

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	NUMERO DE RADICACIÓN		
		FECHA DE PRESENTACIÓN		
<input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad				
4	(71) SEGUNDO SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. UNIVERSIDAD DE LA SABANA			2. 860075558	NIT
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2 COLOMBIA		CUNDINAMARCA	CHIA	CAMPUS DEL PUENTE COMUN KM. 7, AUTOPISTA NORTE DE BOGOTA. CHIA CUNDINAMARCA.
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2 6364240			ccaro@pons.com.co	COLOMBIA

**SISTEMA LIPÍDICO CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS PARA APLICACIONES ALIMENTARIAS Y NO ALIMENTARIAS**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere a una composición antimicrobiana para su uso tanto en la industria de alimentos como en industrias donde se necesite hacer control de bacterias patógenas, que comprende una fase oleica que a su vez comprende un aceite vegetal, un ácido graso y palmitato de sacarosa, una fase acuosa que comprende lactato sódico o potásico.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15

La presencia de microorganismos de naturaleza Gram (+), psicotrófica y anaeróbica tales como la *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) en alimentos ha causado preocupación en todo el mundo en términos de salud y economía debido su capacidad para crecer en un rango de pH de 5 a 9,6 y en concentraciones de sal superiores al 10% (Pagadala et al. 2012). *L. monocytogenes* causa listeriosis, una enfermedad con una alta tasa de mortalidad (Apostolidis et al., 2008). De acuerdo con Crim et al. (2014), en el año 2013, la incidencia de esta enfermedad en los Estados Unidos fue de 26 casos por cada 10,000,000 población; en el mismo año, se presentaron 123 casos, de los cuales 112 resultaron en la hospitalización (91%) y 24 han sido mortales (19,5%). Adicionalmente Allen et al (2016) han descrito que *Listeria monocytogenes* presenta transferencia horizontal de genes, lo que impacta en la adquisición de nueva información genética que influyen la resistencia de este microorganismo a las tecnologías de procesamiento en alimentos, por lo que se hace interesante evaluar los mecanismos de acción y respuesta bacteriana frente a la propuesta de nuevas tecnologías para el control microbiano.

20

25

30

35

Los nitritos y nitratos son empleados en la mayoría de productos cárnicos, para el control microbiano, con énfasis en *Clostridium botulinum* y sus neurotoxinas; y por su efecto antioxidante y para el desarrollo de características sensoriales de color, aroma y sabor. Sin embargo, los nitritos no presentan alto efecto antimicrobiano sobre *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; cuyo control es relevante a nivel industrial. Estadísticas presentadas por Crim et al. (2014), muestran que los microorganismos de mayor incidencia, número de hospitalizaciones y muertes a nivel mundial son *Campylobacter* sp., *Listeria* sp., *Salmonella* sp. y serotipos de *E. coli* O157- y no O157.

40

En la última década, se ha presentado un crecimiento vertiginoso hacia el consumo de productos saludables, como indica Weiss (2010) alimentos naturales y orgánicos; sin o con bajos niveles de aditivos químicos, antibióticos, pesticidas y hormonas. Los consumidores pagan entre el 10 a 40% más por productos orgánicos sin adición de nitrito y/o nitrato de sodio o de potasio, y en productos cárnicos este precio aumenta hasta el

200%. Debido a esta creciente demanda, la industria busca nuevos ingredientes y procesos, los cuales pueden contribuir a cambiar la imagen negativa de algunos productos cárnicos, cuyo consumo ha sido relacionado con el aumento de cáncer, riesgos cardiovasculares e hipertensión arterial.

5

Por tanto, sería deseable disponer de una composición con efecto antimicrobiano que evitase la adición de nitritos.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

10

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- i) una fase oleica que comprende al menos un aceite vegetal, al menos un ácido graso y un éster de sacarosa como palmitato de sacarosa; y
- 15 ii) una fase acuosa que comprende lactato sódico o lactato potásico.

20

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD.

25

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico.

30

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde el ácido graso está en forma de sal sódica o potásica.

35

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

40

y el ácido graso es un ácido graso de cadena media, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico o una sal de cualquiera de ellos, más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, y aún más preferiblemente en forma libre, como monoglicérido o una sal se selecciona de sal sódica o sal potásica.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:

5

el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

y la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal.

10

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:

el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

15

el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico; y

20

la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde la fase acuosa corresponde a entre el 10% y el 30% de una emulsión de agua en aceite (W/O) o al 50% de una emulsión de aceite en agua (OW).

25

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

30

el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;

35

la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal; y

la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente

40

emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en una concentración de entre 0,2% y 0,9%.

5 En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:  
el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;  
el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de  
10 ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico; y  
que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en  
15 una concentración de entre 0,2% y 0,9%.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:  
el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente  
20 aceite de palma RBD;  
el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido  
25 graso se selecciona de ácido cáprico;  
la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;  
la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total; y  
que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en  
30 una concentración de entre 0,2% y 0,9%.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se selecciona de tomillo.

35 En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente donde:  
el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;  
40 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de

ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico; y  
 que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se  
 5 selecciona de tomillo.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:  
 el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite  
 de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente  
 10 aceite de palma RBD;  
 la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal; y  
 que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se  
 selecciona de tomillo.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:  
 el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite  
 de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente  
 15 aceite de palma RBD;  
 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o  
 una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de  
 20 ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como  
 monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido  
 graso se selecciona de ácido cáprico;  
 la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal; y  
 25 que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se  
 selecciona de tomillo..

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:  
 el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite  
 de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente  
 30 aceite de palma RBD;  
 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o  
 una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de  
 ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como  
 35 monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido  
 graso se selecciona de ácido cáprico;  
 la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;  
 la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total;  
 que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se  
 40 selecciona de tomillo.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:  
el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite  
de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente  
aceite de palma RBD;

5 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o  
una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de  
ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como  
monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido  
graso se selecciona de ácido cáprico;

10 que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente  
emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en  
una concentración de entre 0,2% y 0,9%; y  
que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se  
selecciona de tomillo.

15

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:  
el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite  
de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente  
aceite de palma RBD;

20 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o  
una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de  
ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como  
monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido  
graso se selecciona de ácido cáprico;

25 la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;  
la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total;  
que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente  
emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en  
una concentración de entre 0,2% y 0,9%; y

30 que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se  
selecciona de tomillo.

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, que  
además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -  
35 tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración  
del 0,1%.

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde:  
el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite  
40 de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente  
aceite de palma RBD;

- el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico; y
- 5 que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%.
- 10 En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;
- 15 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;
- 20 que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se selecciona de tomillo; y
- que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%.
- 25 En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;
- 30 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;
- 35 la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;
- la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total; y
- que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%.
- 40 En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde:

el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

5 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;

la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;

10 la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total; que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%; y que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se

15 selecciona de tomillo.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente

20 aceite de palma RBD;

el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido

25 graso se selecciona de ácido cáprico;

que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en una concentración de entre 0,2% y 0,9%; y que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es

30  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente

35 aceite de palma RBD;

el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido

40 graso se selecciona de ácido cáprico;

que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en una concentración de entre 0,2% y 0,9%;

5 que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%; y

que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se selecciona de tomillo.

10 En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

15 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;

la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;

20 la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total;

que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en una concentración de entre 0,2% y 0,9%; y

25 que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%.

En otra realización la invención se refiere a la composición definida anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

30 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;

35 la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;

la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total;

40 que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en una concentración de entre 0,2% y 0,9%;

que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%; y

5

que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se selecciona de tomillo.

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde la concentración de lactato sódico es de entre el 1% y el 2%.

10

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde la concentración del ácido graso es de entre 7 ppm y 500 ppm.

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde la concentración de palmitato de sacarosa es de entre 55 ppm y 300 ppm.

15

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde: la concentración de lactato sódico es de entre el 1% y el 2%; la concentración del ácido graso es de entre 7 ppm y 500 ppm; y la concentración de palmitato de sacarosa es de entre 55 ppm y 300 ppm.

20

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde: que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se selecciona de tomillo;

la concentración de lactato sódico es de entre el 1% y el 2%;

25

la concentración del ácido graso es de entre 7 ppm y 500 ppm; y

la concentración de palmitato de sacarosa es de entre 55 ppm y 300 ppm.

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;

30

el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;

35

la concentración de lactato sódico es de entre el 1% y el 2%;

la concentración del ácido graso es de entre 7 ppm y 500 ppm; y

la concentración de palmitato de sacarosa es de entre 55 ppm y 300 ppm.

40

En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde:

15  
15

- el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;
- 5 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;
- 10 que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se selecciona de tomillo;
- la concentración de lactato sódico es de entre el 1% y el 2%;
- la concentración del ácido graso es de entre 7 ppm y 500 ppm; y
- la concentración de palmitato de sacarosa es de entre 55 ppm y 300 ppm.
- 15 En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;
- 20 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;
- 25 la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;
- la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total;
- que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en una concentración de entre 0,2% y 0,9%;
- 30 que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una concentración del 0,1%.
- la concentración de lactato sódico es de entre el 1% y el 2%;
- la concentración del ácido graso es de entre 7 ppm y 500 ppm; y
- la concentración de palmitato de sacarosa es de entre 55 ppm y 300 ppm.
- 35 En otra realización la invención se refiere a la composición descrita anteriormente, donde: el aceite vegetal se selecciona de aceite de palma, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de canola y aceite de girasol, preferiblemente aceite de palma, y más preferiblemente aceite de palma RBD;
- 40 el ácido graso es un ácido graso de cadena media en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de

- ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico como ácido graso en forma libre, como monoglicérido o una sal de cualquiera de ellos, y más preferiblemente donde el ácido graso se selecciona de ácido cáprico;
- la fase oleosa está vehiculizada en el aceite vegetal;
- 5 la fase acuosa corresponde al 30% de la composición total;
- que además comprende un agente emulsificante, preferiblemente donde el agente emulsificante es Tween 20, y más preferiblemente donde el agente emulsificante está en una concentración de entre 0,2% y 0,9%;
- que además comprende un antioxidante, preferiblemente donde el agente antioxidante es  $\alpha$ -tocoferol; y más preferiblemente donde el agente antioxidante está en una
- 10 concentración del 0,1%.
- que además comprende un aceite esencial, preferiblemente donde el aceite esencial se selecciona de tomillo;
- la concentración de lactato sódico es de entre el 1% y el 2%;
- 15 la concentración del ácido graso es de entre 7 ppm y 500 ppm; y
- la concentración de palmitato de sacarosa es de entre 55 ppm y 300 ppm.

Otro aspecto de la invención es un aditivo que comprende la composición tal y como se ha definido anteriormente, y preferiblemente donde el aditivo se encuentra en estado

20 líquido o sólido.

En otra realización la invención se refiere al aditivo tal y como se ha definido anteriormente, para la conservación de alimentos que presenten un contenido mínimo de 5% de grasa, con o sin presencia de proteínas.

25

En otra realización la invención se refiere al aditivo tal y como se ha definido anteriormente, para el control de patógenos en artículos relacionados con la industria alimentaria.

30 En otra realización la invención se refiere al aditivo tal y como se ha definido anteriormente, en forma de emulsiones agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W).

A lo largo de la presente invención, el término "ácido graso de cadena media" se refiere ácido graso libre o monoglicérido de cadena media, TCM son ésteres de ácidos grasos de

35 cadena media (entre 6 y 12 átomos de carbono) y glicerol (1,2,3-propanotriol). Los TCM se difunden pasivamente del tracto gastrointestinal al sistema porta (Los ácidos grasos de cadena larga se absorben en el sistema linfático) sin requerir ningún tipo de transformación como ocurre con los ácidos grasos de cadena larga o los ácidos grasos de cadena muy larga. Además, los TCM no requieren el uso de sales biliares para su

40 digestión. Los pacientes que tienen desnutrición o síndrome de malabsorción se suelen tratar con ácidos grasos de cadena media porque éstos no requieren energía para ser

absorbidos, almacenados o utilización. Algunas de las fuentes de TCM son el aceite de palma, de coco y las nueces del alcanforero. Los ácidos grasos que podemos encontrar en los TCM son el caprílico, el cáprico y el caproico.

- 5 El término "antimicrobiano" es una sustancia que elimina microorganismos o inhibe su crecimiento, tales como bacterias, hongos o parásitos. Basado en ello, los siguientes pueden referirse a agentes antibacterianos (antibióticos).

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1** Muestra la actividad ATPasa de *L. monocytogenes*. Agua destilada con tween 20 al 0.5% v/v (B), 200 ppm de NaNO<sub>2</sub> (N), 2% v/v lactato de sodio (L), 100 ppm de ácido cáprico con 1.5% v/v lactato de sodio (C1+), 200 ppm de ácido cáprico (C2), 100 ppm de aceite esencial de tomillo (T1), 100 ppm de palmitato de sacarosa con 2% v/v lactato de sodio (P1+), 200 ppm de palmitato de sacarosa (P2).

**FIGs. 2a y 2b** Muestran la relación de dinámica de crecimiento de *L. monocytogenes* a 30°C (a) y 8°C (b). En producto cárnico tipo salchicha (-) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (-■-), 1.5% de lactato de sodio (-●-), 100 ppm de A. E. de tomillo (-●-), 200 ppm de ácido cáprico (-▲-), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (--▲--), 200 ppm de palmitato de sacarosa (-●-) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de lactato de sodio (--●--).

**FIGs. 3a y 3b** Muestran la relación de dinámica de crecimiento de *E. coli* a 30°C (a) y 8°C (b). En producto cárnico tipo salchicha (-) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (-■-), 1.5% de lactato de sodio (-●-), 100 ppm de A. E. de tomillo (-●-), 200 ppm de ácido cáprico (-▲-), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (--▲--), 200 ppm de palmitato de sacarosa (-●-) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de lactato de sodio (--●--).

**FIGs. 4a y 4b** Muestran la relación de dinámica de crecimiento de *S. aureus* a 30°C (a) y 8°C (b). En producto cárnico tipo salchicha (-) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (-■-), 1.5% de lactato de sodio (-●-), 100 ppm de A. E. de tomillo (-●-), 200 ppm de ácido cáprico (-▲-), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (--▲--), 200 ppm de palmitato de sacarosa (-●-) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de lactato de sodio (--●--).

**FIGs. 5a y 5b** Muestran la relación de dinámica de crecimiento de *S. enteritidis* a 30°C (a) y 8°C (b). En producto cárnico tipo salchicha (-) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (-■-), 1.5% de lactato de sodio (-●-), 100 ppm de A. E. de tomillo (-●-), 200 ppm de ácido cáprico (-▲-), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (--▲--), 200 ppm de palmitato de sacarosa (-●-) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de lactato de sodio (--●--).

**FIGs. 6a y 6b** Muestran la relación de dinámica de crecimiento de *C. sporogenes* a 30°C (a) y 8°C (b). En producto cárnico tipo salchicha (-) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (-■-), 1.5% de lactato de sodio (-●-), 100 ppm de A. E. de tomillo (-●-), 200 ppm de ácido cáprico (-▲-), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (--▲--), 200 ppm de palmitato de sacarosa (-●-) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de lactato de sodio (--●--).

5 **FIGs. 7a y 7b** Muestran la relación de dinámica de crecimiento de facultativos mesófilos psicrotolerantes a 30°C (a) y 8°C (b). En producto cárnico tipo salchicha (-) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (-■-), 1.5% de lactato de sodio (-●-), 100 ppm de A. E. de tomillo (-●-), 200 ppm de ácido cáprico (-▲-), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (--▲--), 200 ppm de palmitato de sacarosa (-●-) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de lactato de sodio (--●--).

10 **FIGs. 8a y 8b** Muestran los cambios en color sobre *L\** sobre exterior (a) e interior (b). En producto cárnico tipo salchicha (●) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (■), 1.5% lactato de sodio (▲), 100 ppm de A.E. de tomillo (●), 200 ppm de ácido cáprico (□), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% lactato de sodio (■), 200 ppm de palmitato de sacarosa (Δ) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% lactato de sodio (▲).

15 **FIGs. 9a y 9b** Muestran los cambios en color sobre *a\** sobre exterior (a) e interior (b). En producto cárnico tipo salchicha (●) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (■), 1.5% lactato de sodio (▲), 100 ppm de A.E. de tomillo (●), 200 ppm de ácido cáprico (□), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% lactato de sodio (■), 200 ppm de palmitato de sacarosa (Δ) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% lactato de sodio (▲).

20 **FIGs. 10a y 10b** Muestran los cambios en color sobre *b\** sobre exterior (a) e interior (b). En producto cárnico tipo salchicha (●) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (■), 1.5% lactato de sodio (▲), 100 ppm de A.E. de tomillo (●), 200 ppm de ácido cáprico (□), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% lactato de sodio (■), 200 ppm de palmitato de sacarosa (Δ) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% lactato de sodio (▲).

25 **FIGs. 11a y 11b** Muestran los cambios en el contenido de TBARS de salchichas almacenadas a 8°C (a) y a 30°C (b). En producto cárnico tipo salchicha (-) y con adición de: 200 ppm NaNO<sub>2</sub> (-■-), 1.5% de lactato de sodio (-●-), 100 ppm de A. E. de tomillo (-●-), 200 ppm de ácido cáprico (-▲-), 100 ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (--▲--), 200 ppm de palmitato de sacarosa (-●-) y 100 ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de lactato de sodio (--●--).

35

40

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

5

### Materiales y métodos

#### **Evaluación de daño en membrana por microscopia de fluorescencia**

10 El análisis de daño en membrana se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Unal *et al.* (Spectrofluorimetric assessment of bacterial cell membrane damage by pulsed electric field, 2015), se adicionó 0.1% v/v de un cultivo celular de *L. innocua* y *C. sporogenes* en media fase exponencial, en soluciones de 100 ppm de aceite esencial de tomillo (T1), ácido cáprico a 100 ppm en combinación con 1.5% de lactato de sodio (C1+), palmitato de sacarosa a 100 ppm en combinación con 1.5% de lactato de sodio (P1+), 1.5% de lactato de sodio (L), 200 ppm de NaNO<sub>2</sub> (N) preparadas en agua peptona al 0.1% m/m y Tween 20 al 0.5% m/m. Se tomó como control negativo agua peptona al 0.1% m/m y Tween 20 al 0.5% m/m y como control positivo 1ml de cultivo celular con 20 ml de una solución de etanol al 70%. Se incubó cada tratamiento a 37°C por 2 horas.

20

Posteriormente, se centrifugó cada tratamiento 10,000 x g a 4°C por 15 min, los extractos se re suspendieron en agua peptona al 0.1% m/m dos veces. Posteriormente se mezclaron 1ml de extracto celular re suspendido con 1.5µl de yoduro de propidio (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) al 20mM en dimetil sulfóxido anhídrido (DMSO) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) y 1.5µl de SYTO 9 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) a 3.34 mM en DMSO (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Se incubó en oscuridad a 25°C por 15 min.

25

Cada una de los tratamientos se realizó por duplicado completamente independiente a partir de cultivos celulares diferentes. De cada tratamiento por cada duplicado fueron tomadas dos muestras de 20µl cada una en lámina de vidrio para microscopia. Se evaluaron cinco campos ópticos por cada lámina. Se obtuvieron imágenes digitales adquiridas con el microscopio de fluorescencia. Cada replica se observó por duplicado en cinco campos en el microscopio de fluorescencia (Olympus U-RFL-T, Millville, NY) por dos filtros (excitación 485"15 nm, emisión 505"15 nm) y (excitación 585"15 nm, emisión 625"15 nm).

35

Las imágenes digitales fueron analizadas con el software ImageJ 1.5 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Se transpusieron las imágenes obtenidas con cada filtro y se ajustó el fondo negro para cada imagen. Fueron analizados los histogramas de cada imagen en escala RGB a través del promedio en color rojo y verde. Posteriormente

40

fueron comparadas las relaciones para cada tratamiento entre rojo y verde asociado con las células dañadas/células viables.

### **Análisis estadístico**

5

Se comparó la actividad ATPasa para cada tratamiento mediante F- test, asumiendo el enfoque de prueba planeada cuantitativa por contrastes ortogonales ( $P < 0.05$ ) y por prueba de Tukey. Se empleó el software estadístico SAS 9.2 (32) (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

10

### **Elaboración e inoculación de prototipos tipo salchicha**

15

Fueron recibidos y acondicionados lomo de res, pierna y grasa dorsal de cerdo de un mercado local de Bogotá. Se procedió a colocar las materias primas cárnicas y grasa dorsal por un periodo de almacenamiento en refrigeración de 24 horas a 4°C en cámara con aire forzado. Se realizó un proceso de molienda con diámetro de partícula de 5 mm. Fueron elaborados diferentes lotes de salchicha por cada tratamiento bajo la formulación: lomo de res (40%), pierna de cerdo (19%), grasa dorsal (6%), hielo (21%), proteína aislada de soya (6%), almidón de papa (5%), sal (1%), fosfatos (0.3%), glutamato monosódico (0.3%) y aceite de palma RBD con sustancias antimicrobianas (3%). Se realizó el proceso de emulsión en *cutter* incorporando todos los ingredientes de la formulación con control de temperatura hasta 8°C durante 40 s. Se embutió la pasta cárnica emulsionada en tripa de celulosa de diámetro de 20mm. Fueron obtenidas unidades muestrales de  $10 \pm 0.5$  g de salchichas que fueron almacenadas por 12 h a 4°C.

25

Cada unidad muestral fue inyectada con aguja de insulina con inóculo en media fase exponencial de cada microorganismo patógeno, el cual fue previamente activado a 37°C por 12h en medio TSB (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España). Cada unidad experimental inoculada fue envasada al vacío en bolsas F.T. VACUUM POUCH 62,5µm (Plafilm®). Las muestras fueron sometidas a cocción por inmersión en agua a  $70 \pm 1$ °C, hasta  $60 \pm 0.1$ °C (El proceso de cocción fue realizado a 60°C con tiempo de mantenimiento por 1 min, debido a que el proceso térmico a 73°C por 1min de tiempo de mantenimiento *in vitro* generaba inactivación completa de 6 Log ufc/g de patógenos inoculados en el producto cárnico) en centro geométrico y mantenido por 1 min, seguido de enfriamiento por inmersión en agua- hielo hasta 10°C. Se consideró este punto como el tiempo 0 del experimento, se almacenaron las muestras para su seguimiento a 8 y 30°C.

30

35

Se elaboraron prototipos de los tratamientos vehiculizados en aceite de palma RBD: 100 ppm de aceite esencial de tomillo (T1), 100ppm de ácido cáprico + 1.5% de lactato de sodio (C1+), 200ppm de ácido cáprico (C2), 100ppm de palmitato de sacarosa + 1.5% de

40

lactato de sodio (P1+), 200ppm de palmitato de sacarosa (P2) y como controles: 200ppm de NaNO<sub>2</sub> (N), 1.5% lactato de sodio (L) y vehículo sin adición de antimicrobianos (B).

### 5 **Recuento de microorganismos patógenos en prototipos de producto cárnico tipo salchicha**

Para el análisis del crecimiento bacteriano de prototipos de salchichas, a partir de duplicados de unidades muestrales de 10±0.5 g, de producto almacenado a 30°C en los tiempos: 0, 2, 4, 6, 24 h y 3, 7 y 14 días; y a 8°C en los tiempos: 0, 6, 24 h y 3, 7, 14, 17, 10 21, 24 y 30 días. Únicamente para *L. monocytogenes* a 8°C se evaluaron también los tiempos 37 y 41 días debido a que este microorganismo es psicrófilo.

Cada unidad muestral fue homogenizada con 100 ml de agua peptonada al 0.1% (Merck, Darmstadt, Alemania) por 120 s con un Stomacher (BA7021, Serward, Inglaterra). Fueron 15 realizadas seis diluciones seriadas decimales con agua peptonada al 0.1% y siembra en profundidad, en placas de agar, por triplicado, incubadas a 37±1 °C por 48 h en condiciones anaerobias únicamente para *C. sporogenes*. Para *L. monocytogenes* fue sembrada en agar Palcam con suplemento específico (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España), *E. coli* en EMB (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España), *S. enteritidis* en Salmonella-Shiguella (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España), *S. aureus* en Baird 20 Parker con yema de huevo, telurito de potasio (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) y *C. sporogenes* en TSN (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España). Para microbiota total – aerobios mesófilos en muestras sin inocular en PCA (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España).

25

### **Cinética de color en prototipos tipo salchicha**

Se evaluó la parte interna y externa de nueve prototipos, con espesor de 15 mm con tres repeticiones correspondientes a lotes diferentes, para cada tiempo de almacenamiento a 30 8°C (0, 1, 2, 3, 7, 14, 17, 21, 30, 37 y 40 días). Se determinaron las coordenadas de color (CIE *L\*a\*b\** colour system 1976) y la reflectancia, en concordancia con los protocolos propuestos por AMSA [64], con espectro-colorímetro ColorquestXE (HunterLab, Alemania) (fuente de luz A, observación geométrica estándar a 10°/45°/0° a 1 pur de distancia, blanco estándar). Se midió la reflectancia entre 400 nm y 700 nm en intervalos 35 de 10nm, donde la concentración de las formas químicas de mioglobina fueron calculadas de acuerdo con los protocolos propuestos por Tang, Faustman, y Hoagland [65], los valores de reflectancia de (503, 557 y 582 nm) fueron calculados usando interpolación lineal, que representan metamioglobina (MMb), deoximioglobina (DMb) y oximioglobina (OMb) respectivamente.

40

### Determinación de oxidación lipídica por método TBARS

Fueron determinados malonaldehídos y otros aldehídos como productos indicadores de la oxidación lipídica en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBA). A través de la metodología propuesta por AMSA (American Meat Science Association. Meat Color Measurement Guidelines. Illinois, USA: 2012), debido a que corrige la interferencia por presencia de azúcares y nitritos-nitratos. Se tomaron 0.25 g de parte externa y 0.25 g de la parte interna de cada muestra de salchicha, se homogenizaron con 2.5 ml de solución al 0.375% de TBA, 15% ácido tricloroacético y 0.25 N HCl. Se calentó por 10 min en agua a 90°C, seguido de enfriamiento en agua-hielo por 10 min. Las soluciones fueron centrifugadas a 5.000 x g por 15 min a 4°C; el sobrenadante fue medido a 530 nm, con blanco preparado de acuerdo al procedimiento descrito, sin muestra cárnica. Se determinó el valor TBA expresado en (mg MDA/kg) en la siguiente ecuación:

$$TBARS = Abs_{530nm} \left( \frac{1M\ TBA\ Cromogeno}{156000} \right) \left( \frac{1mol}{L/M} \right) \left( \frac{0.003L}{0.5\ g\ muestra} \right) \left( \frac{72.07\ g\ MDA}{mol\ MDA} \right) (1000mg/g) (1000g/kg)$$

15

### Cinética de reducción de nitrito de sodio en prototipos tipo salchicha

Acorde con el protocolo método AOAC 973.31, con pequeñas modificaciones, 1±0.1 g de muestra, se homogenizaron con 50 ml de agua a 80°C en Stomacher durante 120s. Se calentará a 80°C durante 2h. Se filtró con papel filtro referencia 392 para retener partículas de 5 a 8µm (sartorius), y se aforó 60ml con agua destilada, se adicionó 0.5 ml de solución sulfanilamida, disolviendo 0.5g de sulfanilamida en 150ml de ácido acético al 15%(v/v), y posterior a 5 min en reposo, se adicionó 0.5 ml de N-(-1-naphthyl)etil enediamine (NED), previamente preparado disolviendo 0.2 g de NED en 150 ml de ácido acético al 15%(v/v). Se dejó en reposo por 15min hasta cambio a color rosa, se midió Abs540nm por triplicado.

25

### Análisis estadístico

Se compararon los parámetros de crecimiento microbiano (densidad poblacional final, µmax y λ), parámetros de perfil de color (L\*, a\*, b\* y ΔE) y mg MDA/kg muestra, para cada tratamiento mediante F- test, asumiendo el enfoque de prueba planeada cuantitativa por contrastes ortogonales (P<0.05) y por prueba de Scheffe y Tukey. Se empleó el software estadístico SAS 9.2 (32) (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

35

## Resultados y discusión

### **Evaluación de la inhibición de sustancias de naturaleza lipídica sobre la actividad ATPasa de *Listeria monocytogenes***

5

Se determinó la inhibición de la actividad ATPasa generada por la adición de sustancias de naturaleza lipídica con potencial antimicrobiano, a través de la cuantificación de la producción de fosfato inorgánico de *L. monocytogenes* en 30 min. La actividad ATPasa está relacionada con el control del pH intracelular a través de bombas de protones, Abee y Wouters (Int J Food Microbiol 1999;50:65–91), resaltan la correlación de las proteasas chaperonas con ATPasa y por tanto la resistencia bajo condiciones de estrés como la disminución de pH.

15

El uso de diferentes aditivos alimentarios afecta una porción de la población, donde los microorganismos supervivientes pueden crecer bajo condiciones de procesamiento de la industria de alimentos. Simpson *et al.* (Int J Food Microbiol 1999;48:1–10) resaltan la importancia de la ATPasa, por su posición en la membrana, la producción de ATP y la regulación del pH interno; la inactivación de esta enzima puede generar inhabilidad en la bacteria para exportar protones y acidificación del citoplasma. Por otro lado, es relevante evaluar la inhibición de la ATPasa, debido a que está relacionada con la resistencia de *L. monocytogenes* a condiciones de estrés, como pH ácidos, altas temperaturas, presiones osmóticas y altas concentraciones de alcohol. La actividad ATPasa, está íntimamente relacionada con mantener la homeostasis intracelular empleando el transporte de protones a través de la membrana, el control del pH intracelular a través de bombas de protones y la expresión de proteasas chaperonas (Int J Food Microbiol 2007;113:1–15 ; y Int J Food Microbiol 1999;50:65–91).

25

Los resultados indicaron que los tratamientos con 200 ppm de NaNO<sub>2</sub>, C1+, C2 y P1+ no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.01$ ) con el tratamiento blanco (agua estéril con 0.5% tween 20). La inhibición de la actividad ATPasa sobre *L. monocytogenes* por adición de 1.5% de lactato de sodio fue la mayor 44.1%, en los tratamientos P2 fue 19.7% y para T1 fue 19% (Figura 1). Apostolidis *et al.* (Folia Microbiol (Praha) 2003;48:731–5), indican que el lactato puede generar hiperacidificación vía donación de protones, lo cual rompe el complejo H<sup>+</sup>-ATPasa requerido para la síntesis de ATP; los monoterpenos y lactato pueden quelar electrones libres de la cadena de transporte de electrones o inhibir las deshidrogenasas ligadas al flujo de los mismos, además de disminuir los niveles de citocromos e inhibir el crecimiento del microorganismo a través de la disrupción de la fuerza motriz de protones requerida para la fosforilación oxidativa. Lactato de potasio, puede inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* debido a un cambio en el metabolismo generando vías de producción de energía ineficientes, además altera la expresión de

40

genes implicados en los sistemas de transporte y permeabilidad celular como bombas de protones y transportadores ABC.

5 El efecto antimicrobiano del aceite esencial de tomillo, se atribuye a sus componentes mayoritarios timol y carvacrol indican que su adición inhibe la actividad ATPasa en *L. monocytogenes*, lo cual genera la reducción de  $\mu_{max}$  a concentraciones subletales; sin embargo en rangos de concentraciones inhibitorias cercanos a los de disrupción de membrana, la inhibición de ATPasa puede ser una causa secundaria de muerte celular. Aceites esenciales compuestos principalmente por timol, eugenol y carvacrol han sido reconocidos por causar la disrupción de la membrana celular, inhibir la actividad ATPasa, y liberar ATP y otros constituyentes en microorganismos como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, entre otros.

15 Las moléculas hidrofóbicas interaccionan generando cambios conformacionales en las proteínas de membrana, altas concentraciones de estas pueden estimular la actividad ATPasa, por el desacoplamiento de la respiración generada por la disrupción de membrana. *L. monocytogenes* puede generar resistencia a sustancias con potencial antimicrobiano de naturaleza lipídica y condiciones de estrés como bajos pH a través del cambio de la longitud y grado de saturación de ácidos grasos en su membrana.

20 La reducción generada en la actividad ATPasa por el ácido cáprico en combinación con lactato de sodio (C1+) y el palmitato de sacarosa en combinación con lactato de sodio (P1+) no presentó diferencias significativas frente al tratamiento con adición de 200 ppm  $NaNO_2$ . Palmitato de sacarosa a concentraciones subletales de 100 ppm aumentó la actividad ATPasa, sin diferencias respecto al blanco, y redujo el efecto inhibitorio de lactato, por estimulación como respuesta al estrés moderado. El palmitato es un protonoforo, que estimula la transferencia de electrones en la cadena de respiración con un decrecimiento relacionado al del potencial de membrana, así como promueve la actividad ATPasa, sin embargo inhibe la reacción de intercambio entre ATP y fosfato inorgánico, lo que indica que es un desacoplador de la fosforilación oxidativa. Asimismo, los ácidos grasos de cadena mediana o larga, como el ácido palmítico, pueden translocarse o ligarse a los transportadores de electrones e incrementar la fluidez de membrana, lo cual restringe el movimiento de los transportadores a través de la membrana. Ácidos grasos saturados e insaturados se ligan directamente a la ATPasa reduciendo la síntesis de ATP por el incremento de la permeabilidad de membrana a los protones, asociado al ingreso de los protones al citosol, se genera la reducción del gradiente de los mismos y el potencial de membrana.

40

## Evaluación de daño en membrana por microscopia de fluorescencia

El yoduro de propidio (PI) permite evaluar la integridad y poros generados en la membrana celular, éste se une al DNA y penetra solamente en las membranas dañadas de las bacterias, generando una reducción en la fluorescencia de SYTO 9 cuando ambos fluorocromos están mezclados.

El diseño de nuevas tecnologías de conservación en alimentos requiere evaluar el daño subletal, porque estas células podrían regenerarse y crecer durante el almacenamiento del alimento. En la tabla 1, se observan las relaciones de intensidad entre células con membrana dañada respecto a las células viables por cada tratamiento. Para *L. innocua* considerada un modelo apropiado de *L. monocytogenes* por su cercanía genética, se observó daño en membrana de todos los tratamientos respecto al blanco. Así, el tratamiento N presentó la mayor proporción de células dañadas, seguido del tratamiento T1. De otro lado, los tratamientos N, L, C1+, P1+ y T1 presentaron mayor proporción de células con daño en membrana que el tratamiento con etanol al 70%. Por otro lado, aunque los tratamientos L y P2 no presentaron proporción de daño en membrana superior al blanco, presentaron la mayor inhibición en la actividad ATPasa, que puede atribuirse a la interacción de palmitato de sacarosa y lactato de sodio con la membrana celular, causando suficiente distorsión para dispersar la fuerza motriz de protones a través de la liberación de iones pequeños pero sin liberación de moléculas grandes como el ATP.

Se observó daño en la membrana de *C. sporogenes* para todos los tratamientos mayor que en el blanco, asimismo L no presentó una proporción mayor de células con daño en membrana respecto de las células viables. Mientras que, el tratamiento T1 presentó la mayor proporción de células con daño en membrana seguido del control con etanol y por N. Debido a que la metodología por microscopia de fluorescencia puede evaluar el comportamiento de las células bacterianas individualmente la desviación estándar de las intensidades entre células dañadas/viables es elevada (Tabla 1).

En el tratamiento T1, se observaron las mayores proporciones de daño en membrana para *L. innocua* y *C. sporogenes*, así como se presentó inhibición de ATPasa en *L. monocytogenes* alrededor de 19%, lo que indica que la ATPasa no es el sitio primario de acción del aceite esencial de tomillo a 100 ppm, pero su inactivación contribuye a la muerte celular.

Microorganismo	Tratamiento	Relación intensidad Dañadas/Viables
<i>Listeria innocua</i>	B	0,722 ± 0,276
	N	1,554 ± 0,096
	L	1,385 ± 0,342
	Etanol	1,083 ± 0,107
	C1+	1,382 ± 0,146
	P1+	1,049 ± 0,054
	T1	1,473 ± 0,344
<i>Clostridium sporogenes</i>	B	0,490 ± 0,218
	N	1,399 ± 0,614
	L	0,791 ± 0,326
	Etanol	1,510 ± 0,064
	C1+	1,268 ± 0,413
	P1+	1,415 ± 0,693
	T1	2,388 ± 0,505

Tabla 1: Relación intensidad color RGB, a partir de histograma de microorganismos teñidos con yoduro de propidio (PI) que corresponde a las células con daño de membrana y SYTO9 que corresponde a células viables

5

#### **Efecto de potencial antimicrobiano de sustancias de naturaleza lipídica sobre cinéticas de crecimiento de microorganismos patógenos sobre prototipo cárnico**

La densidad poblacional final de *L. monocytogenes* a 30°C (Figura 2a) presentó la mayor inhibición por la adición de los tratamientos L y C2, seguida por los tratamientos T1 y N sin diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) entre sí. Los tratamientos C1+ y P1+ no presentaron actividad inhibitoria a esta temperatura. A 8°C en donde se imitan condiciones de abuso de refrigeración (Figura 2b) los tratamientos con mayor inhibición de la densidad poblacional final fueron C2, L y N sin diferencias ( $P > 0.05$ ), mientras que los tratamientos T1, C1+, P1+ y P2 no presentaron inhibición sobre este parámetro de crecimiento.

15

Debido a las propiedades fisicoquímicas de los ácidos grasos, éstos pueden actuar como protonoforo en función de condiciones como el pH y la temperatura; asimismo ácidos grasos de cadena mediana como el ácido cáprico, presentan potencial antimicrobiano asociado a su capacidad de interferencia con la señal de transducción y la disrupción de la membrana fosfolipídica, lo que frente al análisis de los parámetros de crecimiento de *L. monocytogenes* (Tabla 2), se muestra la inhibición de velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) por el almacenamiento en condiciones de abuso de refrigeración  $0.002h^{-1}$  frente a  $0.021h^{-1}$  a 30°C en los tratamientos blanco (B). Para este microorganismo, la inhibición generada por la adición de 200ppm de  $NaNO_2$  a 30°C fue comparable con la presentada por almacenamiento a 8°C. A 30°C el tratamiento L presentó la mayor inhibición sobre  $\mu_{max}$  con valores negativos, seguido de los tratamientos T1, C1+ y P2 con valores

20

25

negativos cercanos a 0. Por otro lado, a 8°C la inhibición de  $\mu_{\max}$  para *L. monocytogenes* estuvo dirigida a la adición de N y L.

5 A 30°C la adición de C1+, P2 y T1 inhibieron la densidad poblacional al día 14 de *E. coli* hasta 3 Log UFC.g<sup>-1</sup> respecto al control negativo (B) sin antimicrobianos (Figura 3a). A 8°C a los 14 días de almacenamiento el microorganismo fue inhibido completamente con base en una concentración inicial de 5 Log UFC.g<sup>-1</sup>, y a los 21 días por adición de P1+ y C2 (Figura 3b). Para este microorganismo la adición de nitrito de sodio no presentó un efecto inhibitorio a las dos temperaturas evaluadas.

10

En la tabla 2, se mostró amplia inhibición en *E. coli* sobre  $\mu_{\max}$  asociada a la temperatura de almacenamiento a 8°C, en el tratamiento blanco (B) correspondió a -0.004h<sup>-1</sup> frente a 0.079h<sup>-1</sup> a 30°C, lo que indica alta sensibilidad de *E. coli* a bajas temperaturas de abuso de refrigeración a 8°C, donde se evidenció inactivación del microorganismo. A 30°C la adición de nitrito presentó inhibición de 97.5% en relación al tratamiento blanco, asimismo los tratamientos C1+ y P2 mostraron mayor inhibición sobre  $\mu_{\max}$  de *E. coli* (P<0.05).

15

*S. aureus* mostró descenso marcado en el crecimiento a partir del día 3 a 30°C en los tratamientos L, C2 y C1+, lo que podría indicar un efecto bacteriostático por adición de ácido cáprico y lactato de sodio, con diferencia alrededor de 3 Log UFC.g<sup>-1</sup> respecto a los controles con N y B. La tasa de inactivación fue menor en los tratamientos P1+ y T1, y se mantuvo el crecimiento del microorganismo para los tratamientos B, N y P2 (Figura 4a). Por el contrario, a 8°C *S. aureus*, no mostró tendencia al decrecimiento (Figura 4b), sin embargo, los tratamientos que presentaron mayor inhibición fueron C2 y P1+, seguidos por los tratamientos C1+, P2 y N. Para *S. aureus* la adición de 200ppm de NaNO<sub>2</sub> (N) no presentó un efecto significativo en la inhibición de la concentración microbiana tras 14 días (336h) de almacenamiento a 30°C y 30 días (576h) a 8°C.

20

25

La temperatura de almacenamiento fue un factor de alta influencia sobre  $\mu_{\max}$  de *S. aureus*, en donde a 8°C presentó  $\mu_{\max}$  <0.0001h<sup>-1</sup> y a 30°C fue 0.012. La adición de N mostró inhibición alrededor de diez veces sobre el tratamiento B, sin embargo los tratamientos T1, C2, C1+ y P1+ mostraron  $\mu_{\max}$  negativas, este comportamiento podría indicar un efecto bacteriostático en *S. aureus* de NaNO<sub>2</sub>, y un efecto bactericida generado por la adición de ácido cáprico y palmitato de sacarosa en combinación con lactato de sodio (Tabla 2).

30

35

Las dinámicas de crecimiento para *Salmonella enteritidis* (Figura 5a) mostraron la disminución alrededor de 1.5 Log UFC.g<sup>-1</sup> tras las 6 primeras horas de almacenamiento a 30°C en el tratamiento C1+ y un periodo de mantenimiento a esta concentración bacteriana hasta día 3 (72h), seguido de un incremento y posterior descenso; el tratamiento C1+ presentó la menor densidad poblacional tras 14 días de almacenamiento

40

sin diferencias ( $P>0.05$ ) con el tratamiento C2; este comportamiento se ratificó sobre  $\mu_{\max}$ , para los tratamientos C2, C1+ y P2, en donde los valores para este parámetro fueron negativos, mostrando un posible efecto bactericida. Sin embargo, la adición de N presentó incremento de  $\mu_{\max}$  hasta  $0.625h^{-1}$ .

5

A  $8^{\circ}C$  en general el crecimiento de *Salmonella enteritidis* se mantuvo para todos los tratamientos, y se presentaron  $\mu_{\max}$  negativas durante los 30 días del experimento, con la mayor inhibición presentada por el tratamiento C2. La adición de  $NaNO_2$  no presentó un efecto inhibitorio sobre la densidad poblacional de *S. enteritidis*, por el contrario incrementó su  $\mu_{\max}$ . Sin embargo, el análisis de parámetros de crecimiento muestra alta sensibilidad al almacenamiento bajo condiciones de abuso de refrigeración para este microorganismo (Figura 5b).

10

Se ratificó que la acción antimicrobiana de  $NaNO_2$  está centrada en la inhibición de *Clostridium sporogenes*, en donde tras 14 días de almacenamiento a  $30^{\circ}C$ , presentó la menor densidad poblacional. Sin embargo, la inhibición de *C. sporogenes* para todos los tratamientos no presentó diferencias estadísticas ( $P>0.05$ ) (Figura 6a), en el tratamiento C1+ fue observado una disminución a las 6 primeras horas de  $0.5 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ .

15

No obstante, a  $8^{\circ}C$  (Figura 6b) los tratamientos C1+ y L presentaron la mayor inhibición de la concentración de *C. sporogenes* posterior a 30 días, sin diferencias entre sí ( $P>0.05$ ); seguidos por el tratamiento P1+ que, en combinación con la disminución de la temperatura, muestran un efecto bacteriostático sobre el microorganismo. Los tratamientos N, T1, P2 no presentaron inhibición en la densidad poblacional del microorganismo sin diferencias respecto a B ( $P>0.05$ ).

20

25

Se observó que el efecto inhibitorio sobre *C. sporogenes* está fuertemente ligado a la adición de lactato de sodio, sin diferencia con los tratamientos en combinación con ácido cáprico y palmitato de sacarosa a 100 ppm; asimismo, ácido cáprico y palmitato de sacarosa puros a concentraciones de 200 ppm no presentaron efecto inhibitorio sobre la concentración del microorganismo tras 30 días de almacenamiento.

30

Para *C. sporogenes*  $\mu_{\max}$  mostró inhibición del crecimiento del microorganismo asociado a la temperatura alrededor de  $65.5\%$  frente a la comparación de tratamientos blanco, lo cual está asociado a la fisiología de la bacteria.

35

A  $30^{\circ}C$ ,  $NaNO_2$  (N) mostró inhibición de  $\mu_{\max}$  respecto al blanco (B), sin diferencias con los tratamientos C2 y C1+. Igualmente, la adición de tratamientos L y P1+ inhibió alrededor de diez veces la  $\mu_{\max}$  de *C. sporogenes*. Sin embargo a  $8^{\circ}C$  la adición de P2 aumentó la  $\mu_{\max}$  respecto al blanco; la inhibición sobre la  $\mu_{\max}$  de N fue igual

40

estadísticamente para C2 y P1+. Para L  $\mu_{max}$ , fue negativo lo que implica un efecto bactericida sobre *C. sporogenes*.

Los tratamientos con ácido cáprico solo y en combinación con lactato de sodio, presentaron potencial antimicrobiano frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos; cuyo efecto depende de la estructura de la superficie de la membrana bacteriana, debido a que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se insertan en la membrana generando perturbación y permeabilidad. Por tanto, la membrana externa de las bacterias Gram negativas funciona como una barrera contra los ácidos grasos, mientras que en las Gram positivas puede permitir la partición de los ácidos grasos en la membrana interna. Sin embargo, la tasa de disociación del ácido graso que afecta la partición dentro de la membrana celular está en función de las condiciones de pH.

Temperatura (°C)	Tratamiento	<i>Clostridium sporogenes</i>				<i>Escherichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Listeria monocytogenes</i>				<i>Salmonella enteritidis</i>			
		$\mu_{max}$	$\lambda$	E.E	R <sup>2</sup>	$\mu_{max}$	$\lambda$	E.E	R <sup>2</sup>	$\mu_{max}$	$\lambda$	E.E	R <sup>2</sup>	$\mu_{max}$	$\lambda$	E.E	R <sup>2</sup>	$\mu_{max}$	$\lambda$	E.E	R <sup>2</sup>
30	B	0.055		0.269	0.774	0.079		0.562	0.664	0.012		0.315	0.478	0.021		0.242	0.904	-0.029	273.8	0.104	0.974
	N	0.034		0.232	0.594	0.002		0.705	0.024	0.001		0.448		0.003		0.267	0.532	0.625		0.387	0.874
	L	0.002		0.492	0.087	0.205		0.756	0.898	-0.016	168.8	0.504	0.751	-0.355		0.309	0.919	0.004		0.665	0.280
	T1	0.049		0.201	0.905	-0.001		1.527		-0.001		0.388	0.005	-0.003		0.350	0.387	0.001		0.311	
	C2	0.035		0.229	0.818	0.151		1.293	0.633	-0.003		0.635	0.207	0.002		0.607	0.059	-0.002		0.684	
	C1+	0.032		0.273	0.711	-0.002		0.772		-0.004		0.622	0.342	-0.001		0.399		-0.001		1.028	
	P2	0.042		0.188	0.861	-0.001		1.378		0.000		0.408		-0.003		0.469	0.257	-2.66E-04		0.289	
	P1+	0.002		0.302	0.475	0.130		1.072	0.778	-0.003		0.407	0.303	-4.37E-04		0.334		0.003		0.555	0.283
8	B	0.019	316.2	0.141	0.890	-0.004		0.483	0.853	0.000		0.302		0.002		0.640	0.380	0.000		0.718	
	N	0.001		0.344	0.241	-0.003		0.884	0.355	-0.001		0.158	0.798	-0.002		0.928	0.283	0.002		0.527	0.332
	L	-0.001		0.473	0.088	-0.001		0.447	0.401	-0.001		0.192	0.369	-0.003		0.404	0.741	-3.08E-04		0.297	
	T1	0.021	309.6	0.231	0.694	0.001		1.150		0.000		0.340		-3.82E-05		0.340		-0.002		0.632	0.399
	C2	0.002		0.376	0.643	-0.008		0.295	0.951	-0.017	551.9	0.090	0.660	0.001		0.391	0.186	-0.003		0.107	0.971
	C1+	0.000		0.195		-0.061	18.8	0.008	1.000	-0.017		0.124	0.728	0.001		0.341	0.433	-0.001		0.622	
	P2	0.035	327.2	0.183	0.867	-0.004		0.508	0.807	-0.001		0.267	0.346	1.71E-04		0.351		-0.001		0.647	0.107
	P1+	0.001		0.150	0.646	-0.007		1.071	0.511	-0.002		0.211	0.729	1.05E-04		0.486		-3.02E-04		0.430	

Tabla 2: Estimación de parámetros de crecimiento de patógenos a través de modelo de Baranyi. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) [ $h^{-1}$ ], fase de latencia ( $\lambda$ ) [h], error estándar (E.E).

Fue evaluada la dinámica de crecimiento de microbiota nativa como recuento de aerobios mesófilos, referido a microorganismos que pueden desarrollarse al vacío y posteriormente crecer posterior a la apertura del envase simulando el almacenamiento generado por el consumidor. En donde, el crecimiento de estos microorganismos que son habitantes normales de las materias primas como carne en altas concentraciones; puede relacionarse con el comportamiento de microbiota alterante con actividad lipolítica y proteolítica.

Debido a las condiciones de cocción del producto (60°C por 1 min), fue posible analizar en comportamiento en altas concentraciones de éstos microorganismos durante almacenamiento. En almacenamiento a 30°C (Figura 7a) no se presentaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos N, B, C1+, L y T1; sin embargo los tratamientos que presentaron inhibición significativa sobre el crecimiento de aerobios mesófilos fueron C2, P1+ y P2; estos resultados demuestran un efecto sinérgico de la

combinación de lactato de sodio y palmitato de sacarosa sobre la reducción de aerobios mesófilos ; porque el efecto inhibitorio fue mayor al presentado por lactato de sodio, sin diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre concentraciones de 100 y 200ppm de palmitato de sacarosa.

5

Respecto a las condiciones de almacenamiento a 8°C (Figura 7b) la adición de nitrito de sodio (N) y aceite esencial de tomillo (T1) no presentó un efecto inhibitorio, sin diferencias ( $P > 0.05$ ) frente al tratamiento blanco (B). Los tratamientos que presentaron inhibición sobre la densidad de aerobios mesófilos tras almacenamiento de 14 días fueron P2, C1+

10

y L.

La población de aerobios mesófilos a 30°C no presentó diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos B, N, L, C1+ y P1+; por otro lado los tratamientos T1 y P2 mostraron inhibición sobre  $\mu_{max}$  alrededor de diez veces. El crecimiento de éstos microorganismos presentó mayores  $\mu_{max}$  en los tratamientos C1+ y P2 con relación a B (Tabla 3).

15

Temperatura (°C)	Tratamiento	Facultativos mesófilos psicrotolerantes			
		$\mu_{max}$	$\lambda$	E.E	R <sup>2</sup>
30	B	0,010		0,574	0,800
	N	0,011		1,297	0,493
	L	0,012		1,219	0,566
	T1	0,009		0,441	0,845
	C2	0,152		1,287	0,634
	C1+	0,014		1,616	0,489
	P2	0,009		1,505	0,245
	P1+	0,011		1,745	0,315
	8	B	0,005		1,340
N		0,004		1,468	0,442
L		0,003		1,446	0,337
T1		0,003		1,111	0,500
C2		0,004		1,587	0,399
C1+		0,036		1,060	0,670
P2		0,026		1,156	0,780
P1+		0,036		1,210	0,721

**Tabla 3.** Estimación de parámetros biocinéticos de cuenta total bacteriana (Facultativos mesófilos psicrotolerantes) a través de modelo de Baranyi. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) [ $h^{-1}$ ], fase de latencia ( $\lambda$ ) [h], error estándar (E.E).

20

Por la adición de carvacrol *L. monocytogenes* aumentó el nivel de saturación de los ácidos grasos de su membrana; mientras que los ácidos grasos de *E. coli* aumentaron la longitud de su cadena debido a la adición de 40ppm de thymol y *S. enteritidis* aumentó la concentración de ácidos grasos insaturados y disminuyó la de ácidos grasos ciclopropanoicos tras la adición de 40 y 70 ppm de carvacrol. De acuerdo con éstos

25

resultados se asoció el incremento de los niveles de insaturación de ácidos grasos de membrana independiente de la especie, a lo que se atribuyó la resistencia de los microorganismos a la adición de aceites esenciales y otras condiciones de estrés como altas y bajas temperaturas, incremento de presión osmótica, y estrés oxidativo. Particularmente los microorganismos Gram (-) mostraron variación de contenido de ácidos grasos ciclopropanoicos asociados a la estabilidad de las propiedades estructurales y dinámicas de la membrana, donde la concentración de ácidos ciclopropanoicos es proporcional con la fluidez y por tanto la tolerancia a factores de distorsión. Para *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. enteritidis* presentaron como mecanismo de respuesta a estrés el aumento de la longitud de cadena de ácidos grasos y de isómeros *trans* para compensar el efecto de fluidización proporcional con el aumento del grado de insaturación, relacionado con la supervivencia y adaptación. Sin embargo *L. monocytogenes* como consecuencia de la adición de thymol no mostró aumento en la longitud de la cadena.

15

#### **Evaluación de cambios en color sobre producto cárnico con sustancias de naturaleza lipídica**

Los cambios en color fueron evaluados a 8°C durante 41 días de almacenamiento, para simular los cambios del producto generados en una temperatura de condiciones de abuso de refrigeración o refrigeración comercial. Fueron evaluados de forma independiente los cambios en la parte interna y externa de los prototipos salchicha. Las diferencias en color fueron estimadas a través de distancias colorimétricas en la escala CIE LAB y reflectancia entre 400 y 700 nm.

25

Para  $L^*$ , del día 0 al 21 de almacenamiento no se presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la parte exterior del producto cárnico, sin embargo, a partir del día 30 los tratamientos con mayor  $L^*$  fueron P1+ y C1+, seguidos por los tratamientos N y L y con menores valores P2, T1, B y C2; estas diferencias se mantuvieron hasta el día 41 de almacenamiento (Figura 8a). En la parte interna del producto (Figura 8b) se mantuvo la tendencia de variación de forma similar a las encontradas sobre el exterior del producto, en donde los tratamientos con mayor  $L^*$  siguen siendo P1+ y C1+, seguidos por L, C2, P2 y T1 y finalmente N y B sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

35

El parámetro  $a^*$  que describe la variación de colores verdes a rojos, cambió de manera importante en la parte exterior (Figura 9a) e interior (Figura 9b) del producto en función de los tratamientos evaluados. Sobre la parte exterior del producto se observa una tendencia al descenso en función del tiempo de almacenamiento. Es posible observar que tanto para la parte interna como la externa del producto sin almacenamiento (tiempo 0h) los tratamientos con adición de 200ppm de  $\text{NaNO}_2$  (N), presentaron los menores valores para  $a^*$ , sin diferencias significativas estadísticamente entre ningún tratamiento ( $P > 0.05$ ).

40

Sin embargo, a partir del segundo día de almacenamiento N presentó los mayores valores de  $a^*$  sobre la parte externa del producto, con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) respecto a los otros tratamientos. A partir del día 37, la variación de  $a^*$  en la parte externa se mantuvo sin diferencias significativas entre los tratamientos N y L ( $P > 0.05$ ) hasta el día 41. Finalmente los tratamientos C2, C1+, P1+ y T1 presentaron los menores valores del parámetro  $a^*$  sobre la parte exterior e interior del producto sin diferencias significativas respecto al tratamiento B ( $P > 0.05$ ).

Los cambios desde color azul a amarillo descritos por el parámetro  $b^*$  no variaron de forma importante para los tratamientos evaluados, en donde no se presentaron diferencias significativas para ningún tratamiento ( $P > 0.05$ ) hasta el día 21 de almacenamiento sobre la parte externa del producto (Figura 10a), sin embargo, en los días 37 y 41  $b^*$  no presentó diferencias entre los tratamientos L, P2, C2 y P1+ frente al control con  $\text{NaNO}_2$  (N). Adicionalmente, sobre la parte interna del producto el parámetro  $b^*$  no presentó diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos durante el periodo de evaluación de 41 días a  $8^\circ\text{C}$  (Figura 10b).

La variación global de color ( $\Delta E$ ) indica las diferencias totales de color (Tabla 4), para el tiempo 0 N presentó la menor  $\Delta E$  respecto los otros tratamientos, tras 7 días de almacenamiento el tratamiento B presentó la menor  $\Delta E$ , y N no presentó diferencias respecto a los otros tratamientos. Sin embargo, en los días 30 y 41 se maximizaron las diferencias sobre  $\Delta E$ , en donde el B presentó la menor variación, que es comparable con tratamiento T1. Por otro lado, N presentó los mayores valores de  $\Delta E$  similares a los encontrados en los tratamientos C1+ y P1+.

25

EXTERNO				
Tratamiento	0	7	30	41
B	71,81	68,81	68,32	69,16
N	67,61	71,01	72,92	73,92
L	68,35	70,17	72,14	71,99
T1	72,10	71,89	68,94	68,78
C2	72,32	71,27	69,27	70,13
C1+	70,01	71,14	74,59	73,58
P2	72,70	71,30	70,55	71,14
P1+	72,62	70,09	76,25	73,33
INTERNO				
Tratamiento	0	14	30	41
B	72,25	70,33	70,99	70,77
N	70,25	70,09	72,38	71,55
L	71,49	71,22	72,50	71,94
T1	73,06	73,13	74,08	74,35
C2	71,70	72,65	72,63	72,01
C1+	74,10	72,25	74,56	76,07
P2	72,97	71,53	73,89	72,42
P1+	72,65	69,90	77,58	77,17

Tabla 4. Variación global de color ( $\Delta E$ ) en la superficie externa e interna de producto cárnico tipo salchicha.

#### 5 Evaluación de oxidación lipídica sobre producto cárnico con sustancias de naturaleza lipídica (Malonaldehídos y otros aldehídos)

La figura 11a muestra la tendencia de generación de mg de malonaldehídos por kg de muestra a 8°C, en donde se observa como punto de inflexión el día 17 a partir del cual comienza la tendencia acelerada de productos de oxidación que sobrepasan el límite permisible para productos cárnicos (2mg MDA/kg muestra), sin diferencias asociadas al tratamiento; posterior a 41 días de almacenamiento tampoco fueron observadas diferencias significativas ( $P>0.05$ ). De otro lado, la figura 11b que muestra la oxidación lipídica del producto tipo salchicha almacenado a 30°C, maximiza las diferencias presentadas por los tratamientos, en donde el límite de 2mg MDA/kg muestra se alcanza a los 14 días, en donde tras este periodo de tiempo la mayor concentración de malonaldehídos fue presentada por los tratamientos N, B, L y T1 sin diferencias significativas entre sí ( $P>0.05$ ); los tratamientos con menor oxidación lipídica fueron: C2, C1+, P2 y P1+.

Con base en el modelo de Arrhenius, fueron determinadas las energías de activación ( $E_a$ ) de la reacción de oxidación lipídica, de acuerdo con una cinética de primer orden (Tabla 5). Donde la  $E_a$  corresponde a la energía requerida para que se dé una reacción, en este caso la de oxidación, por tanto a mayores  $E_a$  el grado de espontaneidad de la reacción disminuye. Es así como, los tratamientos con menores  $E_a$  correspondientes a N, C1+, P2

y P1+ presentaran mayores oxidaciones lipídicas; mientras que tratamientos B, L y en especial T1 presentaron menor tasa de oxidación lipídica, lo cual es concordante con la actividad antioxidante reportada por el aceite esencial de tomillo.

Ea (kJ/mol)							
B	N	L	T1	C2	C1+	P2	P1+
27,84	7,94	26,48	33,35	18,52	9,04	6,02	9,89

5 **Tabla 5.** Energías de activación (Ea) de oxidación lipídica para producto cárnico tipo salchicha a diferentes tratamientos

### Conclusiones

10 - La inhibición de la actividad ATPasa sobre *L. monocytogenes* por adición de 1.5% de lactato de sodio fue la mayor 44.1%, en los tratamientos P2 fue 19.7% y para T1 fue 19%, donde la inhibición de la actividad enzimática podría relacionarse con la reducción de  $\mu_{max}$ . Palmitato de sacarosa a concentraciones subletales de 100 ppm aumentó la actividad ATPasa, sin diferencias respecto al blanco, y redujo el efecto inhibitorio de  
15 lactato, por estimulación como respuesta al estrés moderado.

- La adición de yoduro de propidio (PI) permitió evaluar la integridad y poros generados en la membrana celular, así como el daño subletal. Para *L. innocua* y *C. sporogenes* el  
20 tratamiento N presentó la mayor proporción de células dañadas, seguido del tratamiento T1. No obstante, los tratamientos L y P2 no presentaron proporción de daño en membrana superior al blanco, pero presentaron la mayor inhibición en la actividad ATPasa, lo que puede atribuirse a la interacción de palmitato de sacarosa y lactato de sodio con la membrana celular, causando suficiente distorsión para dispersar la fuerza motriz de protones a través de la liberación de iones pequeños pero sin liberación de  
25 moléculas grandes como el ATP. Por otro lado, en el tratamiento P1+ no presentó un efecto inhibitorio sobre los dos mecanismos evaluados, lo que podría relacionarse con cambios en la resistencia y respuesta a estrés de *L. monocytogenes*/*L. innocua* generado por la adición de concentraciones subletales de 100 ppm de palmitato de sacarosa.

30 - Microorganismos Gram (+) como *L. monocytogenes*/*L. innocua* y *C. sporogenes*, presentan como componentes mayoritarios de su membrana fosfatidilglicerol y lisilfosfatidilglicerol, los cuales son fosfolípidos hidroxilados típicos de patógenos, y que presentan carga neta negativa a pH cercano a la neutralidad. Debido a que estos fosfolípidos tienden a ser altamente electronegativos, esto explicaría el efecto antimicrobiano asociado a las interacciones con el ácido cáprico y palmitato de sacarosa.  
35

- La adición de nitritos (200 ppm) no generó inhibición sobre los microorganismos de mayor prevalencia en Colombia, esto es, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *E. coli*, ni sobre el

crecimiento de microbiota nativa (aerobios mesófilos) que pueden ser considerados como microorganismos alterantes que disminuyen la calidad del producto cárnico y su vida útil. Lo anterior ratifica que el uso actual de  $\text{NaNO}_2$  está dirigido hacia el control de *L. monocytogenes* y *C. sporogenes*., que pueden sobrevivir bajo otros sistemas de control aplicados actualmente a nivel industrial (altas y bajas temperaturas de procesamiento, amplia gama de desinfectantes)

5 - El tratamiento C1+, presentó inhibición sobre *S. aureus* y *E. coli*, de alta prevalencia en Colombia, así como *C. sporogenes* y microbiota nativa.

10 - El tratamiento P1+, mostró inhibición sobre *S. aureus*, *C. sporogenes*, *E. coli* y microbiota nativa.

15 - Se encontró que  $\text{NaNO}_2$  no inhibió la generación de compuestos secundarios de oxidación (malonaldehídos); los tratamientos C1+ y P1+ mostraron menor oxidación lipídica que  $\text{NaNO}_2$ , sin embargo no pueden catalogarse como sustancias con potencial antioxidante, porque la cinética de oxidación lipídica fue mayor que para el tratamiento blanco (B).

- Respecto a los cambios de color, las diferencias se maximizaron sobre la parte externa del producto. Asimismo, los cambios se presentaron en función de  $L^*$  y  $a^*$ , en donde los tratamientos P1+ y C1+ mostraron los mayores valores para  $L^*$ , sin embargo N presentó los mayores valores sobre  $a^*$ , con diferencias significativas frente a otros tratamientos.

20 - La adición de ácido cáprico a 200 ppm (C2) inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. enteritidis*, en mayor proporción que 200 ppm de  $\text{NaNO}_2$ .

Evaluación de sustancias de naturaleza lipídica y lactato de sodio, para aplicación en sistemas con concentraciones de proteínas y lípidos menores al 1% o sistemas no-alimentarios.

25 • La inhibición generada por la adición del ácido cáprico a 30, 50, 100 y 250 ppm no presentó diferencias estadísticamente ( $P < 0.05$ ) con el control de  $\text{NaNO}_2$ , la MCI fue 10ppm de ácido cáprico sobre *C. sporogenes*.

30 • El ácido linolénico no presentó efecto inhibitorio entre 10 y 100 ppm sobre los microorganismos evaluados. En adición, para *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *S. aureus* la adición de ácido linolénico tuvo efecto antagonista sobre la inhibición, anulando el efecto antimicrobiano del ácido cáprico.

35 • Se evidenció que el potencial antimicrobiano de palmitato de sacarosa se relaciona en forma directa con su concentración sobre *C. sporogenes* y *L.*

*monocytogenes*; al combinarlo con lactato de sodio la inhibición de *C. sporogenes* fue aditiva.

- 5 • *E. coli* presentó una extrema sensibilidad al palmitato de sacarosa sin diferencia significativa con las concentraciones evaluadas ( $P < 0.05$ ), no obstante esta bacteria no fue susceptible a lactato de sodio a 1.5%.
- 10 • *S. enteritidis* y *S. aureus* no fueron susceptibles a la adición de palmitato de sacarosa. La inhibición para *S. aureus* por combinación de lactato de sodio 1.5% y 200 ppm palmitato de sacarosa aumentó significativamente ( $P > 0.05$ ). Palmitato de sacarosa presentó un efecto antimicrobiano sobre *C. sporogenes*, *L. monocytogenes* y *E. coli*, sin efecto sobre *S. enteritidis* y *S. aureus*, este comportamiento indica que su acción no está asociado a la fisiología bacteriana.

15