a partir del glicerol
- Contra patógenos y de deterioro en VMP;
- Alta solubilidad en agua,
- Resistencia al calor y a enzimas proteolíticas y lipolíticas;
- Estabilidad en un amplio pH;
- Inhibe bact. gram negativa (grupo aldehído modifica estructura de las bacterias)

Nisina

Reuterina



Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya* L.)

K. Narsaiah^{a,*}, Robin A. Wilson^b, K. Gokul^c, H.M. Mandge^d, S.N. Jha^e, Sheetal Bhadwal^a, Rahul K. Anurag^a, R.K. Malik^a, S. Vuj^f

^aGeneral Institute of Post-harvest Engineering and Technology (GIPET), India
^bPost-harvest Quality Research Institute, India
^cCollege of Agricultural Engineering, ANGIKAT, Raipur, AT, India

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 10 February 2014
 Received in revised form 20 September 2014
 Accepted 2 October 2014
 Available online 25 October 2014

Keywords:
 Minimal processing
 Physico-chemical quality
 Microbial quality
 Respiration rate
 Ripening

ABSTRACT

Alginate coatings can act as carriers of antimicrobials to prolong the shelf stability of minimally processed fruit. Different concentrations of alginate (1.0, 1.5, 2.0% w/v) incorporated with bacteriocins (0, 20% v/v) as a coating material of minimally processed papaya were evaluated for quality parameters viz. firmness, weight loss, colour, total mass gas composition, acidity, total soluble solids and microbial load for a period of 21 days. After 21 days of incubation, coated and uncoated samples showed decreases in O₂ levels and acidity percentage which were 1.8 and 2.7 times more in uncoated as compared to the coated samples, respectively. The level of CO₂ increase was 1.7 times higher in uncoated samples as compared to the coated samples. High respiration rate in uncoated samples led to increases in TSS values, firmness and weight loss. On the other hand, the alginate coating (with or without bacteriocin) acted as a barrier to water vapour transmission and gas exchange, which hindered changes in TSS values, firmness and weight loss in coated samples, which were 3.8, 8.7 and 7.4 times less than for the uncoated samples, respectively. Decreases in 'a' and increases in 'b' values were more pronounced in the case of control and became less prominent with the alginate coating. A decrease in 'V' values and concomitant increase in 'W' values was due to the change from yellow to red colour, indicating ripening of papaya. Microbial counts by the end of the storage period in the alginate coated sample incorporating bacteriocin were 10³ CFU/g as compared to 10⁷ CFU/g in the case of the control. Alginate (2% w/v) with bacteriocin could be used to store minimally processed papaya for 3 weeks without compromising physico-chemical qualities or microbial safety.



Antimicrobianos de origen bacteriano



Concentraciones de alginato incorporado con bacteriocina, como material de recubrimiento en *Carica papaya* L. MP



Firmeza, pérdida de peso, color, composición gaseosa, acidez, sólidos solubles totales y la carga microbiana por un período de 21 días.

- Al final del almacenamiento, un recuento microbiano total de 10³ UFC g⁻¹ en las muestras con solución de alginato (2% w/v) adicionada de bacteriocina (60.000 UI/mL) a razón de 20% (v/v);
- EL control (cloro al 0,005%), presentó 10⁷ UFC g⁻¹; partiendo ambos tratamientos de 1.6 x 10³ UFC g⁻¹.
- El alginato con bacteriocina en papaya MP durante 3 semanas no comprometió las cualidades físico-química o de seguridad microbiana.

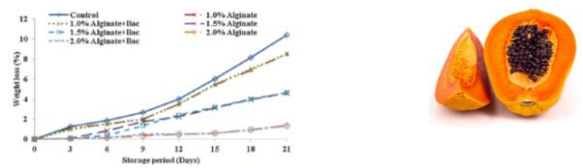


Fig. 4. Effect of concentrations of alginate coatings on weight loss alginate coating, 1.0%, 1.5% and 2.0% alginate coating without bac and 2.0% alginate coating with bacteriocin.

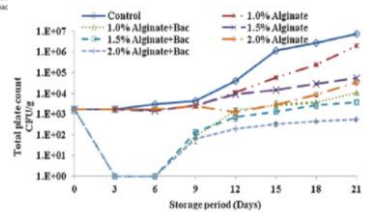


Fig. 8. Effect of concentrations of alginate coatings on total plate count. Control without alginate coating, 1.0%, 1.5% and 2.0% alginate coating without bacteriocin, 1.0%, 1.5% and 2.0% alginate coating with bacteriocin.



Antimicrobianos de origen de algas y hongos



Algas: *Phaeophyceae* sp., *Chlorophyceae* sp., y *Rhodophyceae* sp.) y micro algas *Scenedesmus obliquus*, contra gram positivas y gram negativas;

- Terpenoides, florotaninos, compuestos fenólicos, esteroides, cetonas, alcanos y ácidos grasos (**acción similar AE**) (Watson y Cruz-Rivera, 2003).
- Daño a la membrana y compuestos fenólicos y metabolitos bioactivos ejercen impacto en la germinación de esporas (Catarina *et al.*, 2011).

Hongos: *Basidiomycetous*, *Agaricus* spp, *Lactarius deliciosus*, *Sarcodon imbricatus* y *Tricholoma portentosum*), contra bacterias en alimentos.

- Metabolitos bioactivos secundarios, compuestos volátiles, algunos fenoles, ácido gálico, ácidos grasos libres y sus derivados (Bala *et al.*, 2012).
- Las setas que producen estos componentes bioactivos podrían soportar aplicaciones en la industria de los VMP.



Consideraciones finales



- Uso es bastante limitado.
- Investigaciones son limitadas y escasas.
- Existen muchas fuentes inexploradas en la naturaleza.
- Conocer sus propiedades físicas y químicas, componentes, mecanismo de acción, eficacia, efectos sinérgicos o antagónicos con el alimento o en el uso con otros antimicrobianos, concentraciones óptimas de uso.
- Evitar provocar efectos secundarios indeseables, como cambios en la estructura del vegetal y la calidad sensorial (actualmente es un inconveniente).



Tercera reunión Red Temática



TÉCNICAS SANITIZANTES EMERGENTES Y RIESGO MICROBIOLÓGICO

GRACIAS POR SU ATENCIÓN!!!



Hector Gomez Gomez
ghectoralonzo@ug.uchile.cl