



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Empleo de Extractos Naturales obtenidos de  
Subproductos Agroalimentarios en  
Productos de V Gama

D. David Quintín Martínez

2015





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

M<sup>a</sup> DOLORES GARRIDO FERNÁNDEZ Catedrática de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia en el Dpto. de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada “Empleo de extractos naturales obtenidos de subproductos agroalimentarios en productos de V gama”, realizada por D. David Quintín Martínez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 27 de Octubre de 2015

**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Tecnología de los Alimentos**  
**Nutrición y Bromatología**

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
T. 868 88 87 67 – F. 868 88 71 67 – [www.um.es](http://www.um.es)

**D<sup>a</sup>. Presentación García Gómez, Doctora por la Universidad Politécnica de Cartagena y responsable del Departamento de Tecnología del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva Y Alimentación**

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Empleo de extractos naturales obtenidos de subproductos agroalimentarios en productos de V gama”**, realizada por D. David Quintín Martínez bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Octubre de 2015



Fdo. Presentación García Gómez

## AGRADECIMIENTOS

*Durante la elaboración de esta tesis, que ha llevado varios años, he recibido el apoyo y ayuda de muchas personas, por ello quiero aprovechar estas líneas para expresarles mi más sincero y sentido agradecimiento.*

*En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis.*

*A mi Directora y Doctora Presentación García Gómez, mi jefa, compañera y sobre todo una gran amiga, que ha sido uno de los principales motores de esta tesis, que sin ella no habría llegado a buen puerto. Muchas gracias por tu gran ayuda, paciencia y confianza en mí y por todos estos años trabajando a tu lado.*

*A mi Directora M<sup>a</sup> Dolores Garrido Fernández, gracias por todo lo que me has enseñado, por todo el tiempo que has dedicado en esta tesis y por estar ahí siempre que te he necesitado. Es un placer trabajar contigo.*

*A D. Luis Dussac Moreno, gracias por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis en el Centro Tecnológico.*

*A D. Pedro Sánchez Campillo, el “abuelo” que nunca he tenido, gracias por tus buenos y sabios consejos, gracias por ser mi mejor ejemplo de profesionalidad y persona y por hacer de mí el profesional que soy hoy.*

*A D. Juan Alarcón González, mi primer jefe, que su forma de hacerlo y verlo todo tan fácil. Gracias por todo lo que me has enseñado y estar siempre listo para ayudarme, por nunca tener un mal gesto y por ser una persona tan transparente.*

*A Lolilla, mi compañera de muchas fatigas, por ayudarme siempre y por ser tan buena compañera y amiga. Espero que estemos muchos años trabajando juntos, no es fácil tener tan buenas compañeras como tú.*

*A Milagros, mi otra compañera de fatigas y validaciones, muchos años compartiendo fallos y éxitos. Gracias por tu apoyo y amistad, aquí me tienes para lo que necesites.*

*A Jose Rex, que me ha enseñado el mundo de la microbiología, gracias por toda la ayuda y por ser tan buena persona, siempre dispuesta a ayudar en todo lo que sea.*

*A Ángel y Paco, dos grandes personas del CTC y amigos, por vuestras bromas, viajes y buenos ratos en el CTC que hacen que se pasen los días más rápidos.*

*A Ana Belén y Salva, por aportar vuestros conocimientos de medio ambiente y pasar tantos buenos ratos juntos.*

*A Marian, por toda la ayuda documental prestada, tan imprescindible en la realización de esta tesis.*

*También agradecer a personas que pasan por el CTC y han dejado su pequeña huella en esta tesis, gracias Carlos, Aitor, Raúl,...y tantos otros que es imposible recordar.*

*A mis suegros, Paco y Carmen, y mi cuñado Fernando, por acogerme como uno más de la familia y siempre tratarme tan bien.*

*Todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia, mis padres, mi hermana y hermanos (cuñados y cuñadas). Estoy muy orgulloso de todos y cada uno de vosotros. Gracias especialmente a mis Padres por la educación y valores que me han dado, por darme de todo y siempre apoyarme para que estudiara.*

*Por último pero no menos importante, a la persona que me hace tan feliz cada día, que me aguanta en los malos y buenos momentos. Gracias a mi mujer y mi luz, Vero, por ser como eres y ayudarme siempre tanto, por formar parte de mi vida. Te quiero*

*David*





## *ÍNDICE*



---

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO I: ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<i>1.1. Alimentos de V gama: Definición, Situación actual, Legislación.</i>	<b>3</b>
1.1.1 Definición	<b>3</b>
1.1.2 Situación actual	<b>8</b>
1.1.3 Legislación aplicable	<b>15</b>
<i>1.2. Alteración y vida útil de alimentos de V gama</i>	<b>20</b>
<i>1.3. Estrategias para prolongar la vida útil de alimentos de V gama</i>	<b>28</b>
1.3.1 Tratamientos térmicos	<b>29</b>
1.3.2 Tratamientos no térmicos	<b>31</b>
1.3.3 Envasado en atmósferas protectoras	<b>32</b>
1.3.4 Sustancias antioxidantes y antimicrobianas	<b>36</b>
<i>1.4. Obtención de extractos naturales a partir de subproductos de la industria alimentaria</i>	<b>42</b>
1.4.1 Técnicas de extracción convencionales	<b>45</b>
1.4.2 Técnicas de extracción no convencionales	<b>46</b>
<i>1.5. Compuestos de interés en la alcachofa</i>	<b>51</b>
<i>1.6. Compuestos de interés en el ajo</i>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>71</b>
<i>3.1. Extractos naturales</i>	<b>73</b>
3.1.1. Alcachofa	<b>73</b>
3.1.2. Ajo	<b>74</b>
3.1.3. Obtención de extractos	<b>74</b>
3.1.4. Caracterización de extractos	<b>80</b>

3.2. <i>Elaboración de alimentos V gama : Aplicación de extractos</i>	87
3.2.1. <i>Elaboración de gazpacho refrigerado</i>	88
3.2.2. <i>Elaboración de pasta refrigerada</i>	93
3.2.3. <i>Estudio vida útil productos</i>	97
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	121
4.1. <i>Caracterización del extracto de alcachofa</i>	123
4.1.1. <i>Caracterización de la materia prima: subproducto de alcachofa</i>	124
4.1.2. <i>Caracterización de compuestos bioactivos</i>	125
4.1.3. <i>Caracterización de la capacidad antioxidante en extracto de alcachofa (métodos “in vitro”)</i>	128
4.1.4. <i>Caracterización de la capacidad antioxidante en extracto de alcachofa (métodos “in vivo”)</i>	130
4.2. <i>Caracterización del extracto de ajo</i>	135
4.2.1. <i>Caracterización de la materia prima: subproducto ajo</i>	136
4.2.2. <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	137
4.2.3. <i>Determinación de la capacidad antimicrobiana</i>	139
4.3 <i>Ensayos previos a la selección de extractos</i>	145
4.3.1. <i>Optimización y desarrollo de gazpacho PRUEBA A</i>	147
4.3.2. <i>Optimización y desarrollo de gazpacho PRUEBA B</i>	153
4.3.3. <i>Optimización y desarrollo de gazpacho PRUEBA C</i>	157
4.3.4. <i>Optimización y desarrollo de pasta refrigerada</i>	160
4.4. <i>Estudio de vida útil del gazpacho refrigerado</i>	162
4.4.1. <i>Estudio de vida útil muestras de gazpacho de la PRUEBA D</i>	163
4.4.2. <i>Estudio de vida útil muestras de gazpacho de la PRUEBA E</i>	169
4.5. <i>Estudio de la vida útil de pasta con tomate refrigerada</i>	175

4.5.1. Estudio de vida útil de las muestras de pasta de la PRUEBA F	177
4.5.2. Estudio de vida útil de las muestras de pasta de la PRUEBA G	183
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES</b>	191
<b>CAPÍTULO VI: RESUMEN/SUMMARY</b>	197
<b>CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA</b>	203

---

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Cepas de bacterias y concentraciones de antimicrobianos utilizados	84
<b>Tabla 2.</b> Cepa de levadura y concentraciones de antimicrobianos utilizados	85
<b>Tabla 3.</b> Preparación de viales para analizas capacidad antioxidante	86
<b>Tabla 4.</b> Composición del Gazpacho refrigerado	88
<b>Tabla 5.</b> Cocción de pasta	93
<b>Tabla 6.</b> Composición de salsa de tomate	93
<b>Tabla 7.</b> Factores de conversión	115
<b>Tabla 8.</b> Patrones de calibración	117
<b>Tabla 9.</b> Rendimiento procesos de extracción	123
<b>Tabla 10.</b> Caracterización de subproductos de alcachofa	124
<b>Tabla 11.</b> Compuestos de interés subproducto alcachofa	126
<b>Tabla 12.</b> Capacidad antioxidante de los extractos de alcachofa	128
<b>Tabla 13.</b> Tiempo necesario para el crecimiento en horas de <i>Sacharomices cerevisiae</i>	131
<b>Tabla 14.</b> Tiempo necesario para el crecimiento en horas de <i>Sacharomices cerevisiae</i>	133
<b>Tabla 15.</b> Rendimiento procesos de extracción	135
<b>Tabla 16.</b> Caracterización subproducto ajo	136
<b>Tabla 17.</b> Capacidad antioxidante en extracto de ajo	137
<b>Tabla 18.</b> Cepas de bacterias y concentraciones de antimicrobianos utilizados	142
<b>Tabla 19.</b> Tiempo necesario para el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella spp</i> en extracto de ajo	143
<b>Tabla 20.</b> Cepa de levadura y concentración de antimicrobiano utilizado	144

<b>Tabla 21.</b> Tiempo necesario para el crecimiento de <i>Sacharomices cerevisiae</i> en agente antimicrobiano extracto ajo	145
<b>Tabla 22.</b> Características de las muestras de gazpacho de la prueba A.	148
<b>Tabla 23.</b> Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (ufc/mL) en la prueba A	149
<b>Tabla 24.</b> Evolución de los parámetros físico-químicos en la prueba A	151
<b>Tabla 25.</b> Características de las muestras de gazpacho de la prueba B	153
<b>Tabla 26.</b> Recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (ufc/mL) en la prueba B	154
<b>Tabla 27.</b> Características de las muestras de gazpacho de la prueba B	157
<b>Tabla 28.</b> Crecimiento de aerobios mesófilos (ufc/mL) en la prueba C	159
<b>Tabla 29.</b> Características de las muestras de pasta ensayos preliminares	161
<b>Tabla 30.</b> Análisis sensorial de pasta ensayos preliminares	162
<b>Tabla 31.</b> Características de las muestras de gazpacho de la prueba D	164
<b>Tabla 32.</b> Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba D	165
<b>Tabla 33.</b> Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba D	166
<b>Tabla 34.</b> Resultados del análisis nutricional de la prueba D de gazpacho	169
<b>Tabla 35.</b> Características de las muestras de gazpacho de la prueba E	170
<b>Tabla 36.</b> Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba E	171
<b>Tabla 37.</b> Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba E	172
<b>Tabla 38.</b> Resultados del análisis nutricional de la prueba E de gazpacho	175
<b>Tabla 39.</b> Cocción de pasta y elaboración de salsa de tomate	176
<b>Tabla 40.</b> Características de las muestras de pasta de la prueba F	177
<b>Tabla 41.</b> Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba F	178
<b>Tabla 42.</b> Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba F	179

<b>Tabla 43.</b> Resultados del análisis nutricional de la prueba F de pasta	182
<b>Tabla 44.</b> Características de las muestras de pasta de la prueba G	184
<b>Tabla 45.</b> Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba G	185
<b>Tabla 46.</b> Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba G	186
<b>Tabla 47.</b> Resultados del análisis nutricional de la prueba G de pasta	189



<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Sistema de extracción de CO <sub>2</sub> supercrítico	50
<b>Figura 2.</b> Estructura tridimensional de la alicina	57
<b>Figura 3.</b> Imagen de subproducto de alcachofa generado en la industria	73
<b>Figura 4.</b> Imagen de subproducto de alcachofa generado en la industria	74
<b>Figura 5:</b> Proceso de obtención del extracto de alcachofa	77
<b>Figura 6.</b> Proceso de obtención del extracto de ajo	79
<b>Figura 7.</b> Imágenes de equipos utilizados y extractos obtenidos	79
<b>Figura 8.</b> Ecuación de oxidación método FRAP	82
<b>Figura 9.</b> Procedimiento de evaluación “in vivo” de la capacidad antioxidante mediante técnica de impedancia	86
<b>Figura 10.</b> Diagrama de flujo de elaboración de gazpacho	89
<b>Figura 11.</b> Diagrama de flujo de elaboración de Pasta refrigerada	94
<b>Figura 12.</b> Cuestionario tipo utilizado en catas	109
<b>Figura 13.</b> Gráficas del tiempo de crecimiento de <i>Sacharomices cerevisiae</i> a los que se añadió el 2% de extracto de alcachofa A (gráfica 1) y B (gráfica 2)	132
<b>Figura 14.</b> Gráficas del tiempo de crecimiento de <i>Sacharomices cerevisiae</i> a los que se añadió el 0,2%, 0,5% y 1% de extracto de alcachofa A y B	134
<b>Figura 15.</b> Resultados obtenidos en el ensayo “in vitro” de screening de capacidad antimicrobiana de extracto de ajo frente a cepas de: A) <i>Escherichia coli</i> , B) <i>Listeria monocytogenes</i> , C) <i>Sacharomices cerevisiae</i> y D) <i>Salmonella spp</i>	140
<b>Figura 16.</b> Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba A	152

<b>Figura 17.</b> Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba B	156
<b>Figura 18.</b> Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba D	168
<b>Figura 19.</b> Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba E	173
<b>Figura 20.</b> Resultados del análisis sensorial de las muestras de pasta con salsa de tomate envasadas al vacío de la prueba F	181
<b>Figura 21.</b> Resultados del análisis sensorial de las muestras de pasta con salsa de tomate envasadas en atmósfera protectora de la prueba G	187

**ABTS:** 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

**AENOR:** Asociación Española de Normalización y Certificación

**AGE:** Aged Garlic Extract

**ANOV:** Analysis Of Variance

**ASE:** Accelerated Solvent Extractor

**Atm:** atmósfera

**B.O.E:** Boletín Oficial del Estado

**BHT :** Butil hidroxitolueno

**C.V:** Coeficiente de variación

**C<sub>+</sub>:** Cepa microorganismo activada

**CAE:** Código alimentario español

**CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo

**CIDAF:** Centro de investigación y desarrollo del alimento funcional

**C<sub>ox</sub>:** Cepa microorganismo oxidada

**CTC:** Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación

**DAD:** Diodo Array Detector

**DADS:** Disulfuro de dialilo

**DAS:** Sulfuro de dialilo

**DATS:** Trisulfuro de dialilo

**DLC:** Fecha límite de consumo

**DLUO:** Fecha límite de utilización óptima

**DLV:** fecha límite de Venta

**DPPH:** 2,2-DIFENIL –1-PICRYLHYDRAZYL

**EOs:** Aceites esenciales

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations

**FDA:** Food and Drug Administration

**FRAP:** Ferric ion Reducing Antioxidant Power

**G1,5aj60:** Gazpacho con extracto de ajo al 1,5% elaborado a 60°C

**G1aj60:** Gazpacho con extracto de ajo al 1% elaborado a 60°C

**G2aj30:** Gazpacho con extracto de ajo 2% elaborado a 30°C

**G2aj60:** Gazpacho con extracto de ajo al 2% elaborado a 60°C

**G2aj75:** Gazpacho con extracto de ajo 2% elaborado a 75°C

**G2aj90:** Gazpacho con extracto de ajo 2% elaborado a 90°C

**G2ajBOT:** Gazpacho con extracto de ajo 2% botella

**G2ajTAR:** Gazpacho con extracto de ajo 2% tarrina en atmósfera modificada

**G5af30:** Gazpacho con extracto de alcachofa 5% elaborado a 30°C

**G10af60:** Gazpacho con extracto de alcachofa al 10% elaborado a 60°C

**G5af60:** Gazpacho con extracto de alcachofa 5% elaborado a 60°C

**G5af75:** Gazpacho con extracto de alcachofa 5% elaborado a 75°C

**G5af90:** Gazpacho con extracto de alcachofa 5% elaborado a 90°C

**G5afBOT:** Gazpacho con extracto de alcachofa 5% botella

**G5afTAR:** Gazpacho con extracto de alcachofa 5% tarrina en atmósfera modificada

**G5aj60:** Gazpacho con extracto de ajo elaborado a 60°C

**G6af60:** Gazpacho con extracto de alcachofa al 6% elaborado a 60°C

**G8af60:** Gazpacho con extracto de alcachofa al 8% elaborado a 60°C

**GAJ:** Gazpacho con extracto de ajo

**GAL:** Gazpacho con extracto de alcachofa

**GB:** gazpacho blanco (control)

**Gb30:** Gazpacho blanco sin extracto elaborado a 30°C

**Gb60:** Gazpacho blanco sin extracto elaborado a 60°C

**Gb60:** Gazpacho blanco sin extracto elaborado a 60°C

**Gb75:** Gazpacho blanco sin extracto elaborado a 75°C

**Gb90:** Gazpacho blanco sin extracto elaborado a 90°C

**GbBOT:** Gazpacho blanco sin extracto botella

**GbTAR:** Gazpacho blanco sine extracto tarrina en atmósfera modificada

**GO:** Aceite esencial de ajo

**GP:** Ajo deshidratado.

**GRAS:** Generally Recognized as safe

**HPLC:** High-performance liquid chromatography

**HTST:** High Temperature, Short Time

**ISO:** International Organization for Standardization

**K:** Grados Kelvin

**KETs:** Keys Enabling Technologies

**KHz:** Kilohercio

**LDL:** Low Density Lipoprotein

**LQ:** Límite de cuantificación.

**M€** millones de euros

**MAGRAMA:** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

**MAP:** Envasado en atmósferas protectoras

**MDD:** Marca de distribuidor

**MHz:** Megahercio

**N.D.C:** No detectado crecimiento

**NM:** Nanómetros

**PafMAP:** Pasta cocida con extracto de alcachofa envasada en atmósfera modificada

**PafVAC:** Pasta cocida con extracto de alcachofa envasada al vacío

**PAJ:** Pasta con extracto de ajo

**PajMAP:** Pasta cocida con extracto de ajo envasada en atmósfera modificada

**PajVAC:** Pasta cocida con extracto de ajo envasada al vacío

**PAL:** Pasta con extracto de alcachofa

**PB:** Pasta blanco (control)

**PbMAP:** Pasta blanco envasada en atmósfera modificada

**PbVAC:** Pasta blanco sin extracto envasada al vacío

**Pc:** Presión crítica

**PCA:** Plate count agar

**PL:** Pulsed Light

**RIS:** Research and Innovation Smart Specialisation Strategy

**SAC:** S-alil-cisteína

**SAMC:** S-alil-mercaptocisteína

**SD:** Relative standard deviation

**SFE:** Supercritical fluid extraction

**Tc:** Temperatura crítica

**THM:** Trihalometanos

**Tn:** Tonelada

**TPTZ:** 2,4,6-tri(2-piridil)-triazina

**TROLOX:** 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

**TSB:** Caldo triptosa de soja

**UE:** Unión Europea

**UHT:** Ultra High Temperature

**UNE:** Una Norma Española

**UVC:** Ultraviolet C

**VRBG:** Violet Red Bile Glucose

**X:** Media Aritmética

**XLD:** Xilosa, Lisina, Desoxicolato





## ***CAPÍTULO I. ANTECEDENTES***



## **1.1 ALIMENTOS DE V GAMA: DEFINICIÓN, SITUACIÓN ACTUAL, LEGISLACIÓN**

La tendencia del mundo occidental hacia un estilo de vida más rápido, aumenta la demanda de comodidad en la preparación de la comida (Costa y col., 2007). Los consumidores trabajan más horas, pasan más tiempo viajando y tienen un creciente deseo de maximizar su tiempo de ocio cada vez más limitado. Estas razones unidas al aumento de la participación femenina en la fuerza laboral, el aumento del estrés en el trabajo (Bowers, 2000), un número cada vez mayor de pequeños hogares formados por una sola persona (Byrne, 1998), y la falta de habilidades y experiencia en la preparación de comidas en casa (Gofton, 1995), han impulsado la demanda de comodidad y rapidez en la preparación de la comida (Costa y col., 2007).

Como reacción a esta demanda, la industria alimentaria ha ampliado su gama de platos preparados (Geeroms y col., 2008). Durante los últimos 10 años, el mercado de platos preparados en Europa ha crecido de forma constante.

El 40% de los estadounidenses considera cocinar en casa una molestia y la preparación de la comida una actividad muy lenta (Sloan, 1997). Esta tendencia también se ha extendido ampliamente en los países de la UE, junto con los ciclos de compras cada vez más cortos (Datamonitor, 1998, McHugh y col., 1991, Dade, 1992 y Ritson y Hutchins, 1995).

### **1.1.1. DEFINICIÓN**

Son varios los autores que definen los platos preparados como comidas completas que requieren pocos o ningún extra de ingredientes, preparados por procedimientos externos

y diseñados para íntegra y rápidamente reemplazar en casa el plato principal de una comida de elaboración casera (Costa, y col., 2001; Mahón y col., 2006).

Costa y col. (2001) diferencian entre 4 tipos de platos preparados: *Ready to eat*, como sándwiches, ensaladas, pasteles, los cuales son consumidos al comprarlos. *Ready to heat*, como platos congelados por ejemplo pizza, *Ready to end-cook*, comidas congeladas, platos deshidratados, los cuales requieren más de 15 minutos de preparación antes de consumir y por último, *Ready to cook*, que son productos mínimamente preparados que aun requieren el cocinado de alguno de sus ingredientes.

Tomando como punto de partida la definición de comida preparada establecida en el *Real Decreto 3484/2000*, la Asociación Española de Elaboradores de Platos Refrigerados define el término plato refrigerado como aquella elaboración culinaria resultado de la preparación en crudo o del cocinado o del precocinado de uno o varios productos alimenticios y, en su caso, condimentada, presentados envasados, conservados a temperatura de refrigeración y dispuestos para su consumo, bien sea directamente, o bien tras un calentamiento o tratamiento culinario adicional. Este decreto divide en tres grandes categorías las comidas preparadas, dependiendo de la tecnología aplicada y las condiciones de conservación:

√ Platos preparados congelados

√ Platos preparados refrigerados

√ Platos preparados deshidratados y esterilizados (conservación a temperatura ambiente).

Desde principios de los años 80, seis gamas corresponden a los cuatro niveles de elaboración de los productos alimenticios que existen (Sánchez Pineda, 2003):

- La **1ª gama**: los productos crudos conservados a temperatura ambiente o en refrigeración (frutas, verduras, carnes, pescados).
- La **2ª gama**: los productos pasteurizados o esterilizados (conservas).
- La **3ª gama**: los productos congelados.
- La **4ª gama**: los vegetales crudos, preparados para su empleo, conservados a refrigeración y envasados o no en atmósfera modificada.
- La **5ª gama**: productos listos para consumir que se almacenan en refrigeración
- La **6ª gama**: productos reestructurados o texturizados

El sector de elaboración de platos preparados refrigerados abarca un amplio y variado abanico de ingredientes, recetas y tecnologías de procesado y de envasado, e incluye una gran diversidad de productos alimenticios: pizzas, gazpachos, cremas, caldos, tortillas, sándwiches, bocadillos, roscas, ensaladas, platos a base de arroz, pasta, carne, legumbre u otras bases. Pero si hay una característica común a todos los productos del sector de elaboración de platos preparados refrigerados, ésta es la necesidad de mantener la cadena de frío hasta el momento de su utilización y consumo.

Según la propia clasificación establecida por la Asociación Española de Elaboradores de Platos Refrigerados, el mercado de platos preparados refrigerados se estructura en los siguientes segmentos:

- Pizzas
- Gazpachos, cremas y caldos
- Tortillas
- Sándwiches y bocadillos
- Roscas

- Ensaladas (no incluye las de cuarta gama)
- Platos a base de arroz (paella, etc.)
- Platos a base de pasta (lasaña, canelones, fideuá, etc.)
- Platos a base de carne (pollo asado, estofados, croquetas, san jacobos, etc.)
- Platos a base de legumbre (no incluye legumbres sin aliñar)
- Platos con otras bases (verdura, pescado, empanadas, quiches, etc.)

Otra definición es la del Código Alimentario Español (CAE), que define los platos preparados como: “los productos obtenidos por mezcla y condimentación de alimentos animales y vegetales, con o sin adición de otras sustancias autorizadas, contenidas en envases apropiados, herméticamente cerrados y tratados por el calor u otro procedimiento que asegure su conservación, y prestos a ser consumidos después de un simple calentamiento”.

El desarrollo de nuevas tecnologías en el área agroalimentaria han puesto a disposición de los consumidores alimentos especialmente diseñados para facilitar la preparación y consumo de los mismos. Dependiendo del grado de preparación, encontramos en el mercado platos preparados procesados listos para cocinar, para mezclar, que requieren un calentamiento previo a su consumo o preparados ya para comer.

El tipo de envase más empleado es la bandeja de material plástico, envasados herméticamente, opacos, para que no entre la luz y que permita su calentamiento en microondas. En los alimentos tipo pizza, el envase es una base plástica rígida que se cierra con una tapa flexible. En todos los casos se envasan con atmósfera protectora, sin oxígeno y se comercializan refrigerados.

El tamaño habitual tiene un peso de producto comprendido entre 200 y 500 gramos. El envase es el elemento más importante desde el punto de vista de prevención de la contaminación y determinante en la seguridad de este alimento. Para garantizar estas máximas ha de estar intacto y en perfectas condiciones. En caso contrario, habrá una fuga de gases, con el consiguiente riesgo al permitir el crecimiento de microorganismos y de mohos.

El envase desempeña también un papel de instrumento de venta. Debe ser atractivo por su color, su forma, su coste y su comodidad. Hoy, el envase debe ser apto para contener el producto durante su tiempo de recalentamiento (a menudo en microondas) para evitar la transferencia al alimento.

Con el fin de responder a estos imperativos, el envase debe poseer numerosas calidades tales como: retractabilidad bajo el agua a 90°C para adaptarse a la forma del producto, flexibilidad, siendo capaz de proteger el alimento, transparencia para un mejor control y por fin impermeabilidad al agua y a los gases. Para satisfacer todos estos criterios, el envase está constituido de polímeros. Hoy día, se utilizan dos tipos de polímeros para el envasado de alimentos: los polímeros plásticos, principalmente utilizados en forma de películas retraídas sobre el producto, constituidos, en general, por tres capas cada una de ellas con propiedades diferentes pero complementarias y los polímeros biológicos o comestibles y aplicables directamente sobre el producto y que forma una envoltura. Entre los materiales utilizados podemos encontrar distintos tipos de películas: laminadas, coextruidas, microperforadas, microporosas, “inteligentes” o comestibles. La elección de un tipo u otro se basa, en primer lugar, en consideraciones estrictamente científicas: i) generación y/o mantenimiento de una atmósfera determinada en cuanto a la relación O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, y ii) permeabilidad y facilidad de

condensación del vapor de agua, que se relaciona con la facilidad de enmohecimiento, condensación y marchitamiento del producto (Greengras, 1996). En la elección de un film determinado, intervienen también otra serie de factores que podríamos denominar como técnicos, pero que no son menos importantes en el éxito comercial del producto final: facilidad de grabado, maleabilidad, aptitud de sellado, resistencia mecánica y a los cambios de temperatura y facilidad de apertura de la soldadura.

### **1.1.2. SITUACIÓN ACTUAL**

El mercado de platos preparados mundial se espera que crezca un 3,2%. De \$1,11 trillones en 2011 a \$1,3 trillones en 2016 (Key Note, 2013). Gran parte de este crecimiento provendrá de China que es el mercado de platos preparados de mayor crecimiento mundial. Actualmente, los EE.UU. y el Reino Unido son los mercados más grandes del mundo, valorados en 7,2 y 2 billones de libras respectivamente. El mercado europeo se estima en los 3,9 billones de libras. La mayor parte de este crecimiento se debe al mercado del Reino Unido, que se espera que crezca un 20% hasta 2017 (Key Note, 2013).

Conforme a la información aportada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), durante el año 2013, el gasto alimentario total fue de 101.250 millones € el cual se ha incrementado en un 0,6%, rompiéndose la tendencia al descenso de los dos años anteriores. Del gasto total en alimentación un 68,4% corresponde al gasto en alimentación en el hogar. En Diciembre de 2013 el consumo de platos preparados en España fue de 556,8 millones de Kg, lo que representa un 2,25% del gasto alimentario total.



Durante el año 2013, cada español gastó en torno a 1.504,12 euros en productos de alimentación para consumo en el hogar. Dentro de este gasto, los platos preparados tienen una participación próxima al 3,3%, con un total de 48,2 euros per cápita.

El consumo de platos preparados se conforma como una partida alimentaria con una importancia relativa limitada, aunque presenta un elevado potencial de crecimiento (sirva apuntar que en 1987 el consumo per cápita de platos preparados se situaba en 2,6 kilos, en 1997 alcanzaba los 6,7 kilos, en 2005 se cifraba en 10,1 kilos, en 2011 llegó a 11,9 kilos y en mayo de 2014 ascendió hasta 12,2 Kg).

Según datos de 2012, los platos preparados congelados (20,7% del consumo total) destacan especialmente por el pescado (37% del consumo total en esta categoría) y la carne (24% sobre el total), puesto que la participación de vegetales y pasta es sensiblemente menor (17,5% y 12,6%).

Los platos preparados en conserva (11,7% del consumo total) consiguen su máxima representatividad en las conservas vegetales (sobre todo con legumbres) y en las conservas de carne (39,6% sobre el total de esta categoría), ya que las conservas de pasta y de pescado cuentan con una menor participación (12,9% y 2,9%, respectivamente).

Debido a su menor precio, las sopas y cremas consiguen un 35,3% de consumo, pero sólo un 11,4% del gasto. En los platos preparados en conserva (11,7% consumo y 14,9% gasto) y en los platos preparados congelados (20,7% consumo y 24,6% gasto) el efecto es distinto porque su precio relativo es más elevado.

En cuanto a productos concretos, la pizza aglutina el 26,4% del gasto y el 17,4% del consumo y, en consecuencia, resulta ser el alimento preparado más significativo.

El consumo de platos preparados está por encima de la media en los hogares donde hay jóvenes independientes, parejas jóvenes sin hijos, hogares monoparentales, adultos independientes y jubilados. Por contra hay un consumo per cápita inferior a la media en parejas con hijos pequeños, parejas con hijos mayores y parejas adultas sin hijos.

El estrato económico en el que se encuadra el hogar, y por tanto el nivel de ingresos, resulta determinante para el consumo de platos preparados. Así pues, los hogares de categoría baja consumen una cantidad notablemente inferior a la media. Sin embargo, los hogares de las categorías media y alta tienen un patrón de consumo de alimentos preparados con desviaciones positivas sobre la media (1,3 kilos y 3,1 kilos, respectivamente). La existencia de niños en el hogar se convierte en una circunstancia negativa para el consumo per cápita de platos preparados, sobre todo si son menores de 6 años, sin embargo, en los hogares con niños de entre 6 y 15 años hay una demanda superior a la media en platos preparados congelados, pizzas y tortilla refrigerada, mientras que sucede lo contrario en platos preparados en conserva y sopas y cremas. El tamaño de la familia se convierte en una variable importante para analizar las divergencias en el consumo per cápita de platos preparados. Los hogares con una y dos personas consumen, en términos per cápita, más alimentos preparados que la media, mientras que sucede lo contrario en los hogares compuestos por tres, cuatro o más personas. Por ejemplo, en los hogares con tres personas se consumen pizzas por encima de la media nacional, pero ocurre lo contrario con los platos preparados en conserva, congelados, sopas y cremas y tortilla refrigerada. El tamaño de la población repercute claramente sobre el consumo de platos preparados, de tal manera que conforme aumenta el número de habitantes de un municipio se advierte una mayor demanda per cápita. En las grandes ciudades se consume, por encima de la media, platos preparados en conserva, congelados, sopas y cremas, pizza y tortilla refrigerada. El hábitat de

residencia ofrece una conclusión similar a la variable anterior. Esto es, en el área metropolitana el consumo de platos preparados es superior a la media nacional y, por el contrario, en las áreas no metropolitanas está por debajo (Sheely, 2008).

Según publica el MAGRAMA (2015), la demanda de platos preparados también difiere por comunidades autónomas. Tomando como referencia el consumo medio (12,2 kilos por persona) y el gasto medio (48,2 euros por persona), Aragón, Cataluña, Comunidad Valenciana y Madrid están por encima de esas cifras medias, mientras que Andalucía, Asturias, Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla y León, Castilla-La Mancha, Extremadura, Galicia, Murcia, Navarra y País Vasco quedan por debajo de las mismas. La Rioja presenta un consumo per cápita por encima de la media (13,2 kilos), pero un gasto per cápita inferior (42,6 euros).

A nivel internacional, la tendencia creciente del consumo de platos preparados en España es menor que en otros países como Reino Unido o Estados Unidos. Según algunas fuentes, el 50% de los británicos consume comida precocinada al menos una vez a la semana. En el ranking europeo, el mercado español se sitúa en un nivel medio en cuanto al desarrollo del sector de platos preparados.

Según publica Monje (2015) el segmento de V gama representaría el 11,1% de los productos que se comercializan en el lineal, según los datos aportados por la consultora IRI ([www.iriworldwide.es](http://www.iriworldwide.es)). Aunque se trata de un porcentaje ligeramente inferior a la contabilizada el año pasado, la V gama mejoró levemente tanto en volumen como en valor. Según la consultora IRI, los supermercados comercializaron 8.815 Toneladas (+1%) y facturaron de 29,22 millones de euros (+1,8%). Cabe destacar que las principales referencias analizadas son: maíz, patata y remolacha cocida, pimientos asados y algunos platos con bases de verduras, entre otros.

Parece claro que los supermercados (incluyendo los establecimientos de descuento) e hipermercados son los formatos que comercializan mayoritariamente platos preparados (conjuntamente alcanzan una cuota de mercado del 86,2%), mientras que el comercio especializado o establecimientos tradicionales (6%) y otras fórmulas comerciales (7,8%) resultan menos relevantes. En esta familia de productos conviene destacar la repercusión que tiene la venta domiciliaria, porque llega a alcanzar una cuota de mercado representativa para el conjunto de alimentos preparados (en otros platos preparados congelados y en congelado vegetal las participaciones son especialmente significativas, 10% y 4%, respectivamente).

Las marcas del distribuidor tienen una presencia desigual en este segmento de mercado debido a la notable variedad de productos ofertados. Pueden citarse dos ejemplos: por un lado, en el caso de los platos preparados deshidratados, las marcas del distribuidor tienen una participación reducida y, además, la diferencia de precios entre marcas del distribuidor y marcas del fabricante no es muy elevada; por otra parte, en los platos preparados congelados se observa que la marca del distribuidor tiene una presencia más significativa y el diferencial de precios con la marca del fabricante es notablemente mayor (MAGRAMA, 2012).

Los platos preparados a base de pastas son una de las grandes ofertas de platos preparados en el mercado internacional y cubren una amplia variedad de productos creados siguiendo las costumbres locales y tradicionales (Carini y col., 2013).

La mayoría de los platos preparados a base de pasta disponibles en el mercado están congelados, refrigerados o estabilizados y generalmente requieren un calentamiento antes de su consumo. El mercado de comidas a base de pastas *Ready to eat* siempre está tratando de proporcionar un valor añadido para los consumidores, ya sea mediante el

desarrollo de productos "saludables" (por ejemplo, productos vegetarianos, el uso de grano entero, bajo en sodio) o mediante la reducir el tiempo de preparación, la selección de nuevos envases para facilitar el consumo (Carini y col., 2013)

Las comidas de pasta listas para el consumo se producen generalmente mediante el ensamblaje de pasta y salsa y sometidos a una cocción (ya sea por separado o juntos) y un proceso de estabilización. En los últimos años, con el objetivo de extender la vida útil de estos productos, así como para mejorar su calidad, las nuevas tecnologías se han aplicado por la industria, como, por ejemplo, la tecnología de microondas que permite cocinar de forma simultánea y esterilizar el producto. (Carini y col., 2013).

Aunque los consumidores prefieren alimentos con tiempos de preparación cortos, también hay una gran preocupación por la necesidad de una dieta saludable, lo que impulsa a los consumidores a demandar alimentos más sanos y naturales, libre de aditivos químicos (Jackson y col., 2002).

En otro orden, según Martínez (2011), las tendencias de consumo de las recetas a base de pasta y/o arroz demostraron en el último periodo de 2010 un aumento de la marca de distribuidor (MDD) en volumen cifrada en el 9%, con un 8,2% en valor. Su cuota en ambos mercados se sitúa por encima del 70% y acaricia el 80% (77,5%) en volumen para la campaña de 2011. Estas recetas movieron en el último periodo 8.616 Tn, tras crecer un 7%, para un valor de 53,8 M€(+7,2%). Parece obvio, por tanto, que lo que se mantuvo inmóvil en el pasado periodo fue precisamente el precio (€/kg) de los productos de distribuidor, estableciéndose en ambos periodos en 5,7 €/kg. Dentro del mercado de comida de frío positivo, la marca de distribuidor consiguió subir un 10,4%, hasta mover 356,4 M€por la comercialización de 89.273,6 t (+12,9%).

Desde el punto de vista marquista, y teniendo en cuenta los datos correspondientes a base de pasta y arroz, Gallo ocupa la primera posición, con el 8,3% del mercado en valor (6,8% si hablamos en términos de toneladas), si bien pierde representatividad con respecto a años anteriores, al igual que Noel o Terbeke. Nos hallamos ante un mercado donde la marca de distribuidor sigue avanzando aunque a ritmos algo más sosegados, cuyo empuje tratan de combatir las primeras marcas con nuevos lanzamientos, eso sí algo ralentizados con respecto a tiempos precedentes (Alimarket, 2011).

Dentro de esta amplia gama de productos en el sector de platos refrigerados, otro producto que destaca es el gazpacho, que representa el 23% de la distribución en España (Magrama 2012). El gazpacho es una mezcla de productos vegetales frescos: tomate, cebolla, pimientos, pepino, ajo, junto con aceite, vinagre o limón y, en su caso, pan, batidos. Esta preparación se enmarcaría dentro del ámbito legal de comida preparada de acuerdo a la definición que recoge el Real Decreto 3484/2000, anteriormente citado.

La Subdirección General de Planificación y Control Alimentarios, del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, confirma que no existe legislación específica sobre el uso del término “gazpacho”. No obstante, indica que se trata de una denominación consagrada por el uso con arreglo a su composición y características.

El gazpacho no logró superar el último periodo de 52 semanas de subidas continuadas, según recoge el último Informe Sectorial publicado por Alimarket (Julio 2014). De esta manera, la categoría de gazpacho y cremas refrigeradas registró un descenso del 2% en valor y del 2,6% en volumen, tal y como reflejan los datos aportados por la consultora IRI para el periodo referido. Dentro de la misma, la evolución de las cremas, purés y sopas refrigeradas ha sido más desfavorable, con caídas en torno al 20%. En estas últimas, la marca de distribución inició en 2013 su retirada, contando únicamente con

una mínima participación en las referencias de purés. En gazpacho, por el contrario, elevó sus volúmenes y precios, con lo que aglutinó más del 45% de los litros consumidos y aportó más de la mitad de los ingresos, en este sector (Casado, 2014).

Pese a esta negativa evolución, el gazpacho continúa atrayendo nuevos fabricantes. Después de las llegadas en 2013 de Eurobanan y Primaflor, cuyo balance del primer año resulta positivo, el mercado ha recibido nuevas enseñas, como 'San Flavino', de Bonnysa Agroalimentaria, e 'Invo', del fabricante de zumos naturales Invo Products. Las marcas con mayor trayectoria en el segmento, por su parte, han lanzado novedades, aunque en menor medida que años previos, y trabajan en la búsqueda de nuevos mercados para retornar al crecimiento. Entre ellas, Biosabor, Alimentaria Andarax o Bo de Debò, que han ampliado su oferta y han extendido su radio de acción.

### **1.1.3. LEGISLACIÓN APLICABLE**

Como referencia en la formulación y procesado de los alimentos desarrollados en esta tesis se ha utilizado el *Real Decreto 512/1977, de 8 de febrero, de Presidencia por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de platos preparados (precocinados y cocinados)*. Esta orden trata sobre reglas esenciales de higiene en las Industrias Agroalimentarias, más comúnmente denominadas " Método del 5M". El 5M reagrupan el Medio, el Material, la Mano de obra, la Materia y el Método. Estas cuatro primeras nociones son aplicables a numerosos productos alimenticios (anexo 8). En cambio, el Método, definido como la organización de los procedimientos de fabricación del producto (a partir de la entrada de las materias primas a la empresa hasta el consumo del producto terminado), es específico a los productos de V gama. Está basada en el respeto de todas las reglas de limpieza, de los controles microbiológicos impuestos a los productos, sobre la

continuidad de la cadena del frío así como sobre la adaptación de los tratamientos térmicos a los productos. Estos tratamientos varían con arreglo al pH del vegetal con el fin de evitar toda contaminación. En efecto, los frutos tienen un pH comprendido entre 2 y 4,5 y ninguna bacteria es susceptible de desarrollarse en ese intervalo de pH. Por lo tanto, no es necesario tratar los frutos a una temperatura superior a 100°C. En cambio, las verduras tienen un pH comprendido entre 5 y 7,5. Las formas esporuladas están presentes a pH superiores a 4,5 y una temperatura de hasta 120°C. Son destruidas, según su origen, a 120°C ± 20°C. Observando un desarrollo de microorganismos en un pH superior a 4,5 y un no desarrollo en un pH inferior a 4,5, caracterizamos el pH 4,5 como una barrera. Teniendo en cuenta que los productos ácidos no son bacteriológicamente tóxicos y los muy ácidos pueden ser esterilizados entre 80 y 100°C.

Todas las formas vegetativas son destruidas entre 65 y 100°C: levaduras, mohos y bacterias no esporuladas. Las levaduras y los mohos se desarrollan sobre productos vegetales de pH entre 2 y 7. Además, otro elemento clave del método no puede ser descuidado: la duración de conservación del producto de V gama. Esta está definida por tres tipos de fecha límite: La fecha límite de consumo o DLC, la fecha límite de venta o DLV. El DLV es el DLC menos un día y la fecha límite de utilización óptima o DLUO. El DLUO es un consejo dado por el fabricante; es utilizada para plazos de conservación superiores a 42 días.

La duración de conservación es determinada con arreglo a dos factores interdependientes: El nivel o la calidad microbiológica de origen del producto, a saber principalmente su madurez, la temperatura de conservación del producto en el momento de su transferencia, en el momento de su transporte y en el momento de su almacenamiento. Esta temperatura está considerada como un estado pasajero y no como



un tratamiento. La duración de conservación debe asegurar una seguridad alimenticia absoluta para el consumidor hasta el límite preconizado por el fabricante.

Las comidas preparadas cumplirán además las normas microbiológicas del *Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas*. Este Real Decreto ha sido modificado por *Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios*. (B.O.E. 25.02.2010).

Otra legislación aplicable a la producción y comercio de platos preparados es la que se comenta a continuación:

*Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.*

*Real Decreto 1109/1991, de 12 de julio, por el que se aprueba la Norma General relativa a los alimentos ultracongelados destinados a la alimentación humana.*

*Real Decreto 1254/1991, de 2 de agosto, por el que se dictan normas para la preparación y conservación de la mayonesa de elaboración propia y otros alimentos de consumo inmediato en los que figure el huevo como ingrediente.*

*Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor.*

*Real Decreto 2001/1995, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización*

*Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos.*

*El Real Decreto 2452/1998, de 17 de Noviembre de 1998, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, distribución y comercio de caldos, consomés, sopas y cremas. (B.O.E. 24.11.1998). Este Real Decreto ha sido modificado por Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios.*

*Real Decreto 2181/1975, de 12 de Septiembre de 1975, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de pastas alimenticias. (B.O.E. 13.09.1975). Modificado por: Real Decreto 1771/1976, de 2 de julio. (B.O.E. 28.07.1976). Real Decreto 2811/1983, de 13 de octubre (B.O.E. 11.11.1983). Real Decreto 1093/87, de 19 de junio (B.O.E. 08.09.1987). Corrección de errores (B.O.E. 13.9.1989). Real Decreto 1534/1991, de 18 de octubre (B.O.E. 30.10.1991).*

*Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios.*

*Reglamento 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación*

*alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.*

*Reglamento (CE) n° 2023/2006 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.*

Los envases utilizados para mantener estas comidas también se ajustarán a las disposiciones vigentes recogidas en el *Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos.*

*Reglamento (UE) n° 1282/2011 de la Comisión, de 28 de noviembre de 2011, por el que se modifica y corrige el Reglamento (UE) n° 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimento*

*Reglamento (UE) n° 1183/2012 de la Comisión, de 30 de noviembre de 2012, por el que se modifica y corrige el Reglamento (UE) n° 10/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos*

*Real Decreto 2483/1986, de 14 de noviembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria sobre condiciones Generales de transporte terrestre de alimentos y productos alimentarios a temperatura regulada.*

*Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Este reglamento ha sido modificado por Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007, sin embargo esta modificación no afecta a platos preparados.*

En abril del año 2014 se publica la Norma UNE 167014 en respuesta a las necesidades de la industria agroalimentaria y, en concreto, de las empresas que emplean el sistema de la denominada línea fría, incidiendo en los procedimientos que afectan a la seguridad alimentaria así como unificando los modelos, a la vez que actualiza los conocimientos, permitiendo que la industria alimentaria alcance un alto nivel.

El objetivo de esta norma es establecer los requisitos y recomendaciones para la calidad, seguridad alimentaria, y los procedimientos operativos en línea fría para operadores que participen en la producción de platos elaborados y/o tratamiento en centro de destino. Esta Norma UNE 167014 incide en las directrices con respecto a la planificación de la producción, procesos de compras, recepción y almacenamiento de productos, requisitos previos a las preparaciones, preparaciones previas a la elaboración, elaboración de platos, proceso de envasado, vida útil, proceso de almacenamiento de platos elaborados y transporte y tratamiento en los centros de destino.

La Norma UNE 167014 se une a la lista de normas ya existentes que, como la Norma ISO 22000 Sistema de Gestión de Seguridad Alimentaria, surgen para aportar soluciones prácticas a las necesidades de las empresas del sector agroalimentario y permitir que avancen a la misma velocidad que el mercado y las expectativas, exigencias y necesidades de los consumidores.

## **1.2. ALTERACIÓN Y VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS DE V GAMA**

Las condiciones utilizadas para procesar y almacenar alimentos pueden influenciar adversamente a los atributos de calidad de los alimentos.

Durante el almacenamiento uno o más atributos de calidad pueden llegar a un estado indeseable. En este instante, el alimento es considerado inadecuado para su consumo y

se dice que ha llegado el fin de su vida útil. La vida útil de un alimento se define como “Periodo en que un alimento puede mantenerse sin alteración de su calidad organoléptica, nutritiva y sanitaria antes de comenzar su deterioro bajo determinadas condiciones de almacenamiento “(CAE, 2013). Los factores que afectan a la vida útil son el *tipo* de alimento, las *condiciones de almacenamiento* después de la cosecha, transporte, venta y distribución, *higiene* del alimento; *procesado* del alimento (intensidad y tipo de proceso) y la *permeabilidad* del envase.

Las principales causas de la alteración de los alimentos pueden ser de naturaleza física, química o biológica (Bello, 1998). Las causas físicas pueden aparecer durante la recolección, manipulación, preparación o conservación de los alimentos (Puede también ocurrir una pérdida de agua cuando el alimento se encuentra en un ambiente higrométricamente seco). Por lo general, se traduce en pérdidas de peso y en variaciones de las características específicas del alimento pero no perjudican por sí solas a la comestibilidad del mismo (Kang, 2006).

Bajo determinadas condiciones ambientales cabe la posibilidad de que se originen reacciones químicas y enzimáticas (Karbowski y col., 2007), oxidaciones de lípidos, que dan lugar a enranciamiento de las grasas y pueden implicar destrucción de vitaminas; desnaturalización de proteínas, con pérdida de solubilidad (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2003), retrogradación del almidón, con modificaciones de la textura (Moritz y col., 2005), siendo las dos reacciones químicas particularmente importantes el pardeamiento no enzimático (Sapers y col., 2002). La oxidación es impulsada por la concentración de oxígeno en contacto directo con el producto alimentario (Richardson y Finley, 1985). La oxidación química de los alimentos provoca la degradación perjudicial del sabor, aroma, y color de los productos alimenticios. La oxidación

enzimática de los alimentos, catalizada por la lipoxigenasa y oxidasa, puede causar una rápida degradación en la calidad del producto (Shahidi y Cadwallader, 1997), reduciendo el valor nutritivo del alimento y formando compuestos volátiles que producen olores y sabores desagradables (Azhar y Nisa, 2006).. En general el término rancidez se utiliza para describir los diferentes mecanismos por los cuales se alteran los lípidos. El grado de deterioro depende del tipo de grasa o aceite (Platek y col., 1999).

Pero las causas biológicas son, sin duda, las más importantes y las más perjudiciales en el deterioro de los alimentos (Lunger y col., 2007). Éstas, a su vez, se pueden subdividir en causas enzimáticas, parasitarias y microbiológicas (Samadpour, 2005).

Las causas enzimáticas se deben a la acción de enzimas propias del alimento. Las plantas y los animales tienen sus propias enzimas, cuya actividad, en gran parte, sobrevive a la recolección y al sacrificio, intensificándose con frecuencia a partir de ese momento, debido a que las reacciones enzimáticas son controladas y equilibradas con mucha precisión en la planta o en el animal que vive y funciona normalmente. Pero este equilibrio se rompe cuando el animal es sacrificado o la planta recolectada. Si estas enzimas no son inactivadas, siguen catalizando reacciones químicas en los alimentos, siendo algunas de éstas deseables, como la maduración de algunas frutas después de la cosecha y el ablandamiento natural de la carne, pero más allá del límite óptimo, estas reacciones llevan a la descomposición de los alimentos y los tejidos debilitados son atacados por infecciones microbianas (Arai y col., 2006).

El proceso de deterioro de naturaleza microbiana es un fenómeno variable, dado que está condicionado por el tipo y número de especies microbianas presentes, influenciado a su vez por la composición química del sustrato y de las condiciones de conservación,

sobre todo la temperatura y la presencia o ausencia de oxígeno, siendo éstas las alteraciones más frecuentes y más graves en los alimentos (García-Linares y col., 2004).

Según las condiciones de vida y naturaleza, los microorganismos se dividen en los siguientes grupos, bacterias, levaduras y mohos (Yang y col., 2006). Todos ellos utilizan sustancias contenidas en los alimentos para obtener energía necesaria en sus procesos vitales, originando productos metabólicos de muy distinta índole, pudiendo ocasionar graves trastornos para la salud (Ilbaeck y Friman, 2007).

Dada la gran diversidad de materias primas utilizadas en la elaboración de platos preparados, existe un riesgo elevado de presencia de flora indeseable muy variada, razón por la que se impone el control de cada una de ellas (Zeng y col., 2007).

Las numerosas operaciones de preparación del plato preparado pueden suponer un aporte de contaminación microbiana si no se toman medidas de manipulación higiénica o se utiliza un material convenientemente limpio, entre estas operaciones se encuentran las de cortado, pelado, etc. (Pascual y Calderón, 2000). Por el contrario, algunas de estas operaciones intermedias, como el escaldado, pueden contribuir a una mejora en la calidad microbiológica del elaborado antes de entrar en el proceso de tratamiento térmico, tras el cual el alimento debe ser sometido a un enfriamiento rápido (Murcia y col., 1999).

El crecimiento microbiano en alimentos da como resultado alimentos estropeados con desarrollo de características sensoriales indeseables y en ciertos casos los alimentos se vuelven peligrosos para su consumo.

La patogenicidad de ciertos microorganismos representa un peligro mayor en el procesado y manipulado de alimentos. Sobre la ingestión, los microorganismos como

especies de *Salmonella spp* y *Escherichia coli* causan infección, mientras que otros como *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* producen sustancias químicas en alimentos que son tóxicas para seres humanos. La botulina (toxina botulínica) es una toxina muy potente con un alto índice de mortalidad. La toxina alimentaria debido al *Staphylococcus* es más frecuente aunque no es tan grave como el botulismo. La presencia de mohos y su crecimiento en un producto alimentario pueden resultar apariencias indeseables y pérdida de sabores y aromas. Bajo ciertas condiciones favorables las esporas de mohos pueden también producir sustancias químicas que son tóxicas para el hombre. Durante el procesado y el almacenamiento de alimentos, hay que seguir procedimientos especiales para minimizar o prevenir la existencia de microorganismos (Pascual y Calderón, 1999).

Los factores que afectan al crecimiento microbiano son las propiedades intrínsecas del alimento, es decir, los nutrientes, el pH, la acidez total, la actividad de agua, la estructura, la presencia de conservantes y/o antimicrobianos naturales y el potencial redox. Los factores extrínsecos, como la temperatura ambiental, la humedad relativa, y la atmósfera gaseosa; los factores derivados de la elaboración, como el tratamiento térmico y el envasado y, finalmente, los factores implícitos, como las características fisiológicas, la velocidad de crecimiento del microorganismo y las interacciones microbianas (Man y Epel, 2004).

En relación a la conservación por frío, el CAE (2006), nos indica que es un procedimiento consistente en someter a los alimentos a la acción de bajas temperaturas, para reducir o eliminar las actividades microbianas y enzimáticas para mantener determinadas condiciones físicas y químicas del alimento que en el caso de la refrigeración deberá ser sin alcanzar las temperaturas de congelación. La temperatura de



refrigeración deberá mantenerse uniforme y sin cambios bruscos durante el período de conservación y ser la apropiada para cada tipo de producto.

En comparación con un producto que ha sufrido una elaboración tradicional o casera, los productos de V gama son, para los industriales, organolépticamente "muy aceptables". En efecto, algunos estudios demuestran que las diferencias gustativas entre los ambos son mínimas (Parry, 2012).

En cuanto a la textura, es delicado establecer una aproximación entre el alimento precocinado de V gama y el preparado de modo tradicional. En efecto, el primero sufre un tratamiento térmico más breve; su textura es obligatoriamente más crujiente. Al final, ésta dependerá del modo y del tiempo de cocción impuesto por el consumidor. Ciertas etapas del proceso son susceptibles de influir sobre el aspecto del producto, particularmente el color: es el caso del escaldado. Este primer tratamiento térmico posee la capacidad de conservar el color natural de la verdura. En cambio, los tratamientos térmicos propiamente dichos (pasteurización, esterilización) tienen sólo una influencia débil sobre este parámetro (Richardson y Finley, 1985).

En cuanto a los lípidos, un tratamiento térmico débil ya induce su oxidación y los ácidos grasos no saturados son afectados por el calentamiento (García-Linares y col., 2004). La ausencia de metal en los envases de los productos de V gama todavía limita la degradación de estos lípidos.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente se deduce que el acondicionamiento de un alimento en V gama no parece alterar la calidad nutricional más que en la cocción tradicional, sobre todo si ésta va precedida por un tiempo de almacenamiento de varios días o seguida de un recalentamiento antes del consumo.

La mayoría de estudios relacionados con la calidad de los platos preparados se enfoca únicamente en aspectos microbiológicos (Del Torre y col., 2004, Gombas y col., 2003, McAteer y col., 1995, y Tyrer y col., 2004). Esto es debido a que el aumento de la carga microbiana durante su almacenamiento en refrigeración es el factor limitante de la vida útil de los mismos (Singh y col., 2011). Aunque hay otros factores, tales como la frescura, la salubridad, la calidad física o sensorial, entre otros que tienen una influencia directa en la elección de los consumidores (Reed y col., 2000).

El proceso de producción de platos preparados generalmente se encuentra en áreas de estratégicamente localizadas que permitan una distribución logística eficientes. Esta localización se debe al alto valor intrínseco y el costo de la preparación de comidas preparadas, al igual que a la necesidad de maximizar su vida útil y acortar la cadena de transporte y almacenamiento refrigerado. Debido a su complejidad de preparación y el alto nivel de manipulación involucrados en su preparación, también son mucho más susceptibles al deterioro microbiológico. (Spencer, 2005).

Una práctica común empleada para evaluar la vida útil de un producto alimentario dado es determinar los cambios en las características de calidad seleccionadas durante un período de tiempo. Uno debe considerar la calidad de un alimento como una gran medida del deterioro alimentario ocurriendo en productos alimenticios. Sin embargo, debería ser reconocido que el término “calidad” abarca el significado de varios atributos o características de calidad. Desde el punto de vista del consumidor, la expectativa sensorial basada de la presencia (o ausencia) de características deseables (o indeseables) de un alimento dado determina la calidad de un producto. Por tanto, un producto alimentario destacado por su alta calidad tiene más características deseables.

Distintas técnicas empíricas o analíticas deben ser utilizadas para cuantificar los atributos de calidad de los alimentos, como, por ejemplo: enumeración de microorganismos, determinación de componentes químicos y el uso del análisis sensorial utilizando un panel de catadores, para controlar los cambios en las magnitudes de las características de calidad. Considerables investigaciones han estudiado la evaluación de la calidad de alimentos con el objetivo de determinar su vida útil (Van Arsdel et al., 1969; Labuza, 1982; Jul, 1984; Singh et al., 1986; Tabú and Singh, 1998). El uso de aproximaciones cinéticas químicas para cambios modelo en la calidad de alimentos fue sugerido por Kwolek y Bookwalter (1971). La aproximación cinética y la relación de Arrhenius que describe la influencia de temperatura en el constante grado de reacción fueron también promovidas por Saguy y Karel (1980). Lai y Heldman (1982) desarrollaron métodos para determinar el valor de la energía de activación de pérdidas de calidad alimentaria de datos de vida útil a temperaturas conocidas. Un método ayudado de ordenador para simular cambios en la calidad de alimentos durante el almacenamiento de alimentos congelados fue utilizado por Singh (1976). Wells y col.. (1987) discutieron una representación gráfica de una relación de histórico de temperatura y calidad alimentaria. Ross (1998) proporcionó una aproximación matemática para modelar la pérdida de calidad en alimentos durante el almacenamiento. Taoukis y col. (1997) proporcionaron ejemplos de modelos cinéticos de atributos de calidad para predicciones de vida útil en distintos platos preparados.

### **1.3. ESTRATEGIAS PARA PROLONGAR LA VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS DE V GAMA**

Tras los descubrimientos de Appert y Pasteur, la industria conservera americana fue, a principios del siglo XX y gracias a los avances en termobacteriología, el motor principal que impulsó la moderna Tecnología de los Alimentos. En la década de 1920, Bigelow, Esty y Meyer, en los laboratorios de la National Canners Association, estudiaron en profundidad los mecanismos de acción del calor sobre los microorganismos y la cinética de destrucción microbiana, sentando las bases de los actuales procesos de esterilización. En la década de 1940, Esselen demostró el orden logarítmico de destrucción de las vitaminas sometidas al calor y encontró que su cinética de destrucción presentaba características diferentes de la de los microorganismos, siendo menos sensibles que aquéllos a los tratamientos térmicos a elevadas temperaturas (Esselen y Plug, 1956).

A partir de este momento, el principal objetivo de la Tecnología de los Alimentos fue el desarrollo de instalaciones que permitieran la aplicación de tratamientos más cortos a temperaturas más elevadas. Así, el tratamiento en baños abiertos fue sustituido por los tratamientos en autoclaves estáticos y posteriormente dinámicos, y de los procesos discontinuos se pasó a los continuos que evolucionaron hasta llegar a los modernos procesos de esterilización, que permiten el calentamiento rápido de diversos productos envasados. La puesta a punto de las instalaciones de esterilización por inyección de vapor, junto con la aplicación de los métodos de envasado aséptico, ha permitido aplicar tratamientos térmicos a temperaturas elevadas durante tiempos muy cortos (HTST, UHT) a la mayoría de los alimentos líquidos.

La conservación de alimentos empezó con métodos tradicionales tales como el curado, salado o azucarado, que se desarrollaron antes de la aparición de la refrigeración. Los

avances más importantes en la conservación comercial de alimentos, se deben a la aparición de procesos tales como el enlatado y la congelación.

### **1.3.1. TRATAMIENTOS TÉRMICOS**

Bajo el título de tratamientos térmicos se suelen englobar todos los procedimientos que tienen entre sus fines la destrucción de los microorganismos capaces de alterar el producto o que pueden suponer un riesgo para el consumidor durante su vida útil. Cabe destacar dentro de éstos, la pasteurización y la esterilización.

Los objetivos principales que se persiguen al aplicar un tratamiento térmico a un alimento son destruir los microorganismos que puedan afectar a la salud del consumidor, destruir los microorganismos que puedan alterar el alimento, la inactivación enzimática y la optimización de factores de calidad a un coste mínimo (Downing, 1996).

El tratamiento térmico de un alimento depende de la termorresistencia de los microorganismos y enzimas presentes en el alimento, de la carga microbiana inicial, del pH, de su estado físico y de las cinéticas de inactivación de factores de calidad (color, vitaminas, etc.).

Los tratamientos térmicos se clasifican según la intensidad de los mismos en tratamientos de pasteurización y tratamientos de esterilización.

#### **Pasteurización**

Es el método que conserva los alimentos por inactivación de sus enzimas y destrucción de los microorganismos relativamente termosensibles (bacterias no esporuladas,

levaduras y hongos filamentosos), provocando cambios mínimos en el valor nutritivo y las características organolépticas del alimento (Fellows, 1994).

La intensidad del tratamiento térmico y el grado de prolongación de su vida útil se hallan determinados principalmente por el pH del alimento. El objetivo principal en los alimentos de baja acidez ( $\text{pH} \geq 4,6$ ), tal como los alimentos de V gama, consiste en la destrucción de la flora patógena y la reducción de la flora banal, para conseguir un producto seguro desde el punto de vista sanitario, aunque de corta conservación y almacenado en condiciones de refrigeración. Los productos de V gama pasteurizados, tras el enfriamiento rápido, son almacenados en cámaras frigoríficas 0 y 4°C.

En los alimentos de baja acidez este tratamiento térmico no permite una conservación tan prolongada como los alimentos de V gama esterilizados. Los productos de V gama pasteurizados únicamente se conservan en frío (entre 0 y 4/5°C) y gozan de una fecha de consumo mucho más corta, entre 21 y 42 días. Pero la pasteurización permite una mejor calidad organoléptica.

Para los alimentos ácidos ( $\text{pH} \leq 4,6$ ), el objetivo es conseguir una estabilización del producto que respete sus cualidades organolépticas, ya que no son necesarias altas temperaturas porque en medios ácidos no es posible el crecimiento de bacterias esporuladas (Kyzlink, 1990), permitiendo el almacenamiento a temperatura ambiente.

### **Esterilización**

Los alimentos de baja acidez ( $\text{pH} \leq 4,6$ ), entre los que se encuentran la mayoría de productos de V gama, necesitan un tratamiento energético, temperaturas a partir de 115°C, durante diversos tiempos, que sean suficientes para que la posibilidad de que

sobreviva el *Clostridium botulinum* sea muy pequeña. Los tiempos de vida útil son superiores a 6 meses (Fellows, 1994).

El principal objetivo de la esterilización de alimentos es la destrucción de los microorganismos, pero a la vez ocurrirán otros procesos. Unos son deseables como destrucción enzimática, ablandamiento de los tejidos etc., que pese a ello se deberán controlar para que no produzcan efectos excesivos y lleguen a afectar a sus propiedades físicas: color, forma, consistencia, etc. Otros son menos deseables pero inevitables en parte, como cambios sustanciales en su valor nutritivo y características organolépticas.

Las mejoras, en los procesos tecnológicos van encaminadas por tanto a reducir los efectos no deseados sobre los componentes nutritivos y las características organolépticas de los alimentos, reduciendo los tiempos de tratamiento.

Dada la complejidad de la acción de los tratamientos térmicos sobre los alimentos, será necesaria su optimización de forma que se obtengan en cada caso los resultados buscados. Por tanto, un tratamiento térmico debe ajustarse de forma que se consigan los resultados deseables y se minimicen los indeseables, lo que inevitablemente llevará a elegir unas condiciones que establezcan un compromiso entre unos y otros que conduzca a un resultado global satisfactorio.

### **1.3.2. TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS**

Aunque los tratamientos térmicos han sido la técnica más comúnmente aplicada para reducir la carga microbiana de los alimentos, estos tratamientos pueden deteriorar la calidad organoléptica y nutricional del alimento. Los tratamientos no térmicos permiten el procesado de alimentos a más baja temperatura que cuando son pasteurizados, y por tanto, sabor, nutrientes esenciales, y vitaminas no sufren cambios. Los alimentos pueden

ser procesados por tratamientos no térmicos como altas presiones hidrostáticas (Lakshmanan y Dalgaard, 2004), uso de antimicrobianos naturales (Jofré y col., 2008), irradiación (Cabeza y col., 2007), ultrasonidos (Knorr y col., 2004), filtración, y métodos eléctricos, tales como pulsos eléctricos y campos magnéticos oscilantes (Barbosa-Cánovas y col., 1998) y luz pulsada (Wang y col., 2005).

La tecnología de luz pulsada (PL) es un tratamiento no térmico aprobado por la FDA (FDA, 1996) que consiste en la emisión de destellos cortos de una luz de espectro de banda ancha (200-1100 nm). El efecto de descontaminación de PL se debe principalmente a los cambios fotoquímicos en ácidos nucleicos por UV-C, en combinación con daños fototérmicos y fotofísicos en las células debido a la vaporización del agua (Takeshita y col., 2003 y Gómez-López y col., 2007). Todos estos cambios se producen a un nivel superficial debido a la penetración de la luz limitada.

### **1.3.3. ENVASADO EN ATMÓSFERAS PROTECTORAS**

El envasado en atmósfera modificada (MAP) es la introducción de una atmósfera de gas, que normalmente está formada por un gas inerte, como el nitrógeno, combinado con un gas activo antimicrobiano, dióxido de carbono, en un producto alimenticio envasado para aumentar su vida útil y prolongar así el tiempo en la cadena de distribución.

La tecnología MAP proporciona una barrera adicional contra el deterioro, y por lo tanto puede mejorar la vida útil y la seguridad del producto. La tecnología MAP es barata, comparada con el resto de tecnologías no térmicas (Barbosa-Cánovas y col., 1998), fácil de aplicar, y adecuado para una amplia gama de maquinaria de envasado y producción



locales. Sin embargo, la fabricación y el transporte hasta el usuario final son procesos complejos y por tanto la tecnología MAP aporta sólo una solución parcial respecto a los problemas de incremento de vida útil. Una cadena de frío constante y una buena higiene en la fabricación siguen siendo fundamentales para mantener la eficacia del proceso de MAP (Brody, 1989).

Las tecnologías de envasado en atmósfera protectora (MAP) se aplican a multitud de productos de diversa naturaleza (vegetales, carnes, pescados, lácteos, etc.). Cuentan con una larga trayectoria en la conservación de determinados alimentos como los derivados cárnicos, el café y los snacks y resultan muy adecuados para los alimentos frescos y mínimamente procesados y los platos preparados (Alimarket, 2009).

El envasado en atmósferas modificadas es una de las formas de conservación más respetuosa con las cualidades organolépticas y nutricionales de los alimentos y suele aplicarse combinada con la refrigeración. La refrigeración, ralentiza las reacciones de alteración químicas y bioquímicas, limitando a su vez la proliferación de microorganismos (Singh y col., 2006); mientras que la modificación de la atmósfera, disminuye la tasa respiratoria del vegetal evitando su marchitamiento prematuro, controlando de este modo el pardeamiento al disminuir la presión parcial del oxígeno (Corbo y col., 2006).

Básicamente, existen dos formas de aplicar la atmósfera protectora: envasado al vacío o bajo gas. El envasado al vacío no es adecuado para ciertos productos que requieran oxígeno (carnes rojas) o ciertos tipos de envase. Cuando se envasa bajo gas, la atmósfera puede obtenerse reemplazando el aire con un gas o mezcla de gases, o bien generando la atmósfera dentro del propio envase de forma pasiva (la más utilizada para vegetales) o activa (empleando absorbentes de oxígeno). La sustitución del aire puede

hacerse por arrastre con gas, el cual se inyecta de forma continua y va diluyendo la atmósfera inicial, o bien por vacío compensado. En este segundo proceso, en primer lugar se aplica el vacío para eliminar el aire del interior del envase y a continuación se introduce el gas o mezcla de gases deseados (García y col., 2006).

En el envasado se emplean básicamente tres tipos de gases:  $N_2$ ,  $O_2$  y  $CO_2$ , que se combinan en distinta proporción a fin de obtener una atmósfera inerte ( $N_2$ ), semi-activa ( $CO_2/N_2$ ,  $O_2/CO_2/N_2$ ) o activa ( $CO_2$ ,  $CO_2/O_2$ ) (Kader y Ben-Yehoshua, 2000). El tipo de atmósfera y la proporción concreta de cada uno de los gases varía según el tipo de producto a conservar.

El nitrógeno es el gas más utilizado en atmósferas modificadas porque es el menos caro y el más disponible. Nitrógeno y dióxido de carbono son los gases más utilizados en atmósferas modificadas (Brody, 1989; Ooraikul y Stiles, 1991). Para un amplio rango de productos, concretamente refrigerados como carnes y comidas preparadas, el  $CO_2$  es mezclado con el nitrógeno para crear una atmósfera que inhibe el crecimiento microbiano, y la degradación bioquímica causada por la actividad microbiana (Boyd, 1997).

El dióxido de carbono actúa solubilizándose en agua, donde se disocia en ácido carbónico. El resultado es un descenso del pH que inhibe el crecimiento de la mayoría de microorganismos. El ácido carbónico también afecta a la membrana celular de los microorganismos y también inhibe la actividad enzimática. Una concentración del 20% de  $CO_2$  inhibe el crecimiento de mohos y de aerobios gran-negativos, pero es menos efectivo para el control de levaduras y bacterias ácido lácticas (Fierheller, 1991). Para platos preparados se recomienda una composición de 20-30% de  $CO_2$  y 80-70%  $N_2$  (García de Fernando y col., 2011).

Junto a la generación de una atmósfera determinada, es preciso controlar de forma estricta la temperatura. Como ya se ha comentado, su descenso ralentiza los procesos químicos de alteración, a la vez que se moderan los cambios fisiológicos; pero el control de la temperatura debe ser bastante preciso en cada tipo de producto, con el fin de evitar los daños causados por el frío. En este sentido, también se han diseñado sensores de temperatura que pueden incorporarse a los envases y conocer así su evolución en el tiempo.

Los productos de V gama pasteurizados, tras el enfriamiento rápido, son almacenados en cámaras frigoríficas 0 y 4°C. Su transporte está reglamentado porque, si los alimentos cocinados no son considerados como potenciales a riesgos sanitarios, las materias primas con las que se elaboran lo son. Esto se explica por el hecho de que los productos de V gama sufren un estrés cuando se han cortado, seleccionados, lavados, tratados térmicamente, envasados y cuando son vulnerables a los ataques microbianos. Cuando los productos deben ser distribuidos, son transportados en equipos especializados; los vehículos frigoríficos constan de una caja isotérmica y un grupo frigorífico. A lo largo del transporte frigorífico, la vigilancia y el rigor son indispensables. Antes y durante la carga, durante el trayecto y en la descarga, no está permitida una variación importante de temperatura del producto. Para eso, los profesionales deben respetar ciertas reglas prácticas de cuidados y hacer controles de temperatura regularmente. En el momento de la distribución, los productos de V gama siguen mantenidos a una temperatura entre 0 y 4°C. Finalmente, después de comprar un producto de V gama, el consumidor debe de conservarlo en el frigorífico con el fin de preservar las calidades requeridas de frescura y para que no sea el asiento de desarrollos microbiológicos (Fierheller, 1991).

García y col. (2006) publican la vida útil de algunos platos preparados envasados en atmósfera modificada siendo esta de 14 a 21 días para ensaladas de pasta y ensaladas de arroz, siempre que estén almacenadas a una temperatura de 0-4°C. Estos tiempos se reducen a 3-4 semanas para platos preparados de pasta fresca rellena de carne, queso o verduras, canelones o lasaña, almacenada también entre 0-4°C.

#### **1.3.4. SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS**

Tradicionalmente, para prevenir el deterioro de los alimentos y aumentar su vida útil, han sido empleados aditivos antioxidantes y conservantes que no han estado exentos de cierta polémica, relacionada con evidencias de potenciales efectos nocivos sobre la salud. El mito de lo natural triunfa en la sociedad actual, existiendo un interés creciente en los consumidores por la seguridad, calidad y beneficios saludables de los alimentos que ingieren, que asocian con frecuencia a la palabra “natural” o “sin conservantes” en el producto a adquirir.

El ácido ascórbico o (vitamina C), es el aditivo antioxidante más ampliamente utilizado en la industria alimentaria. Es una vitamina hidrosoluble presente en frutas y vegetales tales como los cítricos y las verduras frescas. Posee efecto antioxidante y captador de radicales libres. Se obtiene industrialmente por un conjunto de reacciones químicas y procesos microbiológicos. Actúa de dos formas, por un lado, consume el oxígeno del medio puesto que es un potente antioxidante, y por otro, reacciona con algunos productos intermediarios de la reacción de pardeamiento, desplazándola a la formación de otros compuestos que no presentan color. Se utiliza en productos cárnicos, conservas vegetales y en bebidas refrescantes, zumos, productos de repostería y en la cerveza, donde se emplea el ácido ascórbico para eliminar el oxígeno del espacio de cabeza. El uso alimentario de otros aditivos antioxidantes como el Butil-hidroxianisol (E-320) y

Butil-hidroxitolueno (E-321), ambos derivados del petróleo, ha sido restringido en algunos países como Japón, al comprobarse que pueden modificar la acción de ciertos carcinógenos (Fellows, 1994).

El creciente interés en la sustitución de aditivos sintéticos por aditivos naturales con actividad antioxidante, ha fomentado la investigación de materiales vegetales para la identificación de nuevos antioxidantes. Los fenoles son el mayor compuesto con actividad antioxidante, aunque también tienen otras propiedades como anticarcinógenos, antimutagénicos y antialérgenos.

La oxidación de las grasas y aceites de los alimentos es el factor responsable del enranciamiento del alimento con el consecuente descenso de la calidad nutricional. La adición de antioxidantes es necesaria para conservar el color y olor y evitar la pérdida de vitaminas.

La materia vegetal contiene muchos componentes con actividad antioxidante. Varias plantas han sido estudiadas como fuente potencialmente segura de antioxidantes para la industria alimentaria.

La protección que frutas y vegetales proporciona contra varias enfermedades se atribuye a varios antioxidantes, vitamina C, vitamina E,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, y compuestos fenólicos (Abushita y col., 1997; Aruoma, 1998).

Compuestos con importante actividad antioxidante se han encontrado en granadas (Ventura, J. y col., 2013), cítricos (Manach y col., 2004), en arándanos (Artemio Z. y col., 2014), piñas (Hossain, M. y col., 2011) y aceitunas (Piscopo, A. y col., 2014).

También se encontró alta actividad antioxidante en aceite de oliva (Mancebo-Campos, V. y col., 2014) además de en zumos de frutas (Tingting Ma, 2013). Otros estudios han

analizado la capacidad antioxidante de una amplia variedad de vegetales, en particular en el cacao, tomate, espinacas, legumbres o el pimentón. El té negro y verde han sido muy estudiados por sus propiedades antioxidantes, pudiendo contener hasta el 30% de su peso seco como compuestos fenólicos (Lin y col., 1998; Manach y col., 2004).

Residuos agrícolas e industriales son una atractiva fuente de antioxidantes, como las pieles de patata, los huesos de oliva, semillas de uva, que han sido estudiados como fuentes baratas de antioxidantes.

Debido a la amplia naturaleza de los residuos, existe una gran variedad de compuestos fenólicos. Moure y col. (2001) resume los principales compuestos fenólicos detectados en residuos agroindustriales de frutas, vegetales,...

La calidad de los extractos naturales y su actividad antioxidante, depende de la calidad de la planta original, del origen geográfico, de las condiciones climáticas y del almacenamiento (Hagerman y col., 1998).

Los extractos crudos de frutas, hierbas, verduras, cereales y otros materiales vegetales ricos en fenoles están generando interés en la industria de los alimentos debido a que retardan la degradación oxidativa de los lípidos, y por lo tanto mejoran la calidad y el valor nutricional de los alimentos. La importancia de los constituyentes antioxidantes de los materiales vegetales en el mantenimiento de la salud y la protección contra la enfermedad coronaria y el cáncer aumenta el interés de los elaborados de alimentos y de los consumidores. La tendencia se encamina hacia la preparación de alimentos con valores específicos para la salud (Kähkönen y col., 1999).

En últimos años, ha habido un creciente interés en productos fitoquímicos como nuevas fuentes de antioxidantes naturales y agentes antimicrobianos (Robards K, 2003). A la luz de la creciente globalización de la economía alimentaria hay más requisitos

necesarios para la extensión de la vida útil y la mejora de la seguridad de los productos alimenticios con el fin de acceder a mercados remotos. Tradicionalmente esto se ha logrado mediante la adición de agentes antimicrobianos y antioxidantes sintéticos, que va en desacuerdo con las demandas del consumidor de alimentos " frescos" como "mínimamente procesados" (Trindade y col., 2009). Por lo tanto, los fabricantes están considerando métodos naturales para combatir el deterioro de los alimentos y la calidad. En la actualidad hay un pequeño número de plantas antimicrobianas derivada y agentes antioxidantes comercialmente disponibles de los que el ácido rosmarínico es probablemente el más conocido. La aceptación comercial de estos agentes se ve obstaculizada por el hecho de que son relativamente caros en comparación con agentes sintéticos, lo cual es una consecuencia de la fuente de la que se cosechan. Por lo tanto una fuente barata y sostenible de estos agentes proporcionaría compuestos naturales de bajo costo con la capacidad de extender la vida útil de los productos alimenticios.

Los conservantes son los aditivos más utilizados en alimentación y quizás los de uso más justificado porque impiden que los alimentos se deterioren, prolongan su vida útil, mejoran su conservación y preservan sus propiedades, evitando que los microorganismos o los procesos de oxidación los alteren.

Actualmente en la industria alimentaria se están utilizando distintos compuestos químicos por sus propiedades antimicrobianas. El empleo de cloro como agente desinfectante está ampliamente extendido en la industria agroalimentaria, ya que mejora la seguridad y la vida útil de los vegetales frescos. A pesar de su efectividad en la reducción de la carga microbiana, su empleo tiene ciertos inconvenientes, debido a la posible formación de componentes carcinógenos clorados (Li y col., 2001; Martín-Diana y col., 2007). Además, diferentes organizaciones relacionadas con la protección de la salud y el medio ambiente, han expresado su preocupación por su empleo, debido

a la formación y acumulación de residuos químicos peligrosos en el agua de proceso, que se vierten al medio ambiente, o por generar compuestos perjudiciales para la salud como trihalometanos (THM) y cloraminas, considerados tóxicos para el hígado y el riñón (Graham, 1997). El efecto biocida de la solución de cloro en agua se debe al cloro disponible, presente como hipoclorito. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se dirige a las paredes celulares, las membranas, las enzimas metabólicas, el sistema de síntesis de proteínas y el material genético, por lo que estos ácidos son activos frente a una amplia gama de microorganismos.

Los conservadores químicos más ampliamente utilizados en los alimentos como agentes antimicrobianos son los benzoatos (como el benzoato sódico), sorbatos (como el ácido sórbico o el sorbato potásico) y los propionatos (como el propionato de sodio ó calcio). Además los ácidos acético y láctico se utilizan mucho para la conservación de alimentos ácidos, tales como encurtidos y salsas (Fellows, 1994). Los ácidos benzoico, sulfuroso y sus sales son ácidos débiles que actúan fundamentalmente en forma no disociada, como demostraron Rahn y Conn (1944) y Scardovi (1959). Von Schelhorn (1953), utilizó la expresión de "eficacia absoluta" para describir la efectividad de la fracción no disociada.

Por la toxicología de los conservantes químicos, la demanda de conservantes naturales alternativos ha aumentado. Entre ellos, los aceites esenciales de plantas (EOs) son de gran interés para su uso como conservantes naturales en los alimentos. La mayoría de los EOs son clasificados como Generally Recognized as Safe (GRAS).

Los sistemas antimicrobianos naturales se clasifican por su origen animal, vegetal y microbiano (Gaysinsky y Weiss, 2007; Gutiérrez y col., 2008; Patrignani y col., 2008; Ponce y col., 2008). El primero de ellos incluye proteínas, enzimas líticas (como



lisozima) e hidrolasas como lipasas y proteasas (Beuchat, 2001) y polisacáridos como el quitosano (Davidson y Zivanovic, 2003); el segundo grupo incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas y flores, ácidos orgánicos de frutos y fitoalexinas producidas en plantas (Beuchat, 2001); mientras que el tercero incluye compuestos producidos por bacterias ácido lácticas, principalmente. Los aceites esenciales son mezclas complejas de varios componentes (terpenos, sesquiterpenos y diterpenos) que pueden tener la siguiente naturaleza química: hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres acíclicos, ácidos, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos o lactonas (Fisher y Phillips, 2006).

En vegetales, podemos encontrar diferentes sustancias químicas con actividad antimicrobiana: flavonoides, tiosulfatos, glucosinolatos y saponinas. Las saponinas y flavonoides están presentes en frutas, verduras, frutos secos, semillas, tallos, flores, té, vino, propóleos y miel. Los tiosulfatos se obtienen a partir de ajo o cebolla mediante un proceso de extracción suave, presentando una fuerte actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas (Yoshida y col., 1999; Naidu, 2000; Kim y col., 2008). El brócoli, coles de bruselas, la col y la mostaza en polvo son fuentes importantes de glucosinolatos, compuestos con amplio espectro antibacteriano y antifúngico de efecto directo o sinérgico, cuando son aplicados en combinación con otros compuestos (Naidu, 2000; Tolonen y col., 2004; Almajano y col., 2008; Graumann y Holley, 2008; Gutiérrez y col., 2008).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios biosintetizados por el reino vegetal. Poseen uno o más anillos aromáticos con por lo menos un grupo hidroxilo. Entre ellos destacan: flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas, xantonas, ácidos fenólicos y fenoles simples, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanos, ligninas, etc. Por lo general, los compuestos fenólicos de EOs como los aceites extraídos

del limón, el aceite de oliva (oleuropeína), el aceite del árbol de té (terpenoides), naranja y bergamota, tienen efectos antimicrobianos de amplio espectro. Además, cada vez hay más datos relevantes sobre compuestos no fenólicos presentes en los aceites esenciales que son efectivos contra grupos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, obtenidos de orégano, clavo, canela, ajo, cilantro, romero y perejil, entre otros (Fisher y Phillips, 2006; Mandalari y col., 2007; Nguiefack y col., 2007; Kim y col., 2008; López-Lutz y col., 2008, El-Seedi y col., 2009).

El reemplazo de antioxidantes y antimicrobianos sintéticos por naturales tiene beneficios con respecto a la salud y su funcionalidad tales como su solubilidad en aceites y agua, de interés para emulsiones y productos alimenticios. La demanda de uso de tales compuestos ha supuesto un claro aumento de los estudios de extractos naturales que provienen de plantas, residuos agrícolas y de las industrias de procesado de alimentos (Moure y col., 2001; Cruz y col., 2007).

#### **1.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NATURALES A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Para la obtención de compuestos naturales que sustituyan a aditivos artificiales se están evaluando las posibilidades que ofrecen los subproductos agroindustriales, que además de ser un problema para la industria alimentaria, nos permitirían obtener compuestos de elevado valor añadido a un coste competitivo.

La inmensa producción de residuos que supone la normal actividad del hombre sobre nuestro planeta es uno de los principales problemas con los que nos encontramos en la actualidad. Estos residuos provocan una progresiva degradación de nuestro entorno que puede llegar a ser, en algunos casos, irreversible. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de procesos que permitan la eliminación controlada de los mismos (Ayuso, 2014).

Algunos de estos residuos, procedentes de todo tipo de industrias y actividades, no deben ser eliminados sin más, ya que podrían ser utilizados para diversas aplicaciones. Los residuos agrícolas e industriales son una fuente atractiva de antioxidantes naturales. Se han estudiado los residuos de piel de patata (Kanatt y col., 2005), alpechines (Visioli y col., 1999), pepitas de uva (Yamaguchi y col., 1999; Jayaprakasha y col., 2001; Jayaprakasha y col., 2003;) y bagazo de vino y pieles de uva (Larrauri y col., 1998; Louli y col., 2004; Shaker, 2006). Se han identificado distintos compuestos polifenólicos en sustratos tales como bagazo de manzana (Lu y Foo, 1999), semillas y pieles de cítricos (Bocco y col., 1998), serrín (Pinelo y col., 2004), residuos de pulpa de zanahoria (Chen y Tang, 1998), hojas viejas de té (Farhoosh y col., 2006), subproductos del coco (Azizah y col., 1999), residuos no volátiles del aceite esencial de naranja (Vargas-Arispuro y col., 1998), residuos de aceites de semillas (Matthaeus, 2002) y melazas de soja (Hosny y Rosazza, 1999).

Además de estos materiales, existen diversas corrientes líquidas que pueden emplearse como fuente de compuestos antioxidantes, bien las generadas durante el procesamiento de los materiales vegetales anteriormente indicado o bien las resultantes del procesamiento ácido en condiciones suaves (<5 % ácido) de materiales lignocelulósicos. Estas corrientes líquidas o hidrolizados contienen, además de los azúcares hemicelulósicos presentes, bien como monómeros o como oligómeros, compuestos derivados de la degradación de los azúcares (furfural, hidroximetilfurfural), ácido acético, extractos y compuestos fenólicos con actividad antioxidante. Estos compuestos fenólicos proceden de la descomposición de la lignina soluble en ácido (Garrotey col., 2003).

Por ello, es necesario plantear la búsqueda de utilidades alternativas de estos residuos y no sólo su eliminación efectiva e inocua, debido a que esta posibilidad además de evitar

trastornos medioambientales, crea nuevas fuentes de riqueza que aportan una mayor rentabilidad al proceso industrial de partida. Además, se ha de tener en cuenta que una rentabilización de la gestión de los residuos generaría nuevas industrias de todo tipo, con las consiguientes ventajas sociales que ello reportaría.

Sin embargo, es un hecho evidente que, a pesar de todas estas ventajas de tipo económico, social medioambiental, etc. que ocasionaría el aprovechamiento industrial de los residuos, estas no se corresponden con el nivel de investigación y desarrollo existente en este campo, tanto a nivel mundial como particularmente en España. Esto es debido a que los posibles desarrollos que se puedan producir en este subsector exigen asumir riesgos técnicos y económicos por parte de los agentes industriales interesados en ellos, lo que hace necesario un estudio de viabilidad previo a la implantación. Existen unas directrices básicas para el aprovechamiento de los residuos orgánicos. De acuerdo con Lipinski (2013), existen dos estrategias posibles para el aprovechamiento de la biomasa residual. La primera de ellas consiste en desarrollar, a partir de ella, derivados que podamos insertar en las cadenas de producción y mercados ya existentes. La segunda implica el desarrollo de nuevas tecnologías de aprovechamiento del propio subproducto como tal. Basándonos en estas dos estrategias pueden considerarse cinco directrices básicas: obtención de energía, obtención de productos químicos, devolución a la producción agraria, utilización en la alimentación ganadera y utilización en la alimentación humana.

Todo lo anteriormente expuesto, ha hecho que se dedique un considerable esfuerzo hacia la búsqueda de nuevas fuentes de alimentación y que parte de dicho esfuerzo se haya encaminado hacia el mejor aprovechamiento de los subproductos derivados de la industria de la alimentación. Para ello es necesario el conocimiento de todos aquellos

principios activos que afecten al valor nutritivo del producto necesitando métodos de extracción eficientes capaces de garantizar la estabilidad de los compuestos fenólicos.

#### **1.4.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN CONVENCINALES**

Los compuestos bioactivos a partir de materiales de plantas se pueden extraer por diversas técnicas de extracción clásicas. La mayoría de estas técnicas se basan en la potencia de extracción de diferentes disolventes o mezcla y la aplicación de calor. A fin de obtener compuestos bioactivos de las plantas, las técnicas clásicas existentes son: extracción Soxhlet, maceración e hidrodestilación.

La extracción Soxhlet fue propuesta por primera vez por el químico alemán Franz Ritter Von Soxhlet (1879). Fue diseñado principalmente para la extracción de lípidos, pero ahora no se limita sólo a esto. La extracción Soxhlet ha sido ampliamente utilizada para extraer valiosos compuestos bioactivos de varias fuentes naturales. Se utiliza como un modelo para la comparación de nuevas alternativas de extracción.

La maceración general consta de varios pasos. En primer lugar, se realiza la molienda de la planta en partículas pequeña para aumentar el área superficial. En segundo lugar, se añade un disolvente apropiado y se mantiene durante un tiempo determinado. Ocasionalmente se agita la mezcla para aumentar la maceración. A continuación se filtra la mezcla, quedando por un lado un residuo sólido de proceso de extracción y recuperando gran cantidad de los sólidos ocluidos.

La hidrodestilación es un método tradicional para la extracción de compuestos bioactivos y aceites esenciales de plantas. Los disolventes orgánicos no están involucrados y puede ser realizado antes de la deshidratación del material vegetal. Hay

tres tipos de hidrodestilación: destilación en agua, destilación con agua y vapor y destilación directa de vapor (Vankar, 2004).

En la hidrodestilación, se adiciona una cantidad suficiente de agua y se lleva a ebullición. A continuación, se inyecta vapor directo en la muestra. El agua caliente y el vapor actúan liberando los compuestos bioactivos de tejido vegetal. El vapor se condensa, recogiendo la mezcla de vapor de agua y aceite. La mezcla condensada fluye desde el condensador a un separador, donde compuestos bioactivos se separan automáticamente del agua (Silva y col., 2005). Implica tres principales procesos físico-químicos; hidrodifusión, hidrólisis y descomposición por calor. A una temperatura alta de extracción, puede haber pérdidas de algunos componentes volátiles. Este inconveniente limita su uso para termo extracción de compuestos termolábiles.

La eficiencia de la extracción de compuestos bioactivos por cualquier método convencional depende principalmente de la elección del disolvente (Cowan, 1999). La polaridad del compuesto objetivo es el factor más importante para la elección del disolvente. La afinidad molecular entre disolvente y soluto, la transferencia de masa, el uso de un co-solvente, la seguridad ambiental, la toxicidad y la viabilidad financiera también se debe tener en cuenta en la selección del disolvente para la extracción de compuestos bioactivos.

#### **1.4.2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN NO CONVENCIONALES**

Los principales métodos de extracción convencional necesitan largos tiempo de extracción, y requieren disolventes costosos y de alta pureza, la evaporación de la enorme cantidad de disolvente, baja selectividad de extracción y la descomposición térmica de compuestos termolábiles (Luque de Castro y García-Ayuso, 1998). Para

superar estas limitaciones de los métodos de extracción convencionales, se han introducido nuevos métodos de extracción, llamados no convencionales.

Algunos de los métodos más prometedores son la extracción por ultrasonidos, extracción enzimática, extracción por microondas, campo eléctrico pulsado, extracción por fluidos supercríticos y subcríticos.

Algunas de estas técnicas se consideran “técnicas verdes”, ya que cumplen con las normas establecidas por la Environmental Protection Agency de Estados Unidos, estos métodos incluyen productos químicos menos peligrosos, el diseño de los productos químicos más seguros, mejor eficiencia energética y uso de materias primas renovables.

El ultrasonido es un tipo especial de ondas sonoras, de frecuencia entre 20 kHz a 100 MHz. Al igual que otras ondas, pasan a través de un medio creando una compresión y expansión. Este proceso produce un fenómeno llamado cavitación, que produce la creación y colapso de las burbujas. Se produce una gran cantidad de energía debido al calentamiento del contenido de la burbuja. Según Suslick y Doktycz (1990), las burbujas tienen temperatura de aproximadamente 5000K, una presión de 1000 atm y una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 1010K/s. Únicamente los líquidos y líquidos que contienen materiales sólidos tienen efecto de cavitación. Por tanto se puede observar una lixiviación de compuestos orgánicos e inorgánicos de la matriz vegetal (Herrera y Luque de Castro, 2005). El mecanismo de extracción por ultrasonido implica la difusión a través de la pared celular y enjuagar el contenido de la célula después de romper las paredes. Los factores que influyen en la eficacia del proceso son, el contenido de humedad de la muestra, el grado de molienda, el tamaño de partículas, la temperatura, la presión, el tiempo de aplicación y la frecuencia (Mason y col., 1996).

La técnica de campo eléctrico pulsado está basada en la destrucción de la membrana celular. Durante la aplicación del campo eléctrico pulsado, un potencial eléctrico pasa a través de la membrana de la célula viva. Basándonos en la naturaleza bipolar de las moléculas de la membrana, el potencial eléctrico separa las moléculas de acuerdo con su carga en la membrana celular. A partir de aproximadamente 1 voltio de potencial, se produce repulsión entre la carga de las moléculas, formando poros en las áreas débiles de la membrana y provocando un aumento de la permeabilidad (Bryant y Wolfe, 1987). Esta técnica consiste en una cámara con dos electrodos, donde se col.oca el material vegetal. Dependiendo del diseño del equipo la operación puede ser continua o por lotes. La eficacia del proceso depende de los parámetros de proceso, como la fuerza del campo eléctrico, energía, número de pulsos, temperatura de tratamiento y propiedades de la muestra (Heinz y col., 2003). Algunos compuestos bioquímicos en la plantas están dispersos en el citoplasma celular y otros son retenidos en los polisacáridos de la lignina con uniones con hidrógeno o hidrofóbicas, los cuales no son accesibles con procesos de extracción con disolventes. Los tratamientos con enzimas específicas como la celulasa,  $\alpha$ -amilasa, y pectinasa aumenta la extracción por rotura de la pared celular, e hidroliza la estructura de polisacáridos y lípidos (Rosenthal y col., 1996; Sing y col., 1999). Este método de extracción ha sido desarrollado principalmente para la extracción de aceite de las semillas (Hanmoungjai y col., 2001; Rosenthal y col., 2001; Sharma y col., 2002). Los aceites extraídos con enzimas contienen mayor cantidad de ácidos grasos y fósforo que los extraídos por métodos convencionales (Dominguez y col., 1995).

Las microondas son campos electromagnéticos con una frecuencia entre 300MHz y 300GHz. El principio de calentamiento por microondas está basado en su impacto directo con el material polar (Letellier y Budzinski, 1999). La energía electromagnética

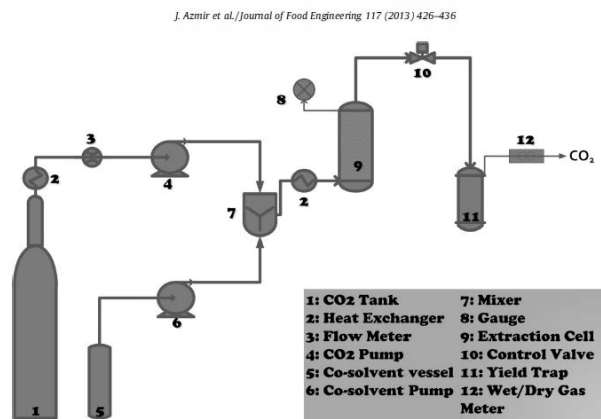


se convierte en calor siguiendo una conducción iónica y mecanismo dipolo de rotación. Esta frecuencia cambia de dirección provocando la colisión entre las moléculas y consecuentemente un calentamiento. La extracción por microondas consiste en tres pasos descritos por Alupului (2012): Primero, separación de solutos de la matriz bajo un aumento de temperatura y presión; Segundo, difusión de disolvente a través de la matriz; Tercero, pasar los solutos de la matriz al disolvente. Las ventajas de la extracción por microondas son el rápido calentamiento para la extracción de compuestos bioactivos, reducción del gradiente térmico, reducción del tamaño del equipo y aumento del campo de extracción.

Richter y col. (1996), fueron los primeros en describir la técnica de extracción por altas presiones, que consiste en la aplicación de alta presión para llevar el líquido a su punto de ebullición. La alta presión facilita el proceso de extracción. La automatización de esta técnica es la principal razón de su desarrollo con la que se disminuye el tiempo de extracción y las necesidades de disolventes. Esta técnica requiere pequeñas cantidades de disolventes debido a que la combinación de la alta presión y temperatura permite una rápida extracción. La alta temperatura de extracción provoca un aumento de la solubilidad y velocidad de transferencia de masa. También desciende la viscosidad y la tensión superficial de los disolventes, mejorando la velocidad de extracción (Ibañez y col., 2012).

La propuesta de aplicación de fluidos supercríticos para extracción comenzó con su descubrimiento por Hannay y Hogarth (1879), pero también debe ser atribuido a Kurt Zosel (1960), quien presentó la patente para descafeinar el café usando fluidos supercríticos (Eisenbach y col., 1983). Desde este comienzo esta técnica ha atraído a la comunidad científica y ha sido utilizada con éxito en medio ambiente, farmacia, aplicaciones en polímeros y análisis de alimentos (Zougagh y col., 2004). Cada

sustancia tienen tres estados, sólido, líquido y gas. El estado supercrítico es un estado distinto de estos tres estados y solo puede ser alcanzado en unas condiciones de presión y temperatura determinadas. El punto crítico es definido a una temperatura ( $T_c$ ) y presión características ( $P_c$ ). Los fluidos supercríticos presentan la difusión, viscosidad y tensión superficial de los gases y densidad y poder de disolución de los líquidos. Estas propiedades hacen de esta técnica capaz de extraer compuestos en un corto tiempo (Sihvonen y col., 1999). Un sistema básico de extracción de fluidos supercríticos consiste en un tanque de la fase móvil, normalmente  $CO_2$ , una bomba para presurizar el gas, un vaso de co-disolvente y una bomba, un horno que contiene un vaso de extracción, un controlador que mantiene la presión del sistema y un vaso, en la **Figura 1** aparece descrito un sistema completo de extracción por fluidos supercríticos (Azmir y col., 2013). Normalmente diferentes tipos de caudalímetros pueden ser instalados.



**Figura 1:** Sistema de extracción de  $CO_2$  supercrítico (Fuente Azmir y col., 2013)

El dióxido de carbono es un disolvente excelente para la extracción con fluidos supercríticos. La temperatura crítica del  $CO_2$  es  $31^\circ C$  y la presión crítica más baja es de 74 bar, también se ofrece la posibilidad de trabajar a presiones moderadas de entre 100

y 450 bar (Temelli y Güçlü-Üstündag, 2005). El principal inconveniente del dióxido de carbono es su baja polaridad, que lo hace ideal para lípidos, grasas y sustancias no polares, pero no válido para extracción de la mayoría de compuestos farmacéuticos. Esta limitación ha sido superada con la adición de un modificador químico que aumenta la polaridad del dióxido de carbono. Las propiedades de la muestra, el compuesto objetivo y los resultados de experimentos previos son la base principal para la selección del mejor modificador.

La eficacia del proceso de extracción de compuestos bioactivos de las plantas dependen de las variables que intervienen en el proceso como, la temperatura, la presión, tamaño de partícula, tiempo de extracción, caudal de CO<sub>2</sub> (Temelli y Güçlü-Üstündag, 2005, Ibañez y col., 2012).

### **1.5. COMPUESTOS DE INTERÉS EN LA ALCACHOFA**

La alcachofa es una especie perteneciente a la familia Asteraceae, conocida desde el siglo cuarto antes de Cristo como alimento y remedio. Esta planta ha sido apreciada por los antiguos egipcios, griegos y romanos, que la utilizaban como alimento y como medicina, por sus efectos beneficiosos frente a enfermedades hepato biliares y como ayuda digestiva, (Marzi y col., 1975, y Sonnante y col., 2002). La alcachofa sigue desempeñando un papel importante en la nutrición humana, especialmente en la región mediterránea. La alcachofa contribuye de manera significativa a la economía agrícola del Mediterráneo, con una producción anual de alrededor de 770.000 toneladas (t) (> 60 % de la producción mundial total). Italia es el primer productor mundial (alrededor de 474.000 t), seguido de España (215.000 t), Francia (55.000 t) y Grecia (25.000 t). La alcachofa también se cultiva en el Cercano Oriente (Turquía e Irán), el norte de África (Egipto, Marruecos, Argelia, Túnez), América del Sur (Argentina, Chile y Perú), y

Estados Unidos (principalmente en California), y su cultivo se está extendiendo en China (65.000 t en 2007) (FAO, 2007 y Bianco, 2005). La alcachofa es ampliamente cultivada por sus inflorescencias inmaduras, llamadas capítulos o cabezas, con hojas comestibles carnosas (brácteas) y receptáculo, que representan un componente importante de la dieta mediterránea y es una rica fuente de compuestos fenólicos bioactivos, así como la inulina, fibras y minerales (Lattanzio, 1982 y Orlovskaya y col., 2007). Además, las hojas son ricas en compuestos fenólicos (Fратиanni y col., 2007) y se han reconocido desde la antigüedad por sus efectos beneficiosos y terapéuticos. Los extractos de alcachofa se han utilizado para hepatoprotección como colerético, diurético, agentes reductores de lípidos (Gebhardt, 1997). La alcachofa es una fuente natural de compuestos fenólicos, como la cinarina (ácido 1,5- dicafeoilquínico) y ácido clorogénico (Ácido 5 - cafeoilquínico) siendo este último el más abundante (Llorach y col., 2002; Moglia y col., 2008). Además contiene derivados de flavonoides, tales como derivados de luteolina y apigenina, encontrados en las hojas de alcachofa y cabezas (Lattanzio y col., 2009; Gouveia y Castilho, 2012). El contenido de compuestos fenólicos varía entre los diferentes cultivos y se ve afectada por diferentes factores, tales como la edad, y las condiciones de cultivo y post- cosecha.

Las propiedades nutricionales y medicinales de la alcachofa están vinculadas a su composición química, rica en compuestos fenólicos e inulina. Las alcachofas tienen propiedades antioxidantes, anticancerígena, antibacteriana, diuréticas, pero también puede inhibir la biosíntesis del colesterol y la oxidación de LDL (Lattanzio y col., 2009).

Muchos estudios se han centrado en sus propiedades antioxidantes y saludables y parece que estas acciones podrían estar estrictamente relacionadas con la fracción polifenólica, compuesta principalmente por ácidos y flavonoides mono y dicafeoilquínico. Estas

propiedades son consistentes con el bien conocido doble papel de los compuestos fenólicos como antioxidantes y como sustratos para reacciones de pardeamiento oxidativo, principalmente en presencia de altas concentraciones de hierro (Lattanzio y col., 1994). Las actividades químicas de polifenoles en términos de sus propiedades reductoras hacen predecir su efecto potencial como secuestrador de radicales libres, (Brent y Rumack, 1993 y Knight, 1995).

Florinda y col., (2007) concluyeron que la parte comestible de la alcachofa (brácteas interiores e intermedios) son una buena fuente de polifenoles que fomentan un uso nutracéutico de estas especies.

La industria de la alcachofa genera grandes cantidades de residuos sólidos agrícolas (hojas, tallos, brácteas de la planta de alcachofa), alrededor de 80-85 % de la biomasa total de la planta y las aguas residuales, como aguas de escaldado, que no son aptos para el consumo humano. Estos residuos se utilizan generalmente como alimentación animal y para la producción de fibra o directamente descartados, con costes adicionales de tratamiento de residuos en cumplimiento de las leyes ambientales (Megías y col., 1999 y Llorach y col., 2002). En la búsqueda de nuevas aplicaciones de desechos de alcachofa, se ha confirmado que contienen una gran cantidad de compuestos bioactivos. Diferentes estudios han demostrado su potencial promotor de la salud, especialmente de su hepatoprotector (Adzet y col., 1987), antioxidante (Gebhardt, 1997), anticancerígeno (Clifford, 2000), y hipocol.esterolémica (Clifford y Walker, 1987).

Las propiedades farmacológicas de la alcachofa están bien documentados *in vivo* e *in vitro* para el tratamiento de la disfunción hepato-biliar, síndromes dispépticos, las enfermedades gástricas, así como para la inhibición de la biosíntesis de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL) de oxidación, agentes responsables de la

arteriosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria (Lattanzio y col., 2009). Extractos de hojas de alcachofa disminuyeron los lípidos séricos, así como el estrés oxidativo hepático y cardíaco en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol (Kucukgergin y col., 2010).

La actividad biológica de los subproductos de alcachofa, y en particular sus efectos antioxidantes marcados, están vinculados a su composición química especial, que incluye altos niveles de compuestos fenólicos con una amplia gama de derivados del ácido cafoilquinico (con ácido clorogénico como el más importante de ellos derivados) y flavonoides como la apigenina - 7 -O - glucósido y luteolina (Negro y col., 2002 y Sánchez - Rabaneda y col. , 2003, Mulinacci y col., 2004 ,Christaki y col., 2012 , Abu-Reidah y col., 2013, ). Además, las aguas residuales de alcachofa contienen inulina, un hidrato de carbono de origen vegetal que se ha asociado con la mejora de los sistemas gastrointestinales e inmunes, aumentando la absorción de calcio y magnesio y reduciendo los niveles de colesterol y lípidos séricos (Niness, 1999 y Saengkanuk y col., 2011). Los subproductos del procesado de alcachofa representan una enorme cantidad de material desechado (Lattanzio y col., 2009). Recientemente, se ha propuesto la posibilidad de recuperar los subproductos producidos por parte de la industria conservera de alcachofa, agregando valor agroindustrial a estos subproductos por razones económicas y ambientales.

Ruiz Cano y col., (2014) analizaron la influencia de los procesos industriales y las propiedades funcionales de diferentes subproductos del procesado de la alcachofa que diferían en el tratamiento térmico, la posición de las brácteas en la cabeza de la alcachofa, el pH del medio de transporte y el tamaño de corte. Todas las fracciones mostraron un alto contenido de fibra dietética y bajas cantidades de grasas. También presentaron altos niveles de inulina, especialmente en las brácteas interiores sometidas a

escalde. La cantidad total de fenóles, flavonoides, flavonas, derivados cafeoicos y la actividad antioxidante varía ampliamente con el tratamiento térmico, la posición de las brácteas en la cabeza de la alcachofa y el tamaño de corte. Las fracciones más interesantes que podrían utilizarse como ingredientes alimentarios funcionales fueron los situados más cerca del corazón de la alcachofa y tratadas térmicamente.

Debido a estas características los subproductos de alcachofa representan una fuente muy útil de compuestos de alto valor añadido de interés potencial como aditivos alimentarios y nutraceuticos (Ceccarelli y col., 2010 y Lattanzio y col., 2009).

La patente WO 2008/105023 indica la obtención de extractos de hojas de alcachofa (brácteas, tallos, etc.) utilizando agua a 85°C durante 30 minutos y una relación 4:1 agua/hojas frescas. A continuación se llevan a cabo diversas etapas de filtración (microfiltración, ultrafiltración y ósmosis) del agua de cocción y el producto concentrado resultante es secado mediante atomización para obtener un producto refinado útil como nutraceutico.

El ácido cafeico y sus derivados están presentes en varios complementos nutricionales. La empresa Gaia Herbs comercializa capsulas de derivados del ácido cafeico obtenido de ortigas. Por otro lado la equinácea que es un complemento alimentario ampliamente utilizado también contiene ácido cafeico y sus derivados. La utilización más frecuente de la cinarina es a partir de extractos de hoja de alcachofa, como el compuesto más relevante, para ser tomada en forma de píldoras o en infusiones por sus efectos beneficiosos para la digestión de grasas o diuréticos. Ejemplos de estos compuestos son Integris, Liver, Artichoke Extract 500® de la empresa Vitamet Extractos polifenólicos de alcachofa (Artbiochem S.L.).

Otro de los compuestos que se extraen de la alcachofa y que se comercializa es la inulina en polvo. En una amplia variedad de productos alimenticios se usa la inulina y sus derivados como: espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de azúcares y de grasas, humectante, depresor del punto de congelación. La inulina, al ser un polisacárido no digerible por las enzimas del tracto gastrointestinal humano pero sí fermentable por las bacterias de la microflora del colon, tiene un alto potencial en el desarrollo de fármacos. Existe gran cantidad de productos farmacéuticos, alimenticios y complementos que contienen polisacáridos como la inulina. A nivel industrial la obtención de inulina es a partir de Achicoria, pero debido a su concentración en brácteas externas de alcachofa, también ésta podría ser fuente de inulina a nivel comercial (Ayuso y col., 2014).

## 1.6. COMPUESTOS DE INTERÉS EN EL AJO

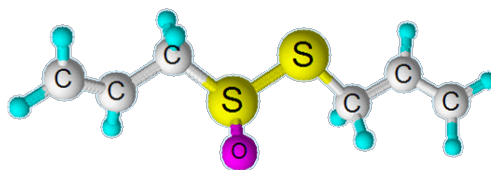
El ajo (*Allium Sativum*), ha sido tradicionalmente usado por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, conocidas desde la antigüedad. Ayala-Zavala y col. (2007) demostraron que el aceite de ajo aplicado en forma de vapor a una concentración del 0,0333% (v/v), inhibe la proliferación microbiana en tomate cortado almacenado a 5 °C durante 15 días.

Diferentes estudios *in vitro* han evidenciado la capacidad antimicrobiana de los extractos de ajo frente a cepas patógenas (García Pareja, P, 2004), eficiencia en el control de la microbiota presente en gazpachos (García Pareja, P. 2007) y su eficacia como desinfectante en centrales hortofrutícolas (Plaza, 2006).

Un ajo apenas huele si no se parte. Cuando se hace, la enzima alinasa actúa sobre un aminoácido –la alina–, convirtiéndolo en alicina (**Figura 2**) que al perder su único átomo de oxígeno, se transforma a su vez en disulfuro de dipropenilo. Éste es el



principal causante del olor que desprende el ajo, originado por los dos átomos de azufre contenidos en el centro de dicha molécula. En ese sentido, la principal desventaja para su empleo estriba en su fuerte olor, lo que puede alterar el aroma y sabor del producto a tratar; aunque ese inconveniente puede ser solventado mediante la encapsulación de esos compuestos. De hecho, se comercializa un extracto de ajo en polvo, donde los compuestos organosulfurados han sido complejados en  $\beta$ -ciclodextrinas.



**Figura 2.** Estructura tridimensional de la alicina.

No se conocen investigaciones sobre la composición de compuestos azufrados en la piel del ajo, pero sí en los dientes de ajo, por lo que es de interés hacer mención de sus posibles efectos saludables, más debido a las conocidas propiedades que tiene el ajo. Sin embargo, también se sabe que la composición cualitativa y cuantitativa de los derivados azufrados se encuentra sujeta a importantes variaciones según el proceso al que sea sometido el ajo, lo cual incide a su vez en su actividad, aspecto que puede limitar su uso en la obtención de compuestos de interés para el ser humano. Así, Navarro (2007) señala los componentes mayoritarios obtenidos después de distintos tratamientos a los que se ha sometido el bulbo de ajo:

1) Decocción: Ajoeno, sulfuro de dialilo (DAS), disulfuro de dialilo (DADS) y trisulfuro de dialilo (DATS).

2) Destilado (aceite): disulfuro de dialilo (530 ppm) y trisulfuro de dialilo (115 ppm) (O'Gara y col., 2000).

3) Extracción acuosa: Alicina.

4) Extracción alcohólica: Ajoeno.

5) Extracción hidroalcohólica de ajo envejecido (AGE): Extracto obtenido mediante el denominado proceso de envejecimiento (AGE: aged garlic extract), proceso que consiste en mantener los bulbos de ajo cortados en finas capas en una solución etanólica al 15-20%, a temperatura ambiente, durante 20 meses, tras lo cual se procede a la filtración y concentración del extracto a presión reducida y baja temperatura (Dillon y col., 2003). Durante este proceso de obtención del AGE, muchos de los componentes liposolubles, volátiles e inestables, como la alicina, se transforman en compuestos hidrosolubles más estables, de los cuales el más representativo es la S-alil-cisteína (SAC), acompañado de S-alil-mercaptocisteína (SAMC) y otros. La concentración de SAC en el AGE es de 1000 µg/g, mientras que en los bulbos de ajo crudo su contenido es de 20 µg/g (Ahmad y col., 2007).

Como ya se ha comentado anteriormente, la alicina es un compuesto mayoritario que se puede encontrar en el ajo, pero diversos autores coinciden en que las tabletas comerciales de ajo en polvo evidencian grandes fluctuaciones en el contenido de alicina. Estas pueden deberse a las diferencias en la materia prima y a las pérdidas durante el proceso de deshidratación industrial. De esta información se puede prever que un método de obtención de la misma y ya implantado a nivel industrial podría consistir en un tratamiento de deshidratación del ajo para obtener un concentrado rico en alicina.

Greco (2011), en su Tesis Doctoral ha evaluado los niveles de alicina en polvos de ajo obtenidos mediante distintos procesos de deshidratación. Los tratamientos fueron: deshidratación en spray, en horno terminador y en horno de deshidratación de Usos Múltiples. También se evaluó la eficacia del empleo de aditivos microencapsulantes

(goma arábiga) en los distintos tratamientos de deshidratados: tipo espray, lecho espumado.

De todos los tratamientos, el proceso de deshidratación espray evidenció las menores pérdidas de alicina, en las condiciones bajo estudio, de lo que se desprende, que las condiciones para la deshidratación de alta temperatura, corto tiempo y empleo de aditivo microencapsulante resultaron propicios para preservar alicina.

La empresa DOMCA S.A. distribuye un preparado comercial (Proalium) en polvo o soportado en emulgente alimentario, derivado de las aliáceas, natural y comestible, con un gran poder antimicrobiano, antibacteriano y antifúngico. Apto para una amplia utilización en diferentes sectores agroalimentarios: lácteo, cárnico, hortofrutícola, cuarta gama, platos preparados y salsas, entre otros.

Por otro lado, el aceite esencial de ajo se produce comercialmente mediante extracción por arrastre de vapor (Lawson y Hughes, 1992). Durante este proceso, tiene lugar la conversión de la alicina en disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo y otros compuestos azufrados, con lo que se obtiene un aceite rico en estos compuestos.



## ***CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS***



## **JUSTIFICACIÓN**

El sector de los transformados vegetales agrupa las actividades relacionadas con la conserva, congelados, zumos, concentrados y néctares de frutas y hortalizas. Este sector de transformados vegetales es uno de los más dinámicos dentro de la industria agroalimentaria y representa aproximadamente un 7% de la producción total.

La actividad de esta industria produce cantidades importantes de residuos y subproductos orgánicos, que oscila entre un 13% y un 65%, que pueden generar, si se gestionan adecuadamente, un beneficio económico y medioambiental (Ros, M. et al 2014).

La caracterización y definición de los residuos vegetales generados por la actividad productiva de transformación del producto agrario plantea dificultades añadidas fruto de la dificultad en la identificación de estos, así como el tipo de materia prima tan diferente y variable en el tiempo dentro de la misma empresa debido tanto a su variedad, determinada por su naturaleza inicial y características intrínsecas, como por el modo de generación de los mismos. Atendiendo al potencial de valorización de estos residuos, definido por las características intrínsecas y aparentes de los materiales, la tecnología disponible y la viabilidad económica de los procesos de gestión aplicables en cada caso, se distinguen los siguientes tipos de residuos:

- Residuos potencialmente recuperables para usos y utilidades relacionadas iguales o similares con las inherentes al producto principal (subproducto). En el caso del sector de transformados vegetales comprenden principalmente los frutos enteros

destriados y partes de frutos, especialmente tejidos, que pueden ser utilizados para alimentación humana y animal, farmacología, cosmética, etc.

- Residuos similares a los anteriores por su origen (partes de frutos como los hueso y algunos tipos de pieles o cáscaras), valorizables para usos distintos al del producto principal, como la obtención de energía calorífica.
- Residuos que requieren procesos de gestión y valorización diferenciados como los lodos, alperujos, etc., principalmente por compostaje para usos agrícolas.
- Residuos finales, provenientes de procesos de valorización no susceptibles de nuevos tratamientos, que deben ser destinados a incineración o depósito en vertedero.

De los datos obtenidos del sector se puede concluir que el 83% de los residuos generados corresponde a los orgánicos (procedentes de operaciones de corte, troceado, pelado, etc.). La obtención de una adecuada tecnología que permita transformar estos subproductos orgánicos en productos que generen un beneficio económico y medioambiental, es clave para obtener su máximo potencial, y no simplemente la alimentación animal de forma directa o su gestión final a vertedero.

Dentro de las tecnologías más destacables acorde a este tipo de residuos, las podemos dirigir hacia diversos tipos de industria como es la industria alimentaria (humana y animal), farmacéutica, química etc., mediante la obtención de compuestos de interés a partir de los residuos y subproductos (polifenoles, vitaminas, compuestos aromáticos). Algunos de estos son de naturaleza conocida, aunque existen otros muchos que



esperan su identificación y posterior explotación por la industria para elaborar productos novedosos y competitivos en el mercado.

El marco normativo desarrollado en Europa y en España establece como prioridad el reciclado y la valorización de los residuos frente a su eliminación. Por ello, toda la legislación desarrollada referente a los residuos busca crear el marco adecuado para favorecer el reciclado, la reutilización y la valorización frente a la eliminación.

Así la Directiva Europea 2006/12/CEE considera que es importante favorecer aprovechamiento de los residuos a fin de preservar los recursos naturales. Y su desarrollo busca contribuir a ir transformando los países miembros de la UE en una “sociedad del reciclado”, que trate de evitar la generación de residuos y que utilice los residuos como un recurso. La Directiva 2008/98/CE sobre residuos establece medidas destinadas a proteger el medio ambiente y la salud humana mediante la prevención, la reducción de los impactos adversos de la generación y gestión de los residuos, la reducción de los impactos globales del uso de los recursos y la mejora de la eficacia de dicho uso.

En la Región de Murcia se generan más de 500.000 toneladas anuales de desechos orgánicos, cuyo destino es la alimentación animal, en mayor medida, aportando un valor económico nulo o mínimo para las empresas, siendo las industrias de cítricos y de alcachofa aquellas que aportan una mayor cantidad de subproductos al total.

La búsqueda de fuentes de bajo coste para la obtención de compuestos naturales de interés que puedan emplearse en la elaboración de nuevos productos con características

mejoradas o propiedades saludables, ha llevado a que los subproductos producidos en la industria agroalimentaria sean concebidos como nuevos influentes dentro del propio proceso industrial o en otras industrias que aporten, a su vez, un valor añadido a la materia prima adquirida directamente del campo.

Desde el punto de vista del consumidor, la obtención de extractos naturales con propiedades tecnológicas y/o funcionales se enmarca dentro de la tendencia actual de evitar el uso de aditivos artificiales, mayoritariamente conservantes y colorantes. Sobre todo por la "mala prensa" que rodea a algunos conservantes como los benzoatos (bacteriostáticos, que inhiben el crecimiento y el desarrollo de bacterias) y p-hidroxibenzoatos (fungistáticos, que inhiben el crecimiento y el desarrollo de hongos) obtenidos sintéticamente, que pese a que están autorizados en un elevado número de alimentos (bebidas refrescantes, zumos de frutas, conservas vegetales, conservas cárnicas), desde hace mucho tiempo han dado lugar a no pocos comentarios e informes, suscitando sospechas y comentarios negativos, sobre su potencial toxicidad, siempre desmentidas mediante pruebas toxicológicas científicas realizadas por los organismos oficiales. De ahí la "necesidad de disponer alternativas naturales para la conservación de los alimentos"; es decir, los extractos naturales, para poder ofrecer a los consumidores otros procedimientos basados en ingredientes o extractos naturales para conservar los alimentos con garantía.

Un ejemplo claro de la tendencia de futuro de los extractos naturales es sin duda el extracto de romero, al que se le ha otorgado un número E, para su uso como aditivo: E392. El futuro de estas sustancias bioaditivas es claramente positivo y esperanzador, ya que son ingredientes naturales de origen vegetal que confieren

muchos efectos saludables para el organismo humano, pero no sustituirán a los aditivos alimentarios, sino que convivirán con ellos armonizándose, reduciendo el uso de algunos aditivos alimentarios, pero no en todos los casos. Donde se prevé un mayor crecimiento y aplicación es en el grupo de los bioconservantes, los biocolorantes (carotenos, xantofilas, clorofilas, antocianinas, curcumina, etc.) y los bioantioxidantes.

Un sector alimentario interesante para la aplicación de estos extractos es el de los platos preparados, ya que el mercado de este tipo de productos está creciendo año tras año y su popularidad va en aumento (Chiquirín, 2015), siendo los platos refrigerados a base de pasta los que han experimentado un mayor aumento, con un aumento en el 2104 del 18% (Magrama 2014). La industria de estos productos cada vez se esfuerza muestra más en la mejora de la información del etiquetado, la imagen de naturalidad, la ausencia de aditivos artificiales y presencia de ingredientes naturales (*Clean Label*), cuestiones cada vez más demandadas por los consumidores (2015 *Tecnifood*).

En la actualidad, el mercado de platos preparados se divide en cuatro grandes grupos, según la tecnología aplicada y conservación: congelados, refrigerado, deshidratados y esterilizados (conservas). De todos ellos, el sector que hoy en día presenta un mayor dinamismo y evolución es el de los platos refrigerados, donde se incluyen diferentes tipos de productos: pizzas, ensaladas, gazpachos, bocadillos, arroz. Dentro de esta amplia gama de productos en el sector de platos refrigerados los que más destacan son las pizzas y pastas que representan el 43% de la distribución del mercado en España, seguido del gazpacho que representa el 23% (Magrama 2012), por lo que en esta tesis se seleccionan estos tipos de platos para la aplicación de los extractos obtenidos.

Éste sector busca aportar una amplia gama de soluciones de comida refrigerada que satisfagan la exigencia del consumidor actual. Partiendo de la base de una seguridad microbiológica, el mayor interés del consumidor es obtener productos de elevada calidad sensorial y nutritiva, naturales, libres de aditivos y con una amplia vida útil (Magrama 2015).

La presente tesis trata de abarcar y dar solución a estos dos grandes retos de la industria agroalimentaria: la revalorización de subproductos que generan y la obtención de nuevos platos más naturales libres de aditivos artificiales que demanda el consumidor actual.

### **OBJETIVOS**

El objetivo general de esta tesis es la extracción de compuestos de interés a partir de diferentes subproductos de la industria agroalimentaria, susceptibles de ser utilizados en alimentación como un ingrediente con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas, presentando una alternativa al uso de aditivos sintéticos, ya que el uso de compuestos bioactivos extraídos de fuentes naturales para la elaboración de alimentos funcionales o con propiedades interesantes para alargar la vida útil de un producto puede abrir nuevas alternativas en la producción de alimentos.

En este proyecto se ha investigado, principalmente, subproductos obtenidos de la industria de conservas vegetales sometidos a procesos para obtener un extracto en polvo que pueda almacenarse a temperatura ambiente.

Para la consecución del objetivo principal del proyecto se llevarán a cabo los siguientes **objetivos específicos**:

1. Obtener un método sencillo de extracción de extractos y adecuarlo a las líneas de producción de la empresa generadora de subproductos de alcachofa y ajo para el aprovechamiento y revalorización de los mismos, con la mínima o nula inversión y aprovechando las instalaciones propias de la empresa.
2. Obtención de ingredientes naturales para la realización de “etiquetas limpias” (Clean Label), que limitan el uso de aditivos artificiales, ya que cada vez más el consumidor demanda productos con ausencia de aditivos y conservantes artificiales que asocia a una mayor calidad y salubridad del producto.
3. Caracterizar los extractos obtenidos de diferentes subproductos de alcachofa y ajo mediante técnicas *in vitro* e *in vivo* para determinar su propiedades y posibles capacidad.
4. Estudiar la aplicación de los extractos naturales y capacidad antioxidante y/o antimicrobiana y diferentes técnicas de envasado, en la elaboración de diferentes formulaciones de platos preparados refrigerados V gama, gazpacho y pasta con tomate, a nivel de planta piloto.
5. Evaluar la vida útil de los productos de V gama elaborados con los diferentes extractos y sistemas de envasado.

Estos objetivos se alinean con los que marca la Unión Europea dentro del nuevo programa marco para la financiación de las actividades de I+D+i «Horizonte 2020» para el período 2014-2020, contribuyendo a incentivar la participación activa de los agentes del Sistema Español de Ciencia, Tecnología e Innovación en el espacio europeo y las actividades en Estrategia de Especialización Inteligente en Investigación e Innovación de la Región de Murcia (RIS3Mur), donde las tendencias internacionales como Tecnologías Facilitadoras Clave (KETs) son: la Identificación y producción de nutracéuticos, metabolitos intermedios y productos de alto valor biológico; Mejora organoléptica de productos; Etiquetado *clean label*; Valorización y Aprovechamiento de residuos de la industria agroalimentaria para la obtención de extractos naturales antimicrobianos y antioxidantes.

### ***CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS***





### 3.1. EXTRACTOS NATURALES

Los compuestos polifenólicos, organosulfurados, glucosinolatos, carotenoides, etc., son algunos de los compuestos de interés que se encuentran en frutas y hortalizas con capacidad antioxidante o antimicrobiana, con los consiguientes beneficios para nuestra salud y la conservación de alimentos. Los subproductos utilizados para la extracción de compuestos antimicrobianos y antioxidantes han sido alcachofa y ajo.

#### 3.1.1. ALCACHOFA

El subproducto utilizado consta de brácteas, tallos y alcachofas enteras descartadas, proveniente del procesado de alcachofa tradicional (escaldada antes de pelar) o de elaboración directa (pelada antes de escaldar) de la variedad Blanca de Tudela. La industrialización de este vegetal para la elaboración de conservas genera aproximadamente un 60% del peso de la materia prima como subproducto, por lo que solo un 40% es aprovechado por las empresas. Este subproducto es recogido, el mismo día que se genera, en bidones de 50 kg en una empresa situada en la localidad de El Raal (Murcia), próxima al Centro Tecnológico de la Conserva (CTC), donde se encuentra almacenado en pilas en el exterior de la fábrica a temperatura ambiente. La recogida debe ser lo más inmediata posible para evitar el deterioro del subproducto. El procesado del subproducto se realiza, si es posible, tras la recepción en el CTC.



*Figura 3. Imagen de subproducto de alcachofa generado en la industria*

### 3.1.2. AJO

Se utilizan restos de pieles procedentes del desgranado del ajo, tallos y dientes de ajos descartados de la variedad ajo blanco autóctono en una fábrica situada en Molina de Segura, cercana al Centro Tecnológico Nacional de la conserva. La recogida se realiza a temperatura ambiente el mismo día que se genera el residuo, que se encuentra almacenado en silos en la empresa. Se utilizan bidones de 50 kg y se procesan el mismo día de su recogida.



*Figura 4. Imagen de subproducto de ajo generado en la industria*

### 3.1.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se han utilizado extracciones sólido-líquido. La extracción de muestras sólidas con disolventes, es un método muy utilizado en la separación de compuestos a partir de subproductos sólidos (Ayuso, 2014). Estos subproductos requieren la extracción con disolventes convencionales y la posterior eliminación del disolvente para obtener un extracto concentrado. Los disolventes más habituales son agua acidificada, etanol y metanol (Ko y col, 2011). En este caso, se ha intentado utilizar tecnologías de extracción “limpias” y sencillas evitando utilizar disolventes orgánicos, ya que uno de los objetivos es que las empresas que producen los subproductos puedan, con tecnologías y procesos sencillos y sin disolventes orgánicos, aprovechar y obtener

compuestos de interés de dichos subproductos. En las extracciones realizadas se ha utilizado el agua como disolvente. También se ha utilizado una tecnología emergente para comparar los extractos obtenidos, la extracción con fluidos supercríticos (King, 2000).

Para la obtención de extractos de alcachofa y ajo se ha utilizado agua como disolvente de extracción siguiendo la metodología descrita por Llorach y col. (2002), que indican que la extracción agua se obtienen porcentajes elevados de polifenoles.

### ***Extracción convencional***

#### *Extracto de alcachofa*

El proceso consiste en la utilización de agua como disolvente para la obtención de un extracto rico en compuestos antioxidantes. Posteriormente dicho extracto será concentrado, deshidratado y molido para obtener un extracto en polvo.

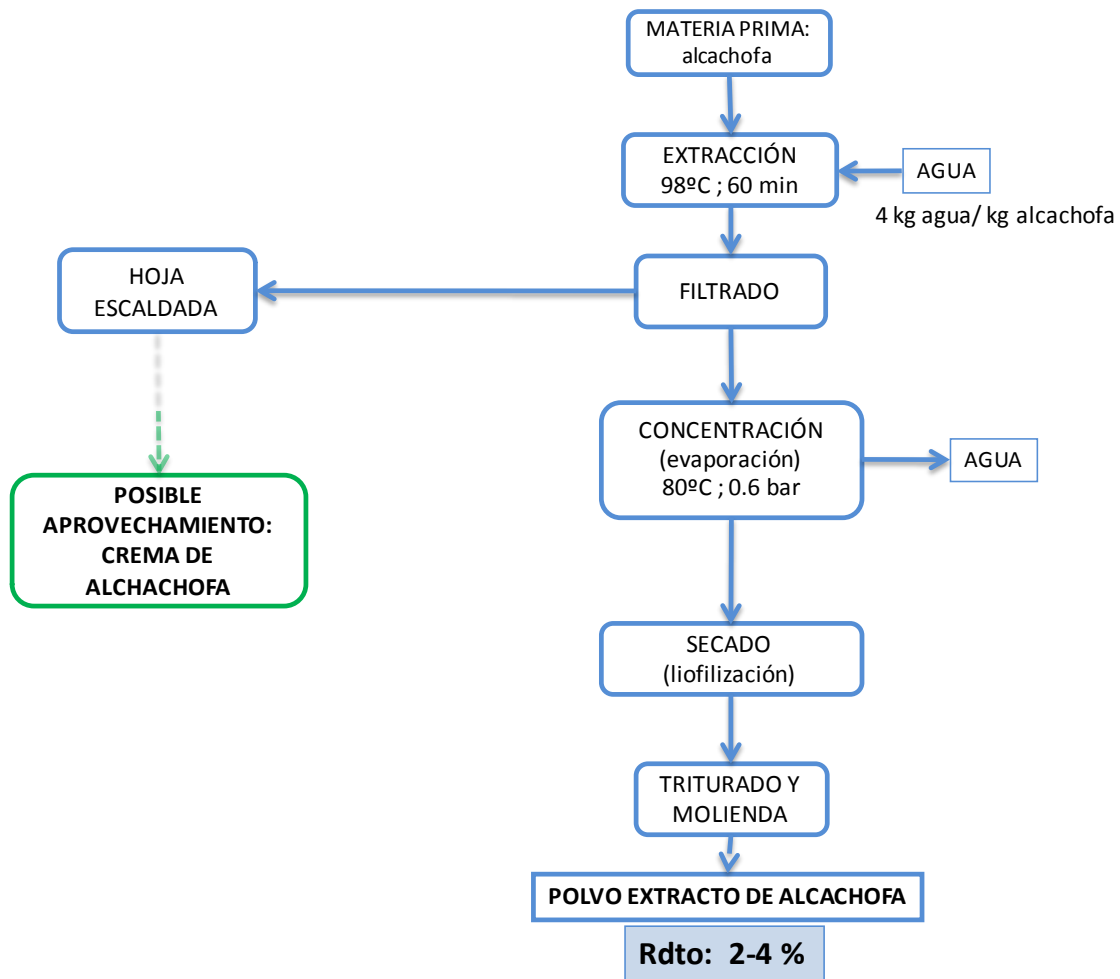
Cada prueba se ha iniciado con la búsqueda de empresas colaboradoras que nos aprovisionasen del subproducto de alcachofa. Posteriormente se ha gestionado la recogida y transporte de la materia prima hasta la planta piloto del CTC, donde se procesa el mismo día de la recogida. Si no es posible el procesado el mismo día, el subproducto se almacena en refrigeración.

Como se ha indicado anteriormente, el subproducto consta de brácteas, tallo y alcachofa entera descartada, proveniente de la elaboración de corazones y cuartos en conserva. Es muy importante recoger el subproducto recién procesado para evitar contaminación microbiológica y deterioro de compuestos de interés. Se toma una muestra representativa para el análisis de caracterización previo. Las muestras se someten a análisis que garanticen la ausencia de contaminantes que limiten el uso de los materiales

(análisis de patógenos y plaguicidas), y se caracterizan los parámetros físico-químicos, pH y la humedad. En la materia prima se cuantifica la concentración de cinarina como compuesto de interés antes del proceso de extracción. Al extracto obtenido se determina su concentración en fenoles totales y cinarina y otros métodos para determinar su capacidad antioxidante (ABTS, FRAP e impedancia eléctrica)

El proceso de extracción descrito en la **Figura 5** consiste en mantener los subproductos de alcachofa en contacto con agua en un reactor de acero inoxidable (HRS-SPIRATUBE, 2000) usando una relación sólido/líquido de 1/4 (25Kg alcachofa/100Kg) a 98°C durante 1 hora. Posterior al tratamiento térmico, la fase líquida se separa por filtración (tamiz de 0,6mm de luz de malla), se concentra a vacío (-0,6 bar) y a una temperatura de 80°C en un concentrador de simple efecto con capacidad máxima de 60 litros (RODABE INGENIEROS, 2009) hasta eliminar el 80 % de agua. El producto obtenido se deshidrata en un liofilizador (Labcondo, 1993) a -50°C y vacío máximo de 0,13 mbar durante 24 horas.

Se realizaron diferentes extracciones, tanto de subproductos de la elaboración tradicional (Extracto A) como directa (extracto B), para observar la variabilidad según el proceso realizado y diferentes épocas de fabricación.



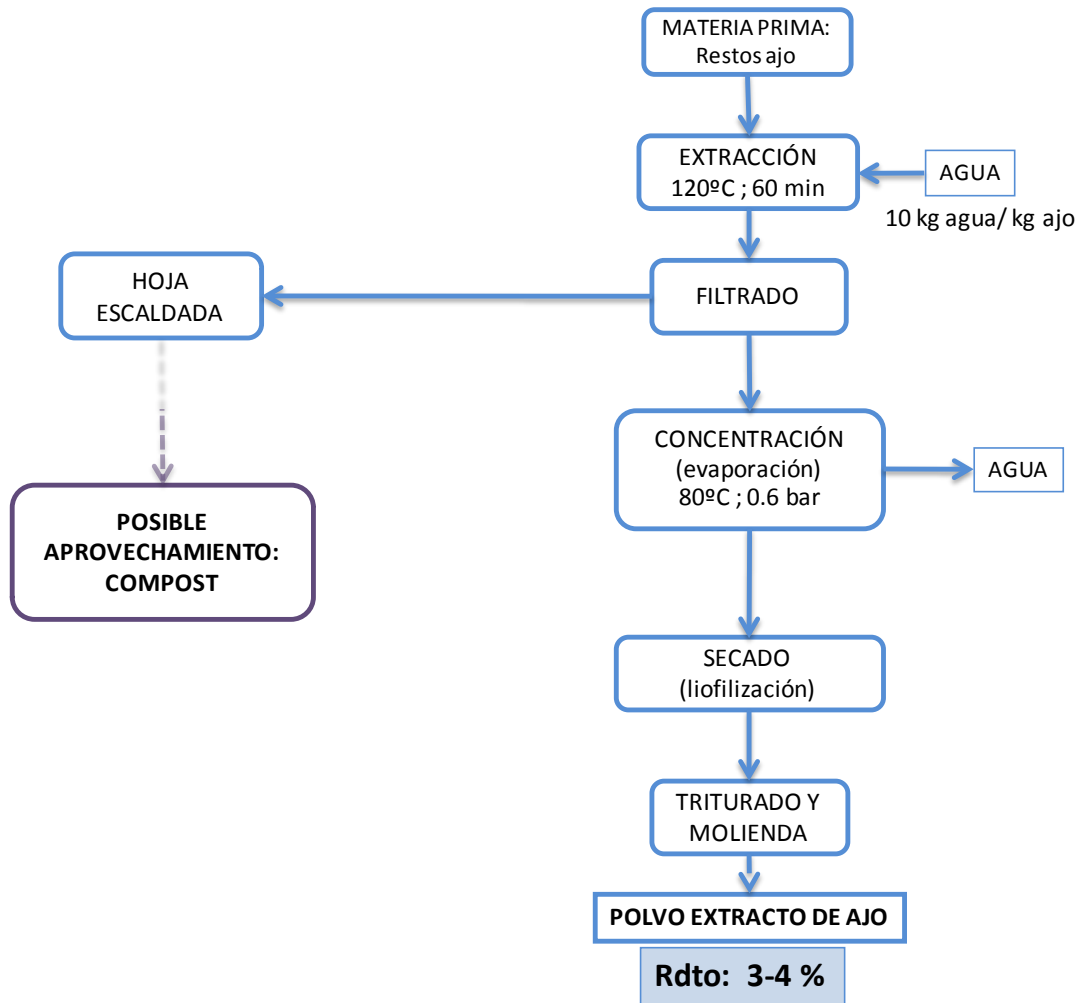
*Figura 5: Proceso de obtención del extracto de alcachofa*

### *Extracto de ajo*

Navarro (2007), describe distintas metodologías de obtención de extractos de ajo y señala los componentes mayoritarios obtenidos después de distintos tratamientos a los que se ha sometido el bulbo de ajo. Cuando se utiliza la tecnología de cocción, en las muestras obtenidas analizó como compuestos mayoritarios ajoeno, sulfuro de dialilo, disulfuro y trisulfuro de dialilo. En el caso de realizar un destilado se obtiene un aceite rico en disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo. Cuando se aplica una extracción acuosa el compuesto mayoritario es alicina. En extracciones alcohólicas es el ajoeno el compuesto obtenido. Por último si se aplica al ajo una extracción hidroalcohólica de ajo envejecido, extracto obtenido mediante el denominado proceso de envejecimiento

descrito por Dillon y col (2003), se obtiene un producto rico en S-alil-cisteína, acompañado de S-alil-mercaptocisteína y otros.

El proceso de extracción de ajo desarrollado en la planta piloto del CTC y que se describe en la **Figura 6** consta de una primera etapa de recogida del subproducto de una empresa situada en Molina de Segura compuesto por las pieles del bulbo y algún ajo no apto para consumo. Tiene la particularidad de que se trata de un subproducto con una alta densidad, por lo que su inconveniente mayoritario es el almacenamiento y, de hecho, el porcentaje en peso del subproducto con respecto a la materia prima industrializada es muy bajo, con valores del orden del 1-3%. Una vez recepcionado el subproducto en la planta piloto del CTC se inicia su procesado con el objetivo de que las pieles húmedas no desarrollen contaminación microbiana. Los subproductos de ajo se ponen en contacto con agua en un reactor de acero inoxidable (HRS-SPIRATUBE, 200) usando una relación sólido/líquido de 1/10 (15Kg ajo/150Kg) a 120°C durante 90 minutos. Tras el tratamiento térmico, se filtra el líquido obtenido, utilizando una pasadora con un paso de luz de 1,6 mm (FMA, 2005) para separar restos de pieles y se introduce en un evaporador de simple efecto a vacío (RODABE, 2009) para concentrar el producto a 75-80°C con un vacío de -0,6 bares hasta un producto con el 12-15 % de humedad. El producto obtenido se deshidrata en un liofilizador (LABCONCO, 1993) a una temperatura de -50°C y un vacío de 0,13 mbar (absoluto) durante 24 horas. El producto desecado se muele en un molino de muelas (Lleal, 2006) obteniendo un polvo amarronado-amarillo. El polvo se guarda en envases herméticos a temperatura ambiente hasta su uso en alimentos y su análisis. Para determinar la capacidad antimicrobiana se han utilizado métodos en Agar, basados en la metodología utilizada por Bauer y col., y técnicas de impedancia eléctrica.



*Figura 6. Proceso de obtención del extracto de ajo*



*Imagen 1. Evaporadorvacío*

*Imagen 2. Liofilizador*



*Imagen 3. Extracto alcachofa*

*Imagen 4. Extracto ajo*

*Figura 7. Imágenes de equipos utilizados y extractos obtenidos*

### 3.1.4. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS

Con el objetivo de determinar la capacidad antioxidante y/o antimicrobiana de los extractos obtenidos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria, se utilizan distintos métodos *in vitro* e *in vivo* de análisis. Con respecto a la determinación de la capacidad antioxidante Karadag (2009) publica una revisión de los distintos métodos existentes, analizando las posibles interferencias que puedan existir con respecto a la matriz en las que se analiza por lo que se decide utilizar varias técnicas para verificar los resultados obtenidos. La determinación de la capacidad antioxidante se ha medido con las técnicas *in vitro* ABTS y FRAP y la técnica *in vivo* de Impedancia eléctrica indirecta. Se ha cuantificado la cantidad de fenoles con el método de Folin y la de cinarina en el caso de la alcachofa. Para la determinación de la capacidad antimicrobiana se han utilizado los métodos en Agar y métodos de impedancia eléctrica.

#### **Cinarina (ácido hidroxicinámico)**

Para el análisis de cinarina en muestras de alcachofa (subproducto y extractos) se sigue el método descrito por Zhu y col., (2004). De cada muestra se pesan 20 g en un matraz de fondo redondo y se llena con agua hasta la mitad y se pone 8 horas a reflujo. Se filtra y el sólido obtenido se trasvasa a un matraz de 100 o 200 mL. Se pesa 1 g en matraz de 100 mL y se enrasa con agua destilada. Se filtra a través de un filtro de 0,45 micras y se inyecta en la columna de HPLC (Modelo Agilent 1100 Series HPLC Value System de Hewlett-Packard). *Condiciones* : Se utilizan dos fases móviles: A: Mezcla de agua y Ácido fosfórico al 0,2%. B. Acetonitrilo. Gradiente de fase móvil: a tiempo 0 se usa 94% de A y 6 % de B. A tiempo 15 min 70 % A y 30% B. Posee un módulo Diodo Array Detector (DAD) con detección máxima a una longitud de onda de 330 nm. La



temperatura de la columna es temperatura ambiente. En una columna LichroCART 125-4 (MERK) tipo C18 de 250x4 mm y un tamaño de paso de 5 micras.

### **Fenoles Totales**

Los polifenoles presentes en los extractos fueron cuantificados colorimétricamente mediante el Índice de Folin Ciocalteu (Rodríguez-Carpena y col. 2011). Para lo cual se pesan 2 gramos de muestra y se le añade agua destilada, se centrifuga (3000 rpm-10 minutos) y el sobrenadante se lleva aun matraz donde se enrasa con 10 ml de agua. Se toma una alícuota de 200  $\mu$ L de cada muestra diluida de extracto y se le adicionó 1000  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) (Panreac Química S.A., Barcelona, España) y 800  $\mu$ L de disolución de sodio carbonatado al 7.5% (p/v). Los compuestos fenólicos se oxidaron por el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo que resultó en una coloración azul, la cual fue medida en un espectrofotómetro modelo UNICAM UV/Vis Spectrometer (Spectronic Unicam, Texas, Estados Unidos) a una longitud de onda de 765 nm tras 20 minutos de incubación. El contenido de compuestos fenólicos se calculó en base a una curva de calibrado realizada con ácido gálico, y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (mg/100 g materia fresca).

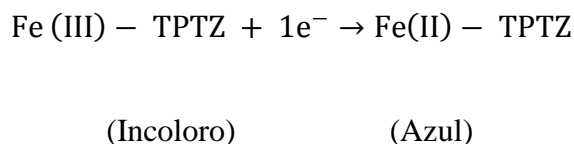
### **Capacidad antioxidante mediante métodos *in Vitro***

Para valorar la capacidad antioxidante de los extractos, se han aplicado dos técnicas diferentes: FRAP y ABTS

**El método ABTS** + se realizó siguiendo lo descrito por Rodríguez-Carpena y col. (2011). Este método se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS<sup>+</sup>, que es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. El radical catiónico ABTS<sup>+</sup> es un cromóforo que absorbe luz a una longitud de onda de

734 nm. Para elaborarlo se mezcló una solución de ABTS (7 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) con la solución de persulfato potásico (2,45 mM) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), después de la incubación a temperatura ambiente en la oscuridad 12 h. Posteriormente, la solución de ABTS se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0,700 ( $\pm 0,04$  a 734 nm). Las muestras de los diferentes tipos de extractos se diluyeron (1:6000) y una parte alícuota de 10  $\mu\text{L}$  se mezcló con 1000  $\mu\text{L}$  de solución de ABTS. Esta mezcla se dejó en reposo, a temperatura ambiente y condiciones de oscuridad, durante 4 minutos e inmediatamente se midió la absorbancia a 734 nm que se comparó con una curva estándar de Trolox (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), expresando los resultados como equivalentes de mM Trolox.

**El método FRAP** se realizó siguiendo lo descrito por Benzie y Strain (1996). Este método evaluó la capacidad antioxidante de las muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ) presente en el complejo 2,4,6-tri(2-piridil)-triazina (TPTZ) hasta su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ), color azul, que presenta un máximo de absorción a 593 nm.



**Figura 8.** Ecuación de oxidación método FRAP

Para la obtención del complejo fueron necesarios los siguientes reactivos: tampón acetato (300 mM) (Panreac Química SAU, Barcelona, España), pH 3,6, una solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM) (Panreac Química SAU, Barcelona, España) y una solución de TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine)(10 mM) (TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Bélgica) en HCl (40 mM) (Panreac Química SAU, Barcelona, España), los cuales se mezclaron

en la proporción 10:1:1. Posteriormente, 1 ml de la solución FRAP, 1 ml de agua destilada y una alícuota de 25  $\mu$ L de muestra, se mezclaron, incubando durante 4 minutos a 37 °C y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Los resultados se expresaron como mM FeSO<sub>4</sub>. La recta de calibrado se realizó a partir de una solución estándar de FeSO<sub>4</sub>.

### **Determinación de la capacidad antioxidante (*in vivo*) y antimicrobiana mediante impedancia eléctrica.**

Los cambios de impedancia o resistencia del medio de cultivo debido al crecimiento de microorganismos, se midieron de forma automática con el equipo BacTrac 4300 (Gomensoro, España). Permite la determinación de carga microbiana por impedancia eléctrica. Se fundamenta en el registro en continuo de cambios en la impedancia del medio (M) y de los electrodos (E), ambos causados por el crecimiento de microorganismos presentes en la muestra. Consta de un bloque incubador termostaticado capaz de procesar 64 muestras de 10 mL, divididas en dos bloques de 32 muestras para trabajar a dos temperaturas de incubación diferentes; incorpora celdillas reutilizables de medida y el paquete informático Bac-Trac y Bac-assist.

En la aplicación de esta técnica, se siguieron dos protocolos, en ambos casos, los cambios de impedancia o resistencia del medio de cultivo debido al crecimiento de microorganismos, se midieron de forma automática con el equipo BacTrac 4300 (Gomensoro, España):

a) Método directo para crecimiento de bacterias para medir capacidad antimicrobiana. Se utilizaron cepas de *Salmonella Enterica* subsp. *Enterica*, serovar Typhimurium (CECT 4594) y *E. coli* (*Escherichia coli* CECT 515), de la Colección

Española de Cultivos Tipo, con una concentración de  $10^6$  ufc/mL, utilizando como medio de cultivo 001A (Sy-Lab, Austria), realizando las medidas de impedancia a 30 ° C. La cepa liofilizada se introduce en TBS durante 24 h a 37 °C, medio en el que se alcanza una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/mL. Tras ello, se adicionaron 9 mL de medio Sy-Lab001A a los tubos a introducir en el equipo BacTrac, inoculando a cada uno de ellos 0,1 mL de cepa a una concentración  $10^6$  ufc/mL y el agente antimicrobiano a ensayar. Tras ello, los tubos se introdujeron en el equipo, dejando incubar durante al menos 24h. Con este método se determina la capacidad antimicrobiana. En la **Tabla 1** se indican las concentraciones y cantidades ensayadas.

**Tabla 1.** Cepas de bacterias y concentraciones de antimicrobianos utilizados

Volumen medio (mL)	Cepa	Volumen Cepa (mL)	Antimicrobiano adicionado (g/L)	Volumen antimicrobiano (mL)
9	<i>Salmonella</i>	0,1	Control medio	-
9	<i>Salmonella</i>	0,1	9,60 ajo	1
9	<i>Salmonella</i>	0,1	0,60 Sb+Bz	1
9	<i>E. coli</i>	0,1	Control medio	-
9	<i>E. coli</i>	0,1	0,60 Sb+Bz	1
9	<i>E. coli</i>	0,1	9,60 ajo	1

b) Método indirecto para crecimiento de levaduras (capacidad antimicrobiana). Se partió de un cultivo de levaduras (*Sacharomices Cerevisiae* CECT 1325) a una concentración de  $10^7$  ufc/mL, preparando cuatro viales. Las medidas de impedancia se realizaron a 30° C. Como se ha descrito en el método directo, la cepa liofilizada se introduce en TBS durante 24 h a 37 °C, medio en el que se alcanza una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/mL. A continuación, se prepararon unos viales estériles a los que

se les adicionaron 2,4 mL de medio cuya composición es: glucosa (10g), mycopeptona (5g), extracto de levadura (3g), extracto de malta (3g), enrasando hasta 1L con agua estéril. Cada uno de los tubos se inoculó con 0,3 mL de cepa a una concentración  $10^6$  ufc/mL y el agente a ensayar. Tras ello, cada vial se introdujo en un tubo conteniendo 2 mL de potasa (KOH) al 2%, provisto de electrodos que determinan la saturación de la potasa. La respiración celular produce  $\text{CO}_2$  que va saturando la solución de potasa haciendo cambiar la conductividad que es medida por los electrodos. Se utilizó una concentración de 0,2% de extracto. En la **Tabla 2**, se indican las concentraciones y cantidades ensayadas.

**Tabla 2.** Cepa de levadura y concentraciones de antimicrobianos utilizados

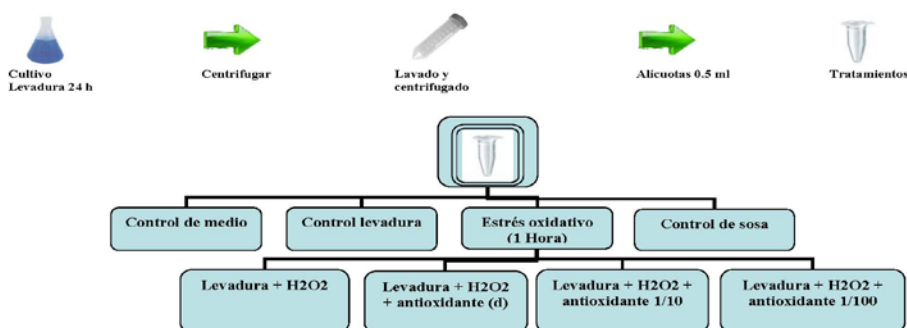
Volumen medio (mL)	Cepa	Volumen Cepa (mL)	Antimicrobiano adicionado (g/L)	Volumen antimicrobiano (mL)
4,4	<i>S. Cerevisiae</i>	0,1	Control medio	0,5 (agua)
4,4	<i>S. Cerevisiae</i>	0,1	2,0 extracto ajo	0,5
4,4	<i>S. Cerevisiae</i>	0,1	2,0 extracto alcachofa	0,5

Este método indirecto se ha adaptado para analizar la capacidad antioxidante de los extractos, como una técnica *in vivo* que mide la oxidación del microorganismo y si la adición de extracto evita esa oxidación. La diferencia radica en que se prepara viales en los que se añade peróxido de hidrógeno al microorganismo, que hace que el crecimiento de este sea muy lento al someterse a un estrés oxidativo intenso. Para esta determinación se procede de forma similar al anterior, preparando los siguientes viales:

**Tabla 3.** Preparación de viales para analizas capacidad antioxidante

Extracto/Control	Identificador	Cepa	Extracto	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
C <sub>+</sub>	1	850 µL	-	-
Alcachofa	2		100 µL	-
C <sub>Ox</sub>	3		-	100 µL
Alcachofa	4		100 µL	100 µL

La disolución del extracto se prepara con 0,14 gramos de extracto alcachofa con 50 mililitros de agua destilada.



*Figura 9. Procedimiento de evaluación " in vivo" de la capacidad antioxidante mediante técnica de impedancia*

### Capacidad antimicrobiana mediante técnica de difusión en Agar.

La actividad antibacteriana de los extractos, se evaluó mediante la técnica de difusión en Agar de acuerdo al protocolo descrito por Pascual (1999). La siembra de las cepas bacterianas se realizó adicionando 20 mL de medio PCA en placas Petri, previamente inoculado con la cepa testigo. Para la obtención de la cepa testigo, se hizo crecer el microorganismo en caldo trotona de soja (TSB) durante 24 horas a 37 °C. Tras ello, se realizan diluciones seriadas hasta obtener la concentración de trabajo, que fue 10<sup>6</sup>

ufc/mL, depositando 0,1 mL de esa concentración sobre el medio PCA. Posteriormente, con un sacabocado estéril se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro sobre el agar, adicionando 50µL del antimicrobiano (a la dosis de ensayo) a cada pocillo. Además, en cada ensayo se utilizó un pocillo como control. Las placas se dejaron 2 horas en refrigeración a 4°C para permitir la difusión del extracto. Tras ello, las placas se incubaron a 30 °C o 37 °C (en función del microorganismo) durante 24 horas. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada cepa y extracto ensayado. La presencia de un halo de inhibición definido alrededor del pocillo con extracto, indicó actividad antibacteriana positiva.

Transcurridas 24 horas, se realizó la lectura de las placas. Se promediaron los valores obtenidos, hallándose el diámetro promedio que fue utilizado como índice de actividad antibacteriana.

### **3.2. ELABORACIÓN DE ALIMENTOS V GAMA: APLICACIÓN DE EXTRACTOS**

Tras la obtención de extractos y caracterización de los mismos, se desarrollan dos platos preparados, uno a base de hortalizas y otro a base de pasta con el objetivo de demostrar la viabilidad del uso industrial de los extractos obtenidos. Se realizan distintas pruebas adicionando diferentes concentraciones de los extractos a los platos preparados refrigerados. Debido a que los extractos obtenidos aportan sabor, color y aroma, se buscaron productos en los que la adición de estos extractos no alterase el sabor ni color, seleccionando el gazpacho y platos refrigerados a base de pasta.

### 3.2.1. ELABORACIÓN DE GAZPACHO REFRIGERADO

Los ingredientes y receta seguida para la elaboración del gazpacho se realiza según publica Thermomix en su libro “Imprescindible” en 2013. El gazpacho se elabora con tomate variedad *Rio Grande*, pimiento verde variedad *italiano*, pimiento rojo variedad *Morrón*, pepino variedad *Ashley*, aceite Oliva virgen extra *Castillo de Tabernas*, vinagre de vino blanco *Horeca Select*, sal fina de mesa *García*, y agua, en las cantidades que aparecen descritas en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Composición del Gazpacho refrigerado

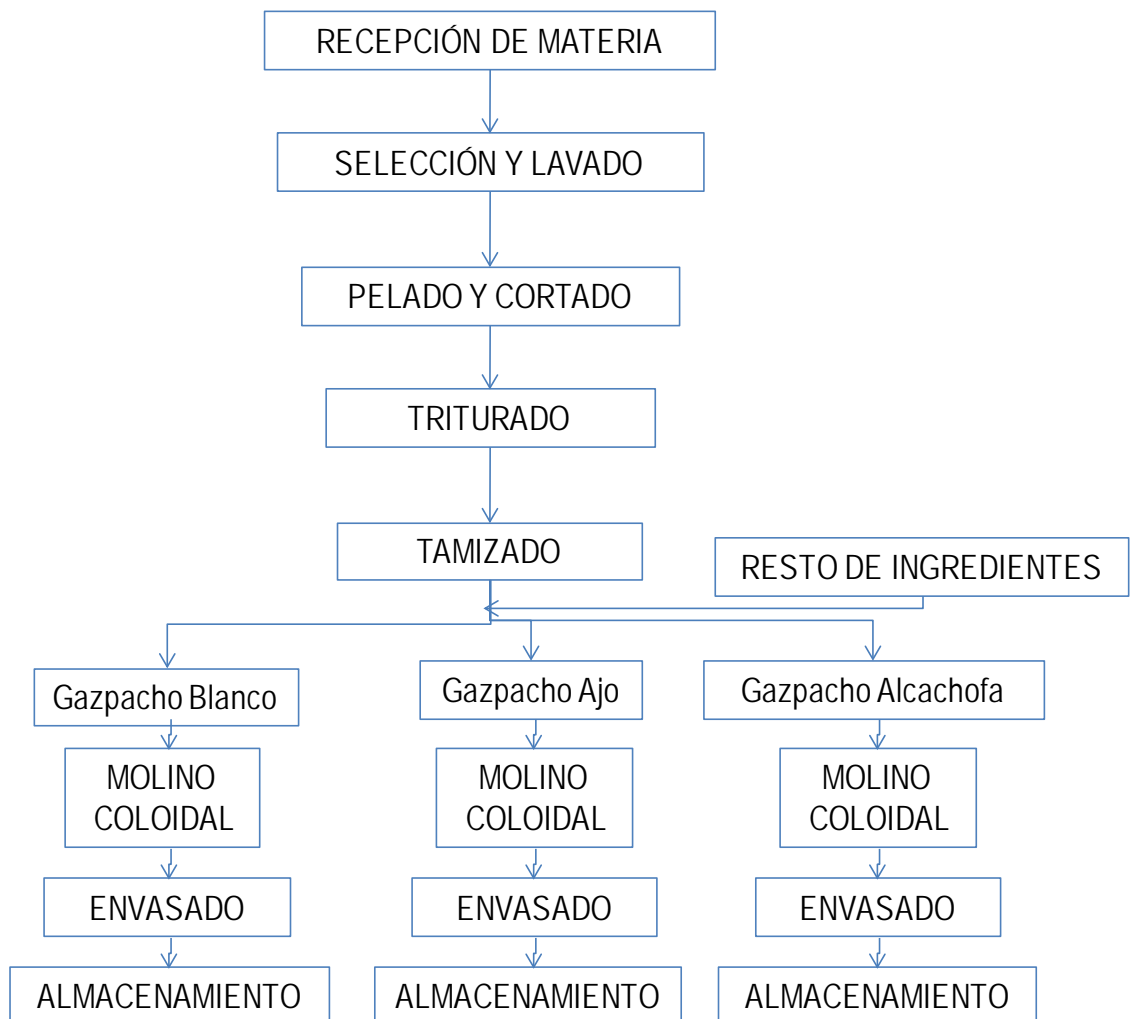
INGREDIENTE	%	Gramos
Tomate	70	10500
Pimiento verde	5	750
Pimiento Rojo	5	750
Pepino	7	1050
Aceite Oliva VE	8	1200
Vinagre	1.5	225
Sal	0.8	120
Agua	2.5	375
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>15000</b>

En primer lugar se realiza la selección y lavado de la materia prima en una lavadora de vegetales (FMA, 2010), pelado de algunos ingredientes y cortado de todos los vegetales en una cortadora URSCHER® (GKA DICER, 2006), triturado utilizando una trituradora industrial (SAMMIC, 2008), tamizado utilizando una pasadora con luz de malla 1,6 mm (FMA, 2005), al producto así obtenido se le añade el resto de ingredientes, sal, aceite, vinagre, extracto de alcachofa o ajo y agua. Una vez obtenido el producto se homogeniza en un molino coloidal (Llela, 2006). El producto así obtenido se envasa en



botella de cristal de 212 mL de capacidad (Juvasa, Zumo STD 212-212ml-TO-038) y se mantiene en refrigeración a 4°C en una cámara frigorífica durante el tiempo de vida útil (21 días).

La **Figura 10** muestra el flujo del producto en las distintas etapas de proceso.



**Figura10.** Diagrama de flujo de elaboración de gazpacho

Todas las pruebas realizadas se llevaron a cabo en la planta piloto del CTC y el personal iba equipado en todo momento con guantes, gorros y vestuario adecuado y limpio.

- *Recepción de la materia prima*

La materia prima se recibe en la planta piloto del CTC, almacenándola en una cámara de refrigeración a 4 °C durante 24 h como máximo, si no se procedió a su elaboración en el mismo día. La materia prima puede proceder de subproductos de alcachofa escaldada (subproducto A) o directa sin escaldar (subproducto B).

- *Selección y lavado*

En esta fase, primero se descartan las piezas en mal estado y la materia prima óptima se lavó con agua de red clorada (2,5 ppm) en una lavadora por borboteo de aire (FMA, 2010) para reducir la contaminación inicial que traen los vegetales del campo.

- *Pelado y Cortado*

Consiste en el pelado manual de algunos ingredientes (pepino y ajo), eliminación de pedúnculo en pimientos y cortado en una cortadora URSCHEL modelo G-A DICER (2006), que admite un tamaño máximo de producto de entrada de 140 mm en cualquier dimensión. Esta cortadora produce cortes en cubos planos y tiras lisas, equipada con piezas de contacto de producto de acero inoxidable. Todos los utensilios y materiales auxiliares (tarros, cuchillos, tablas,...) se enjuagaron con agua clorada (110 mg/L) para su higienización y secado posterior con papel.

- *Triturado*

En esta fase, todos los vegetales se trituraron con una batidora industrial (SAMMIC, 2008), previo paso por la pasadora, para obtener un mayor rendimiento en la siguiente fase.

- *Tamizado*

Se utiliza una pasadora marca FMA CL-265, modelo ME-AL (FMA, 2005). Posee en su interior un tamiz intercambiable con un determinado diámetro de poro. Existen tres tamices de 0,6, 1,6 y 3,5 milímetros de orificio de luz. En el caso del gazpacho se utiliza el de 0,6mm. El producto atraviesa el poro y cae al cuerpo de la pasadora, lo que no puede atravesar ese poro se queda retenido en la zona de rechazo que continuamente se va eliminando de forma automática. Esta pasadora de tamiz tiene una capacidad para 300 a 400 kg/h de producto y está fabricada totalmente en acero inoxidable.

- *Homogeneizado*

Al producto obtenido en la etapa anterior se le añaden el resto de ingredientes (aceite, agua, vinagre, extracto y sal) y se mezclan bien. Se añaden 2 gramos de extracto de ajo/litro de gazpacho y 3 gramos de extracto de alcachofa/litro de gazpacho disueltos en agua.

La mezcla final se pasa por un molino coloidal LLEAL modelo MCV para la molienda de productos sólidos (dispersados en un medio líquido) y para la preparación de suspensiones estables. Se trata de un sistema eficaz y de fácil limpieza. La molienda por vía húmeda es el mejor método para la preparación de suspensiones de sólidos en un medio líquido ya que consigue una perfecta homogeneización, una regularidad en el tamaño de partícula y una excelente distribución porcentual en el medio líquido.

- *Envasado*

El gazpacho se envasa en botellas de vidrio de 212 ml. (Juvasa, modelo Zumo STD 212-212ml-TO-038). Se hacen tres lotes:

-Gazpacho blanco (codificado como GB). Sin extractos.

-Gazpacho ajo (codificado como GAJ): con 0,2% extracto ajo.

-Gazpacho alcachofa (codificado como GAL): con 0,5 % extracto alcachofa.

También se envasan tarrinas de polipropileno (80 mm PP, EDV)) de 128 ml de capacidad conteniendo 100 gramos de gazpacho. Las tarrinas se cierran en una termoselladora EFAMAN (EFABIND, 2003) de vacío compensado, en la que primeramente se hace vacío, se inyecta l gas y se termosella la bandeja con un film. Se utilizó un film de polipropileno (PP), con un espesor de 64 micras y un micraje de 64,7g/m<sup>2</sup>; de permeabilidad al vapor de agua 10 g/m<sup>2</sup>/24 h/bar, a 38°C, con una humedad relativa del 90% y temperatura de sellado entre 180-200 °C. Tanto el film como la bandeja cumple con la Directiva 2002/72/CE, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y con el Real Decreto 118/2003, que hace referencia a la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y sus condiciones de ensayo. Las bandejas se cierran con un vacío de -0,8 bar e inyección de mezcla de gases (20% de CO<sub>2</sub> +80% N<sub>2</sub> Extendapack 14 PRAXAIR). La operación de llenado y cerrado se realiza en una sala blanca a 4°C. Las bandejas son higienizadas con una disolución de cloro libre de 2 ppm, antes de su utilización.

- *Almacenamiento*

Una vez envasadas y codificadas las muestras, se procedió al almacenamiento de las mismas en una cámara de refrigeración a 4°C. Cada ensayo se realizó por triplicado,

analizando las muestras con un intervalo de tres y cinco días a lo largo de su vida útil, considerando el día de elaboración el día cero.

### 3.2.2. ELABORACIÓN DE PASTA REFRIGERADA

Los ingredientes y receta seguida para la elaboración de la pasta se realiza según publica Thermomix en su libro “Imprescindible” en 2013. Se utiliza pasta seca (Plumas nº6, marca Gallo), aceite de oliva virgen, Castillo de Tabernas, Tomate triturado marca Hida, sal fina de mesa marca García y orégano marca Carmencita. Las cantidades utilizadas para la cocción de la pasta aparecen en la **Tabla 5** y en la **Tabla 6**, los ingredientes y cantidades utilizados para la elaboración de la salsa de tomate.

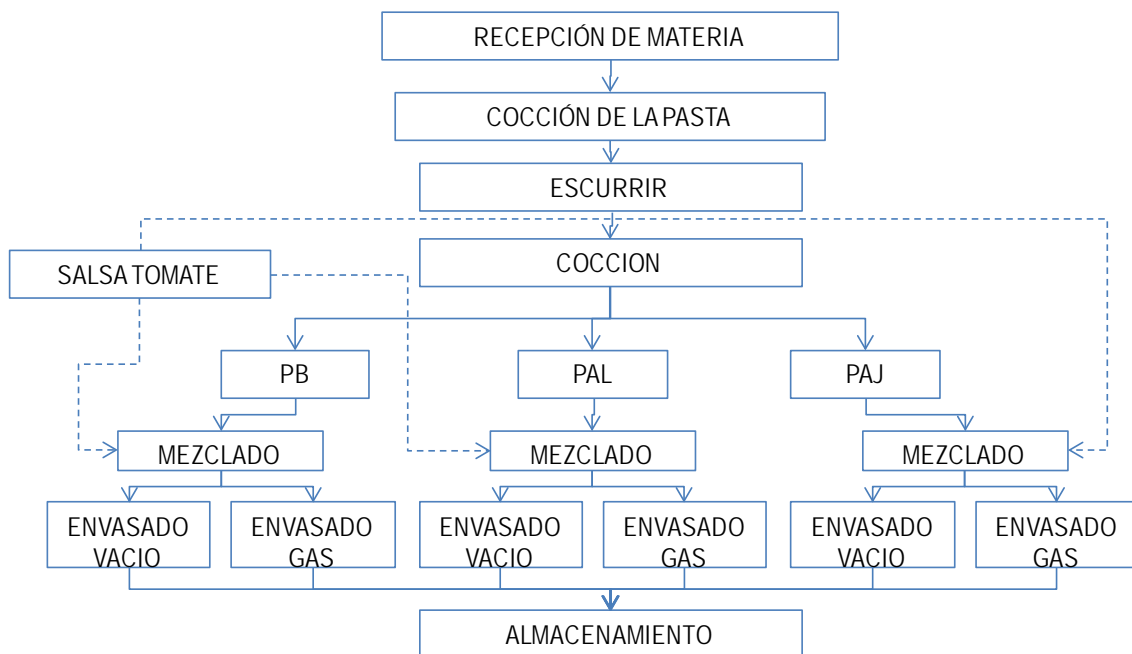
**Tabla 5.** Cocción de pasta

INGREDIENTE	%	Gramos
Pasta seca	27,1	1500
agua	72,4	4000
Aceite Oliva VE	0,4	20
sal	0,1	5
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>5525</b>

**Tabla 6.** Composición de salsa de tomate

Tomate	93	4000
Aceite	5	215
Sal	2	86
Orégano	0,07	3
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>4304</b>

Las diferentes etapas de proceso seguidas para la elaboración y envasado de la pasta refrigerada, se esquematizan en la **Figura11** y consisten en la cocción de la pasta con y sin extractos en un calderín (FMA, 2007), preparación de la salsa de tomate de manera independiente en un calderín (FMA, 2007), mezclado de la pasta cocida con la salsa de tomate y envasado al vacío y en atmósfera de 80% N<sub>2</sub> + 20 CO<sub>2</sub> (Extendapack 14 PRAXAIR) en una termoselladora (EFABIND, 2003), en bandejas de Polipropileno (MCP Tray, Ilpra). Se obtienen un total de 6 muestras que se mantienen en refrigeración a 4°C en una cámara frigorífica, durante su vida útil (30 días)



**Figura11.** Diagrama de flujo de elaboración de Pasta refrigerada

- *Recepción de la materia prima*

Como ingredientes se adquiere la pasta, Plumas n°6 de la marca GALLO y tomate natural triturado marca HIDA para la elaboración de las pruebas. Se almacenan a temperatura ambiente hasta su utilización.

- *Cocción y escurrido de la pasta.*

La pasta se cuece en un calderín de acero inoxidable con doble fondo que utiliza vapor sobresaturado como medio de cocción (FMA, 2007). LA proporción de pasta seca agua es 1/3. Al agua de cocción se añade el 0,5 % de aceite oliva virgen extra Castillo de Tabernas y el 0,2% de sal fina de mesa García. Se realizan un total de tres muestras distintas:

- a) Cocer la pasta (1,5Kg) con agua (4,5Kg) sin añadir **extracto**. Esta muestra se codifica como **PB**
- b) Cocer la pasta (1,5Kg) con agua (4,5Kg) y añadir a la muestra AL **4g/L de extracto de alcachofa**. Esta muestra se codifica como **PAL**
- c) Cocer la pasta (1,5Kg) con agua (4,5Kg) y añadir a la muestra AJ **3g/L de extracto de ajo**. Esta muestra se codifica como **PAJ**

Tras la cocción la pasta se deja enfriar y se escurre con un tamiz de acero inoxidable con una luz de malla de 2,5 cm.

- *Adición de la salsa de tomate y mezclado*

La salsa de tomate se elabora en un calderín de acero inoxidable con doble fondo que utiliza vapor sobresaturado como medio de cocción (FMA, 2007). En primer lugar se añade el aceite de oliva virgen en una proporción del 3,8%, pasados 5 minutos calentando a 121°C, se añade el tomate triturado Hida, en una proporción del 94,2% , la sal fina de mesa (García) en una cantidad del 1,9% y el 0,1 % de orégano, marca Carmencita. Una vez elabora la salsa de tomate se mezcla caliente con la pasta.

- *Envasado y cerrado*

Se envasan bandejas de polipropileno (MCP TRAY 6001, Ilpra) de 350 ml de capacidad conteniendo 200 gramos de pasta cocida y 50 gramos de salsa de tomate, es decir una proporción de pasta/ tomate de 4/1. Las bandejas se cierran en una termoselladora EFAMAN (EFABIND, 2003) de vacío compensado, en la que primeramente se hace vacío, se inyecta un gas (si se desea atmósfera modificada) y se termosella la bandeja con un film. Se utilizó un film de polipropileno (PP), con un espesor de 64 micras y un micraje de 64,7g/m<sup>2</sup>; de permeabilidad al vapor de agua 10 g/m<sup>2</sup>/24 h/bar, a 38 °C, con una humedad relativa del 90% y temperatura de sellado entre 140-180 °C. Tanto el film como la bandeja cumple con la Directiva 2002/72/CE, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y con el Real Decreto 118/2003, que hace referencia a la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y sus condiciones de ensayo. Se realizan dos tipos de envasado:

- ✓ Envasado al vacío (-0,5 bar)
- ✓ Envasado con un vacío de -0.8 bar e inyección de mezcla de gases (20% de CO<sub>2</sub> +80% N<sub>2</sub> Extendapack 14 PRAXAIR).

La operación de llenado y cerrado se realiza en una sala blanca a 4°C. Las bandejas son higienizadas con una disolución de cloro libre de 2 ppm, antes de su utilización.

### 3.2.3.5. Almacenamiento

Una vez envasadas y codificadas las muestras, se procedió al almacenamiento de las mismas en una cámara de refrigeración a 4 °C. Cada ensayo se hizo por triplicado,



analizando las muestras con un intervalo de tres y cinco días a lo largo de su vida útil, siendo el día de elaboración el día cero.

### **3.2.3. ESTUDIO VIDA ÚTIL RODUCTOS**

No existe un protocolo universal para determinar directamente la vida en el lineal de venta de un producto, pero para productos de vida útil corta, como es el caso de los platos preparados refrigerados, las muestras deben ser evaluadas periódicamente en el laboratorio. Conforme transcurre el tiempo, la carga microbiológica aumenta mientras que la calidad no microbiológica disminuye llegando hasta un punto, en ambos mecanismos, que el producto no es apto para el consumo. Diferentes tipos de test pueden usarse individualmente o de manera combinada para medir la evolución de los alimentos: análisis microbiológico (recuento total de aerobios, mesófilos, determinación de bacterias patógenas, etc.), análisis físico-químicos (pH, porcentaje de humedad, determinaciones de vitaminas, etc.) y análisis sensorial (textura, color, sabor).

Con respecto al control microbiológico se sigue el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

#### **Análisis fisicoquímicos**

##### *Determinación del pH*

El valor de pH se determinó por lectura directa, introduciendo el electrodo combinado del pH-metro Crison basic 20 (Barcelona, España) de acuerdo con el método descrito para análisis de acidez en alimentos (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1985). Para

ello, se homogenizan 10g de muestra en 50 mL de agua destilada al 20% (w/v). Antes de cada lectura, se calibra el aparato con las soluciones tampón de pH 7 y pH 4 de Crison (Barcelona, España).

### *Índice de peróxidos*

Se denomina índice de peróxidos a los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de materia ensayada, calculados a partir del yodo liberado a partir del yoduro potásico, operando en las condiciones que se indican en el procedimiento.

Se supone que las sustancias que oxidan el yoduro en las condiciones descritas son peróxidos u otros productos similares de oxidación de la grasa, por lo que el índice obtenido puede tomarse, en una primera aproximación, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la grasa.

Se siguió el procedimiento descrito en la UNE-EN ISO 3960: Aceites y grasas de origen animal y vegetal, utilizando una solución valorada de tiosulfato 0,01N de Scharlau (Barcelona, España) hasta viraje a color blanco. Se pesan de 1 a 10 gramos de muestra en un Erlenmeyer y se añaden 10 ml de cloroformo, 15 ml de ácido acético glacial y 1 ml de disolución saturada de yoduro potásico (KI). La mezcla se debe mantener 5 minutos en oscuridad para, a continuación, añadir 75 ml de agua y 2 ml de solución de almidón 1% . Se determina mediante valoración, el volumen consumido de tiosulfato hasta viraje a color blanco (se hace un blanco con los reactivos sin añadir muestra).

El índice de peróxidos se expresa en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra con una cifra decimal y se calculará aplicando la fórmula siguiente:

$$M_{eq} O_2 / Kg = (V_m - V_b) N \frac{1000}{P}$$

***Ecuación 1. Cálculo de la concentración de  $M_{eq}$***

Dónde:  $V_m$  es el volumen consumido en la valoración de la muestra en mL;  $V_b$  es el volumen consumido en la valoración del blanco en mL, N es la normalidad de la disolución de tiosulfato utilizada y P es el peso de la muestra de alcachofa en gramos. El 1000 es para expresar el resultado en Kg

El análisis se realizará por duplicado y se aceptará el valor cuando la diferencia relativa entre los resultados obtenidos sea menor o igual al 10%. Esta diferencia la calcularemos de la forma siguiente:

$$Diferencia (\%) = \frac{R_{mayor} - R_{menor}}{R_{menor}} \times 100$$

***Ecuación 2. Cálculo de Diferencia resultados***

Donde  $R_{mayor}$  y  $R_{menor}$  son los dos resultados, mayores y menores respectivamente, obtenidos en la realización del ensayo.

Se rechazará cuando el volumen consumido de valorante sea superior a la capacidad de la bureta, en cuyo caso se cogerá menor cantidad de muestra.

## **Análisis microbiológicos**

### *Recuento de aerobios mesófilos*

En condiciones estériles, se pesaron aproximadamente 10 g de cada muestra en una bolsa de plástico especial para homogeneizadores, añadiendo 90 mL de agua de peptona (Biorad, Francia), obteniendo así una dilución 1/10. Ambas operaciones se realizaron en un equipo de alta precisión, que permite la pesada de la muestra y el cálculo automático

de la cantidad de diluyente necesaria para obtener la dilución deseada (Delta dilutor, España) y a continuación se introdujo la bolsa en un homogeneizador (Stomacker, España) durante 30 segundos. A partir de la primera dilución (dilución madre), se toma 1 mL de ésta y se pasa a un tubo con 9 mL de agua de peptona (dilución 1/100). Se repite esta operación si se desean mayores diluciones. Tras esta operación, se procedió a la siembra en placa Petri por duplicado, depositando 1 mL en cada una de ellas y entre 15-20 mL aproximadamente de agar de recuento en placa (PCA, Scharlau, España), licuado y atemperado en cada placa. El PCA contiene 5g/L de peptona de caseína, 2,5g/L de extracto de levadura, 1,0g/L D (+) glucosa y 14g/L de agar-agar. Tras ello, se mezclan perfectamente en la placa el medio y el inóculo, con movimientos circulares a favor y en contra de las agujas del reloj, evitando que el medio de cultivo impregne la tapa, manteniendo las placas en superficie horizontal hasta que se solidifique el agar completamente. Una vez solidificado el agar, se invierten las placas e introducen en la estufa evitando que se apilen en exceso, incubando a 30 °C durante 48 horas.

Tras el periodo de incubación, se cuentan las placas entre 30 y 300 colonias, marcando las mismas para evitar volver a contarlas. A continuación, se halla la media y se multiplica por el factor de la dilución, expresando los resultados en unidades formadoras de colonias por gramo (Pascual y Calderón, 2000).

### *Escherichia Coli*

El procedimiento fue el mismo que para aerobios mesófilos, diferenciándose en el medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación, que en el caso de *E. coli* las placas se incuban a 37 °C durante 24-48 horas. Se utiliza como medio de cultivo agar cromogénico Rapid E. coli 2™ (Biorad, Francia), adicionando entre 15-20 mL por placa.

Tras el periodo de incubación, se cuentan las placas que presentan entre 30 y 300 colonias aisladas. Las colonias de *E. coli* presentarán una coloración azul y las de coliformes mostrarán una coloración rosada. A continuación, se halla la media y se multiplica por el factor de la dilución de la placa elegida, expresando los resultados en unidades formadoras de colonias por gramo (Pascual y Calderón, 2000).

#### *Salmonella spp.*

El equipo mini-VIDAS (Biomérieux, Francia) fue utilizado para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*. Para ello, se toman  $25 \pm 0,5$  gramos de alcachofa, se cortan en pequeñas porciones y se diluyen con  $225 \pm 4,5$  mililitros de agua de peptona tamponada en una bolsa estéril de Stomacher (BagPage S 400, BagSystem, Interscience, St-Nom-la-Breteche, France), incubándolas a  $37 \pm 1$  °C durante  $18 \pm 2$  horas tras la homogeneización. Tras ello, se transfiere 0,1 mL del caldo de pre-enriquecimiento a 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis soja (Biomerieux, Francia), incubando a  $41,5 \pm 1$  °C durante 6-8 horas. Paralelamente, se transfiere 1 mL de caldo de pre-enriquecimiento a 10 mL de caldo Muller-Kauffmann (Biomerieux, Francia) con tetracionato y novobiocina (MKTTn), incubando a  $37 \pm 1$  °C durante 6-8 horas. Tras incubar los caldos de enriquecimiento, se transfiere 0,1 mL del caldo MKTTn a 10 mL de caldo M y 1 mL del caldo Rappaport Vassiliadis soja, RVS (Biomerieux, Francia) a otros 10 mL del caldo M (Biomerieux, Francia). A continuación, se vuelven a incubar los caldos MKTTn y RVS a sus respectivas temperaturas durante 16-20 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se homogenizan los tubos de caldo M y se transfiere 1 mL de cada tubo a un solo tubo. A continuación, se calienta el tubo en baño maría ( $95-100$  °C) durante  $15 \pm 1$  minutos. Tras enfriar el tubo, se mezcla el caldo y se transfieren 0,5 mL al pocillo de la muestra del cartucho mini-VIDAS SLM (que contiene los inmunorreactivos), completándose el ensayo en 45 minutos. El rendimiento

de fluorescencia en el equipo VIDAS indica la presencia presuntiva de *Salmonella spp.*, confirmando los posibles positivos por cultivo, mediante siembra en agar Hecktoen Enteric (Scharlau, Barcelona, España) y XLD (Biokar, Francia). Para su confirmación se toma al menos una colonia considerada como típica o sospechosa presente en la placa correspondiente a cada medio selectivo y luego, otras cuatro colonias si la primera es negativa. Se re-aíslan las colonias seleccionadas en la superficie de las placas de agar nutritivo (PCA), de manera que se obtengan colonias bien aisladas. Las placas sembradas se incuban a  $37 \pm 1$  °C durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . A partir de las colonias en agar nutritivo, se realiza la confirmación bioquímica empleando un Kit comercial de incubación de Enterobacterias (Biokar, Francia). Se dará un resultado positivo para *Salmonella* en aquellas muestras que hayan dado resultado positivo en el equipo miniVIDAS y den colonias típicas en los medios selectivos, confirmadas mediante pruebas bioquímicas incluidas en el Kit de identificación. El resultado se expresará como Ausencia ó Presencia de *Salmonella spp.*

#### *Listeria monocytogenes*

Para la determinación de *Listeria* mediante el equipo mini-VIDAS SLM, se procede de igual forma que en el caso de *Salmonella*, variando los medios de enriquecimiento y tiempos de incubación.

Básicamente, se toman  $25 \pm 0,5$  gramos de alcachofa, se cortan en pequeñas porciones y se diluyen con  $225 \pm 4,5$  mililitros de medio de cultivo Fraser (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) en una bolsa estéril de Stomacher (BagPage S 400, BagSystem, Interscience, St-Nom-la-Breteche, France), incubándolas a  $30 \pm 1$ °C durante  $24 \pm 2$  horas tras la homogeneización. Tras ello, se hace un segundo enriquecimiento inoculando 0,1 mL del caldo de pre-enriquecimiento en 10 mL de caldo Fraser,

incubando a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se homogenizan los tubos y se transfiere 1 mL de cada tubo a un solo tubo. A continuación, se calienta el tubo en baño maría ( $95\text{-}100^\circ\text{C}$ ) durante  $15 \pm 1$  minutos. Tras enfriar el tubo, se mezcla el caldo y se transfieren 0,5 mL al pocillo de la muestra del cartucho VIDAS (que contiene los inmunorreactivos), que para este patógeno es mini-VIDAS LMO (bioMérieux), completándose el ensayo en 45 minutos. El rendimiento de fluorescencia en el equipo VIDAS indica la presencia presuntiva de *Listeria monocytogenes*, confirmando los posibles positivos por cultivo, mediante siembra en agar Palcam y Oxford (Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Para su confirmación se toma al menos una colonia considerada como típica o sospechosa presente en la placa correspondiente a cada medio selectivo y luego, otras cuatro colonias si la primera es negativa. A partir de las colonias típicas aisladas, se toma una colonia característica y bien definida para realizar la confirmación bioquímica empleando el kit de identificación de Listeria Microgen Listeria ID o cualquier otro kit de identificación validado. El kit contiene las pruebas de hidrólisis de la esculina, fermentación de azúcares y hemólisis, permitiendo diferenciar *Listeria monocytogenes* y el resto de especies de *Listeria*. Se dará un resultado positivo para *Listeria monocytogenes* en aquellas muestras que hayan dado resultado positivo en el equipo miniVIDAS y den colonias típicas en los medios selectivos, confirmadas mediante pruebas bioquímicas incluidas en el Kit de identificación. El resultado se expresará como Ausencia ó Presencia de *Listeria monocytogenes*.

#### *Enterobacterias Totales*

Se siguió el procedimiento basado en ISO 21528-2:2004, UNE-EN ISO 7218 y UNE-EN ISO 7218:2008/A1 basados en el recuento total de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae presentes en alimentos, mediante el aislamiento e

identificación con medio VRBG agar y posterior confirmación de las colonias características.

Los microorganismos de esta familia son de forma bacilar, gram negativos, fermentadores de glucosa, oxidasa negativa y crecen en medios con sales biliares, formando colonias características en el medio VRBG agar.

Se prepara el medio de cultivo VRBG Agar, siguiendo las instrucciones de la casa suministradora y se prepara una suspensión inicial de la muestra de manera que se obtenga una distribución, tan homogénea como sea posible, de los microorganismos presentes en la fracción de ensayo. Una vez realizada la preparación de la muestra y las diluciones decimales necesarias se siembra sobre placas Petri 1ml  $\pm$  2% de la muestra a analizar (si es líquida) o 1 ml  $\pm$  2% de la dilución inicial o madre (1/10) para el resto de productos. Si se sospecha que la muestra presenta una concentración elevada de Enterobacterias, se siembra 1ml  $\pm$  2% de las diluciones decimales superiores utilizando una nueva pipeta estéril para cada dilución.

Se realiza la siembra de una sola placa por dilución para un mínimo de dos diluciones consecutivas.

Añadir, a cada placa sembrada, aproximadamente 10 ml de medio de cultivo VRBG previamente preparado y atemperado entre 44° C y 47° C en baño de agua. El tiempo máximo, entre la distribución del inóculo en las placas y verter el medio de cultivo en las mismas, no debe exceder de 15 minutos. Mezclar perfectamente medio e inóculo con suave agitación para evitar derrames y un movimiento circular a favor y en contra de las agujas de reloj.



Dejar solidificar el medio sobre una superficie horizontal, y cuando este sólido se cubre con una capa de unos 15 ml de agar VRBG atemperado evitando que se produzca un crecimiento extendido y generando unas condiciones de semi-anaerobiosis.

Una vez solidificado el medio, se invierten las placas y se colocan en una estufa donde se incuban a  $37\pm 1^\circ$  C durante  $24 \pm 2$  horas. Pasadas las 24 horas de incubación, se cuentan el número de colonias características por placa con un contador de colonias.

Para el recuento se tomarán las placas que presenten un número igual o inferior a 150 colonias típicas y aquellas que presenten un número igual o inferior a 300 colonias totales (colonias típicas y no típicas). Se contarán todas las colonias características de dichas placas. Se consideran colonias características las colonias de color rosa a rojas o púrpuras rodeadas o no de un halo de precipitación rojizo-violeta.

Una vez realizado el recuento, se eligen al azar 5 colonias características para subcultivarlas y realizar la confirmación. Ciertas Enterobacterias pueden causar la decoloración de sus colonias o del medio. Por lo tanto, cuando no aparezcan colonias características, se cogen 5 colonias blanquecinas para la confirmación.

Sembrar, sobre placas Petri de agar nutritivo o PCA, cada una de las colonias seleccionadas para la confirmación. Incubar estas placas a  $37\pm 1^\circ$  C durante  $24 \pm 2$  horas. Posteriormente, seleccionar colonias aisladas de cada una de las placas incubadas para realizar el test de confirmación.

.Test de la oxidasa: Con un asa estéril, se toma una porción de cada una de las colonias aisladas y se deposita sobre un papel de filtro impregnado con el reactivo de la oxidasa o sobre un disco disponible comercialmente. Se considera oxidasa-negativa si el

color del papel de filtro no se oscurece en un tiempo de 10 segundos. Para los discos disponibles comercialmente consultar las instrucciones del fabricante.

.Test fermentación glucosa: Usando un asa de estéril, se siembran en agar glucosa las mismas colonias seleccionadas que dan la reacción de oxidasa como negativa. Se considera la reacción positiva si se produce un viraje del medio a color amarillo.

Las colonias que son oxidasa-negativas y glucosa positivas se confirman como Enterobacterias. El recuento de colonias debe realizarse al menos en una placa que contenga como mínimo 10 colonias (colonias totales, típicas o que cumpla los criterios de identificación).

El número de microorganismos N presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas.

#### *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* es una especie bacteriana integrada por forma cocáceas, agrupándose irregularmente en racimos. Son inmóviles, carecen de esporas y son Gran-positivos. Son muy sensibles a la acción del calor y de los desinfectantes. Su presencia o la de sus toxinas en los alimentos es signo evidente de falta de higiene.

Puede ocurrir que no se detecte el *S. aureus* en un alimento o que el número de detectados sea pequeño y que, sin embargo, exista cantidad detectable suficiente de enterotoxina estafilocócica. En este caso, los gérmenes que originaron la toxina han ido descendiendo en número e, incluso, desapareciendo, mientras que la toxina, por su mayor resistencia, permanece en el alimento.

La determinación comienza preparando una serie de diluciones decimales del alimento y se ponen por duplicado en cantidades de 0,1 mL en placas con medio de Baid-Parker, ya solidificado y bien seco. Se extiende el inóculo por toda la superficie del medio, utilizando una varilla de vidrio acodada, o bien del tipo de un solo uso. Se incuba a 37°C durante 24 horas. Si no aparecen colonias se vuelve a incubar otras 24 horas más. El *S. aureus* forma colonias típicas que tienen 1,0-1,5 mm de diámetro y son negras brillantes. Convexas, con margen blanco estrecho y entero estando rodeadas por zonas claras que se extienden 2.5 mm por el medio opaco.

Se toman todas las colonias características, o un cierto número de ellas y se ensaya la producción de coagulasa. La ausencia de coagulasa no excluirá automáticamente el diagnóstico de intoxicación alimentaria por estafilococos. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo (Pascual y Calderón, 2000).

### **Análisis sensorial**

El objetivo del estudio realizado es evaluar las características organolépticas del gazpacho y la pasta fresca refrigerada con tres referencias distintas.

A la hora de diseñar y realizar la prueba así como analizar y evaluar los resultados de la misma se han aplicado las siguientes normas:

- UNE-ISO 6658:2008. Análisis sensorial de alimentos. Metodología.
- UNE-ISO 4121:2006. Análisis sensorial. Directrices para la utilización de escalas de respuesta cuantitativas.
- UNE-EN-ISO 5492:2010. Análisis sensorial. Vocabulario.
- UNE-EN-ISO 8589:2010. Análisis sensorial. Guía diseño de salas de cata.

Como fuente bibliográfica complementaria se ha empleado el “Análisis sensorial”. Normas UNE. AENOR.

Se realizó una prueba de aceptación para conocer la opinión de los consumidores sobre las muestras sometidas a estudio. La prueba se realizó en las cabinas de una sala de cata. De esta forma se igualan las condiciones externas que rodean a los catadores. El panel que realizó la prueba se compuso de 60 catadores para minimizar en lo posible la variabilidad asociada a este tipo de pruebas hedónicas no descriptivas. Los catadores que intervinieron constituían un grupo homogéneo de consumidores habituales de este tipo de productos. Las muestras de gazpacho y de pasta a comparar se presentaron identificadas con distintos códigos. Se predeterminó el orden en que se presentaron las muestras a cada sujeto de forma que cualquier ordenación posible apareció el mismo número de veces. La cantidad de muestra necesaria, la temperatura adecuada de la misma y los materiales y utensilios para realizar la cata se proporcionaron a todos los catadores en igualdad de condiciones. El tiempo del que dispusieron no se limitó y en todos los casos osciló entre 5 y 10 minutos. Cada persona que participó en la cata recibió un cuestionario previamente diseñado (*Figura 12*). En él se pedía evaluar los parámetros color, olor, sabor, textura, aspecto y valorar globalmente el producto utilizando una escala hedónica de intervalo cinco puntos en la que 1 corresponde a “Me desagrada mucho” hasta 5 que corresponde a “Me gusta mucho”. También se le pedía registrar la preferencia positiva o negativa de cada producto y se dejaba también un campo abierto para comentar cualquier dato que el catador considerara interesante señalar así como si pensaban que se había dejado de lado algún otro atributo importante para este tipo de productos. Los resultados obtenidos se someten a los siguientes tratamientos estadísticos: cálculo de la media aritmética de las puntuaciones efectuadas sobre cada característica evaluada en las muestras sometidas al comparativo, cálculo de

la desviación estándar, cálculo del coeficiente de variación, si es superior al 50% se considera que la población estadística es heterogénea, estimación del nivel de significación de las diferencias entre las medias calculadas (distribución normal). Esta prueba se aplica para comparar el valor de una media entre poblaciones diferentes. A partir del valor obtenido y teniendo en cuenta los grados de libertad se obtiene, utilizando las tablas correspondientes, el nivel de significación.

**Análisis sensorial**

**CUESTIONARIO GAZPACHO**

Se presentan tres muestras de gazpacho, valora marcando con una cruz cuánto le agradan del 1 al 5, teniendo en cuenta lo siguiente:

1 Me desagrada mucho      3 No me agrada ni me desagrada      5 Me gusta mucho  
 2 No me gusta              4 Me gusta

	628					253					354				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
OLOR															
COLOR															
TEXTURA															
SABOR															
VALORACION GLOBAL															
¿Cuál te gusta más y por qué?															
COMENTARIOS															

En Méjicas de Segura s:

MUCHAS GRACIAS

**Figura 12.** Cuestionario tipo utilizado en catas

De acuerdo a la guía para la realización de estudios de vida útil publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un control sensorial durante el estudio de vida útil para determinar la aceptabilidad organoléptica del producto, realizando una cata con el personal del departamento, expertos en la fabricación de platos preparados comerciales, compuesto por seis personas de edades comprendidas entre 30-60 años. En este análisis cada juez puntúa la muestra con un valor de “TIPICO” o “ATIPICO” de acuerdo a la experiencia de los jueces.

## **Análisis Nutricional**

### *Determinación de cenizas totales.*

Las cenizas se determinaron por gravimetría después de la calcinación de la muestra en un horno de mufla. El método seguido para la determinación de cenizas fue el descrito por la AOAC (1980) aplicado a vegetales.

Se incineró la cápsula de porcelana en la mufla a 50° C durante una hora. Se dejó enfriar en el desecador y seguidamente se pesó. Se pesaron entre 5 y 10 g de muestra en la cápsula. Se colocó la cápsula sobre la placa calefactora dentro de la campana de extracción de humos y se calentó hasta que la mayor parte de los compuestos orgánicos se hubieron quemado, permaneció en la placa encendida hasta que dejó de desprender humo, después se apagó la placa y la cápsula se dejó reposar unos minutos.

Se pasó la cápsula a la mufla caliente, se calcinó hasta que los componentes orgánicos desaparecieron totalmente y quedó un residuo libre de restos negros de carbón. Se puso la cápsula con el residuo en el desecador para que se enfríe y se pesó seguidamente.

El resultado se expresa en % con dos cifras decimales según la fórmula que sigue:

$$\text{Cenizas (\%)} = (\text{Peso}_{\text{final}} - \text{Peso}_{\text{cápsula}}) / (\text{Peso}_{\text{muestra}}) \times 100$$

### ***Ecuación 3. Cálculo del contenido en cenizas***

Peso final = peso de la cápsula conteniendo las cenizas.

### *Determinación de humedad*

La determinación del contenido de humedad se realizó en un analizador halógeno. El instrumento trabaja según el principio termogravimétrico. El equipo dispone de una balanza de precisión-integrada en el instrumento que mide el peso continuamente. Se

pesaron 2g de muestra en un portamuestra y se extendió lo máximo posible. Se introdujo en el equipo y se secó mediante un radiador halógeno hasta peso estable. El resultado se expresa en % o mg/100 g. (Horwith, W., 1984).

#### *Determinación de la grasa*

Se realiza utilizando el método de extracción Soxhlet descrito por Regueiro (2006). Se desecaron los vasos en la estufa a  $105 \pm 2$  °C durante una hora, se dejó enfriar en el desecador y se pesaron. Se colocó un poco de algodón en el fondo del cartucho (encajado en el adaptador magnético sobre el dedal). Se taró todo el conjunto, se pesaron de 2 a 5 g de muestra (según el contenido en grasa esperado) en el cartucho y se tapó la muestra con algodón.

Con la ayuda de los soportes de dedales y la gradilla niveladora se introdujo cada dedal de extracción provisto del adaptador magnético en una columna de destilación de la unidad de extracción. Se abrió el circuito de refrigeración y se adicionaron 60 mL de éter dietílico por la parte superior de cada columna de extracción. Se puso en marcha la unidad de calefacción. Después de 1 hora de extracción los cartuchos fueron elevados sobre el nivel del disolvente en ebullición de forma que el condensado caiga sobre la muestra produciendo el arrastre de la grasa remanente. Mantener así durante 2 horas.

Se cerró la válvula de recuperación. El condensado quedó retenido por ésta y en unos 5 minutos todo el disolvente fue recuperado. Para favorecer la total eliminación del disolvente de los vasos se agita en el sentido inverso a las agujas del reloj y a la vez introduce aire en la unidad de calefacción. A continuación se apagó la calefacción y se elevó la batería de columnas de destilación desbloqueando y accionando la unidad de extracción. Se retiraron los vasos y desecó en la estufa a  $105 \pm 2$ °C; se dejó enfriar en el desecador y se pesó (Bligh y Dyer, 1959).

El contenido en grasa bruta de la muestra se calcula de la forma siguiente:

$$\text{Grasa bruta (\%)} = \frac{P_f - P_o}{P_m} \times 100$$

***Ecuación 4. Cálculo del contenido en grasa***

Donde: Pf = peso final del vaso con la grasa extraída. Po = peso inicial del vaso vacío.

Pm = peso de la muestra.

*Determinación de proteínas*

Realizado según Análisis de Alimentos (Métodos oficiales y recomendados por el Centro de Investigación y Control de Calidad). Ministerio de Sanidad y consumo. Secretaría general técnica. Servicio de publicaciones.1985

La cantidad de proteínas totales se cuantificó por el método de Kjeldahl, calculada como nitrógeno Kjeldahl multiplicado por 6,25 (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1985). En un matraz de digestión Kjeldahl se adicionó de 1 a 3 g de mermelada. Se añadió 1 g de catalizador y 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se calentó suavemente al principio y enérgicamente cuando transcurrieron 15 minutos. Se hirvió hasta que la disolución se aclaró y se quedó transparente. Se enfrió y se añadió agua desionizada hasta llegar a unos 100 mL. Se colocó el matraz en el destilador, se añadió 50 mL de hidróxido sódico al 30% para neutralizar, se destiló la mezcla hasta recoger el destilado en un matraz de 250 mL donde se pusieron 30 mL de ácido bórico al 2% con un 1% de indicador llevados a 100 mL aproximadamente con agua. Se consideró terminada la destilación cuando el volumen en el erlenmeyer fué de 200 mL. A continuación se procedió a la valoración de la muestra con HCl 0,05N ó 0,1N.

El resultado se expresa en g/100g de proteínas con dos cifras decimales y se calcula con la siguiente fórmula:



$$\text{Proteínas (g/100g)} = \frac{N \times 1,4 \times 6,25 \times (V - V_b)}{P_m}$$

***Ecuación 5. Cálculo de la proteína***

Donde: N = normalidad del HCl empleado. V = volumen en mL de valorante consumido. V<sub>b</sub> = volumen de mL consumido por un blanco que se hará con todos los reactivos pero sin muestra. P<sub>m</sub> = peso en gramos de la muestra. V<sub>m</sub> = volumen en litros de la muestra.

El ensayo se realizó por triplicado y se aceptó dicho valor cuando la diferencia entre los resultados sea inferior al 5%.

*Hidratos de carbono.*

Según método descrito por la Directiva 90/496/CEE y modificaciones posteriores y “Análisis Moderno de los alimentos”. Hart, F.L. y Fisher, H.J. Editorial Acribia, S.A.

Los hidratos de carbono los constituyen principalmente dos grupos de sustancias:

- Los azúcares simples, monosacáridos y disacáridos: glucosa, sacarosa, fructosa, lactosa.
- Polisacáridos como el almidón.

Se usa el término “hidratos de carbono por diferencia” o “hidratos de carbono totales” para referirnos al valor obtenido restando de 100 la suma de los porcentajes de la grasa, la proteína, las cenizas y la humedad. (RD. 930/92, de 17-07, BOE 5-08-92).

*Determinación de sodio/sal*

La determinación de sodio en alimentos por Cromatografía Iónica (rango 20 -20000 mg/Kg) usando una fase móvil ácido Nítrico/ Eter18-corona-6, una columna de separación de cationes de alcohol polivinílico con grupos carboxilo para separar en función del tamaño y carga, y un detector de conductividad.

La muestra a analizar deberá ser triturada y homogeneizada previamente. Una vez triturada se llevará a cabo el proceso de extracción. Para la extracción, se pesará una cantidad de muestra triturada y será llevada a un vaso de precipitados con 80 mL de agua desionizada a 80 °C durante media hora, en una placa calefactora con agitación.

Dejaremos que se enfríe a temperatura ambiente y lo llevaremos a un matraz aforado de 100 ml que enrasaremos con agua desionizada. En este punto, la muestra debe ser filtrada con un filtro de 0,45 µm para poder proceder a su medida en el cromatógrafo iónico.

La cantidad de muestra que se pesará para realizar el proceso de extracción será aquella que nos permita obtener una alícuota de la muestra con una dilución comprendida entre 1:10 y 1:100. Por término general se pesarán 10 g de muestra y se llevarán a un volumen final de 100 ml, obteniendo de este modo una dilución 1:10.

A partir de la solución patrón de concentración definida (aproximadamente 1000 mg/L), se procederá a la elaboración de la curva de calibrado.

El sistema cromatográfico utilizado será un cromatógrafo iónico Metrohm MIC-2 Advanced, automuestreador con sistema de ultrafiltración in-line – sistema de inyección automático, y detector de conductividad dentro de una caja de aislamiento térmico y electromagnético. Las condiciones de trabajo son: Flujo: 0.80 mL/min, temperatura: 25°C, presión del Sistema: 8.0 – 12.0 MPa y volumen de inyección: 20µL

El equipo también tiene en cuenta el factor de dilución a la hora de dar el resultado final. Este factor debe ser introducido para cada una de las muestras, y se calcula de la siguiente manera:

$$F_d = V_f / V_m$$

***Ecuación 6. Cálculo del factor de dilución***

Donde: Factor de dilución = Fd; Volumen final en mL = Vf; Volumen de la muestra en mL = Vm.

La expresión de resultados se dará mg/Kg y para expresarlo como cloruro sódico (sal), se multiplicará el dato del sodio por el factor 2,54.

*Valor energético.*

El valor energético se define como la cantidad de energía que se origina cuando el alimento es totalmente oxidado o metabolizado (RD 930/1992).

Se expresa por 100 g de producto y se calculó mediante los siguientes factores de conversión que se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Factores de conversión

	Kcal/g	KJ/g
<i>Hidratos de carbono</i>	4	17
<i>Proteínas</i>	4	17
<i>Grasas</i>	9	37

Los cálculos se realizaron de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Kcal}}{100\text{g}} = \left( \text{Proteínas}/100\text{g} + \text{Hidratos de carbono}/100\text{g} \right) \times 4 + \left( \text{Grasa}/100\text{g} \right) \times 9$$

**Ecuación 7.** Cálculo de las kcal

$$\frac{\text{KJ}}{100\text{g}} = \left( \text{Proteínas}/100\text{g} + \text{Hidratos de carbono}/100\text{g} \right) \times 17 + \left( \text{Grasa}/100\text{g} \right) \times 37$$

**Ecuación 8.** Cálculo de los KJ

### **Determinación de multirresiduos de plaguicidas**

Se realiza la determinación de plaguicidas por la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador triple cuadrupolo LC-MS/MS QQQ (Método QuEChERS). El rango de aplicación se establece entre el límite de cuantificación (0,01 mg/Kg) y el límite máximo (2 mg/Kg). Para los plaguicidas con LMR mayor de 2 e inferior o igual a 6 mg/Kg el límite máximo será 7 mg/Kg.

Este procedimiento está basado en el Documento SANCO “Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed”, norma UNE-EN 15662, UNE-EN 12393-1/3 y la Directiva 96/23/CE

Se prepararán dos *disoluciones madre* de cada uno de los plaguicidas especificados a partir de materias activas certificadas comerciales codificadas por el laboratorio, utilizando como disolvente acetonitrilo.

Se preparará un estándar interno (ISTD), Trifenil fosfato, a partir de su materia activa certificada comercial, codificada también por el laboratorio, utilizando de igual modo acetonitrilo como disolvente. A partir de este patrón madre, se prepara uno de concentración 1 ppm, que será el que se añada a cada una de las diluciones de la recta de calibrado, para tener una concentración constante de ISTD de 0,05 ppm en cada uno de los puntos de la recta.

A partir de dichas *disoluciones madre* se prepararán dos *multipatrones* en acetonitrilo, cuyos analitos se encontrarán a una concentración de 1 ppm.

Con uno de los *multipatrones* se prepararán diluciones con matriz blanca extraída en acetonitrilo, de donde obtendremos la *recta de calibrado*. Su preparación se hará de acuerdo a la **Tabla 8**.

**Tabla8.** Patrones de calibración

<i>PATRONES DE CALIBRACIÓN</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Volumen patrón 1 ppm (µL)	50	100	250	500	1000
Volumen ISTD 1 ppm (µL)	500	500	500	500	500
Concentración final (ppb)	5	10	25	50	100
Volumen final (mL)	10	10	10	10	10

El rango lineal de medida absoluto es de 0.005 a 0,1mg/Kg. El segundo *multipatrón* se utilizará para la preparación de patrones de verificación y muestras fortificadas. Para asegurar que la preparación de un nuevo multipatrón es correcta, se procederá a la realización de tres medidas del multipatrón antiguo y tres del nuevo a una concentración igual a uno de los puntos de la recta. Con las seis medidas obtenidas se calculará el coeficiente de variación., que debe ser menor o igual al 10% (para las materias activas que se degradan con facilidad se admite un 15%).

Será aceptada la linealidad de respuesta entre las concentraciones inyectadas siempre y cuando el coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0,995$ .

Se calculará el factor de respuesta (FR) de cada punto de la función, según la siguiente expresión:

$$FR = \frac{A_{\text{Plaguicida}} / A_{\text{ISTD}}}{C_{\text{Plaguicida}} / C_{\text{ISTD}}}$$

***Ecuación 9. Ecuación del cálculo del factor de respuesta***

A continuación se calculará la media y coeficiente de variación de los factores de respuesta obtenidos, que debe ser  $\leq 20$  %.

Tanto la recta de calibrado como el coeficiente de correlación,  $r$ , los FR, media y coeficiente de variación de dichos factores de respuesta son calculados por el software del equipo, Agilent Mass Hunter Workstation.

La cantidad mínima de muestra necesaria para la realización del ensayo será de 250 g.

Una vez referenciada se procederá a la toma de muestra de acuerdo con el Real Decreto 280/1994 o posteriores modificaciones, que establece los criterios a tener en cuenta para la toma de muestra según el material vegetal a analizar.

Las concentraciones de los plaguicidas en la muestra problema serán calculadas introduciendo la relación de áreas entre la materia activa y el ISTD detectada en la muestra, en la recta de calibrado. Este proceso lo realiza automáticamente el software del equipo, Agilent Mass Hunter Workstation.

Las señales se deberán repasar individualmente para comprobar su integración e integrar manualmente si fuese necesario.

Se considerará como **resultado positivo**, todo aquel analito que después de identificarse y confirmarse, el resultado obtenido al cuantificarse fuese  $\geq LQ$  (límite de cuantificación).

El resultado se dará con tres cifras significativas para valores iguales o superiores a 10 mg/Kg o ppm y con dos cifras significativas para los inferiores a 10 mg/Kg o ppm.

Cuando los resultados estén por debajo del LQ aparecerán como:  $< LQ$ .

EL Sistema Cromatográfico Líquido acoplado a Espectrómetro de Masas con Analizador Triple Cuadrupolo 6410B Agilent Technologies se compone de:

- a) Sistema cromatográfico con volumen de inyección es 5  $\mu$ L y el gas  $N_2$  será calidad 5.0, Cromatógrafo Líquido *Agilent Technologies 1200 Infinity Series* desgasificador de vacío, sistema de bombeo binario, automuestrador sistema de inyección automático y compartimento termostatado de columna. Las

condiciones de trabajo son: Fase móvil A: Acetonitrilo 0.1% Ácido fórmico. Fase móvil B: Agua 2mM Formiato Amónico y 0.1% Ácido fórmico. Flujo: 0.6mL/min. Temperatura: 40°C. Programa de inyección: 5µl Sample + 95µl Fase Móvil (20%F.M. A + 80%F.M. B) Tiempo de análisis: 17 minutos Post-Time: 5 minutos. Columna: EC-C18, 3.0 x 100mm 2.7µm, por ejemplo del tipo Poroshell 120.

- b) Espectrómetro de Masas con Analizador Triple Cuadrupolo Tipo de Scan: Dynamic MRMDelta EMV: 400. Cycle Time: 500 ms.

### **Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias significativas entre las muestras sometidas a diferentes tratamientos, todos los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un test multivariante de Tukey. La interacción se consideró significativa cuando la probabilidad fue  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el soporte informático SPSS 19.0 (SPSS Ciencias, Chicago, USA). Los datos experimentales representan la media de al menos 3 determinaciones independientes, cada una de las cuales se repitió por duplicado. Para realizar el ajuste de los datos se utilizó el programa Microsoft Excel 2007.





## ***CAPÍTULO IV. RESULTADOS***



#### 4.1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE ALCACHOFA

El extracto de alcachofa se ha obtenido de acuerdo la metodología descrita en el capítulo III de materiales y métodos de esta tesis, donde los subproductos de alcachofa se mantienen en contacto con agua en un reactor usando una relación sólido/líquido de 1/4 (25Kg alcachofa/100Kg) a 98°C durante 1 hora. La fase líquida se separa por filtración, se concentra a vacíos (-0,6 bares) y a una temperatura de 80°C hasta eliminar el 80 % de agua. El producto obtenido se deshidrata en un liofilizador a -50°C y vacío máximo de 0,13 mbar durante 24 horas. Durante la realización de los procesos de obtención de extractos a partir de subproductos se ha llevado un control de los pesos más significativos que nos han permitido determinar el rendimiento del proceso, cuyos valore medios se representan en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Rendimiento procesos de extracción

MUESTRA	RENDIMIENTO (%) ( $\bar{X} \pm SD$ )
<i>Subproducto Alcachofa</i>	3,05±0,91

Este procedimiento de extracción acuosa coincide con el método publicado en la patente WO 2008/105023 que indica la obtención de extractos de hojas de alcachofa (brácteas, tallos, etc.) utilizando agua a 85°C durante 30 minutos y una relación 4:1 agua/hojas frescas. A continuación se llevan a cabo diversas etapas de filtración (microfiltración, ultrafiltración y ósmosis) del agua de cocción y el producto concentrado resultante es secado mediante atomización para obtener un producto refinado útil como nutraceútico.

Los rendimientos presentan valores similares a los obtenidos por Llorach y col., (2002) que obtienen entre un 3,2-3,6% de rendimiento.

#### 4.1.1. Caracterización de la materia prima subproducto de alcachofa

En primer lugar se procede a la caracterización de los subproductos utilizados como materia prima: subproducto A (Obtenido de elaboración de alcachofa escaldada) y subproducto B (Obtenido de la elaboración de alcachofa directa). Se han realizado análisis de microorganismos patógenos *Salmonella* y *Listeria spp*, concentración de plaguicidas, pH, humedad y contenido en cinarina. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Caracterización de subproductos de alcachofa

Parámetro	Extracto A ( $\bar{X} \pm SD$ )	Extracto B ( $\bar{X} \pm SD$ )	Significación
<i>Salmonella</i> /25g	Ausencia	Ausencia	NS
<i>Listeria spp</i> /25g	Ausencia	Ausencia	NS
Plaguicidas (mg/Kg)	Imidacloprid: 0,06 $\pm$ 0,01	Imidacloprid: 0,04 $\pm$ 0,01	NS
pH	5,23 $\pm$ 0,42	5,07 $\pm$ 0,36	NS
Humedad (g/100g)	88,5 $\pm$ 2,40	85,5 $\pm$ 2,60	NS
Cinarina (mg/Kg)	110,5 $\pm$ 41,77	52,2 $\pm$ 23,77	*

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

Los resultados que se indican en la **Tabla 10**, son valores medios de 3 muestras de subproducto utilizadas en los distintos procesos de extracción realizados. Los resultados analíticos garantizan la ausencia de microorganismos patógenos que limiten el uso de este subproducto para la elaboración del extracto. Con respecto a plaguicidas en algunas muestras se ha encontrado presencia de imidacloprid en una cantidad máxima de 0,06 mg/Kg, valor muy por debajo del límite de 0,5 mg/Kg permitido por Reglamento (CE) n° 396/2005 y posteriores modificaciones, para el consumo en fresco de alcachofa. Los valores de pH y humedad obtenidos coinciden con los valores típicos de la alcachofa de la variedad “*Blanca Tudela*” publicados por Ruíz-Canoa y col., (2014). El valor del

84,97% de humedad encontrado en el subproducto de alcachofa utilizado como materia prima, coincide con el publicado por Dueñas y col., (2009) del 85% en brácteas de alcachofa. Con respecto a los valores de cinarina obtenidos en las distintas muestras presentan un amplio rango de valores, teniendo en cuenta que en el subproducto se encuentran mayoritariamente hojas y tallos y parte del corazón, estos valores coinciden con los encontrados por Aubert y Foury, (1981); Lattanzio, (1981); Lattanzio y Van Sumere, (1987); Lattanzio y col., (1994), en distintas partes de la alcachofa. La desviación típica relativa es muy elevada debido a que los subproductos provienen de la mezcla de dos procesos de fabricación de alcachofa en conserva, el proceso de escaldado y el proceso directo. En el caso del proceso de escaldado las cantidades de cinarina que se encuentran son más elevadas que en el subproducto de alcachofa del proceso directo, pero industrialmente las empresas realizan simultáneamente estos dos procesos y no separan los subproductos obtenidos.

#### **4.1.2. Caracterización de compuestos bioactivos en extracto de alcachofa**

Se ha determinado el contenido fenólico total, expresado como mg de ácido caféico/kg y la cinarina (mg/Kg) utilizando las metodologías de Rodríguez-Carpena y col., (2011) y Zhu y col., (2004), respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** - Compuestos de interés en subproducto alcachofa

	<i>Extracto A</i> ( $\bar{X} \pm SD$ )	<i>Extracto B</i> ( $\bar{X} \pm SD$ )	<i>Significación</i>
<b><i>Fenoles Totales</i></b> (mg ácido caféico/Kg)	$8,6 \times 10^3 \pm 0,3$	$2,8 \times 10^3 \pm 0,4$	*
<b><i>Cinarina</i></b> (mg/Kg)	$1,8 \times 10^4 \pm 0,5$	$7,3 \times 10^3 \pm 0,3$	*

\*Diferencias significativas  $P < 0,05$

El extracto alcachofa A corresponde a los obtenidos de los subproductos de la producción de la conserva escaldada (tradicional), mientras que el extracto alcachofa B corresponde al obtenido de subproductos de la producción de conserva directa.

Dueñas y col., (2009) publican la metodología de extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos del procesamiento de alcachofas, concluyendo que los compuestos fenólicos más representativos en las hojas alcachofas son el ácido caféico (ácido 3,4 dihidroxicinámico) y la cinarina, entre otros, todos estos con propiedades antioxidantes.

Dueñas y col., (2009), realizan extracciones de compuestos de interés en brácteas de alcachofa utilizando distintos disolventes y los compuestos que encuentran son carotenoides en extracciones con éter, esteroides, cumarinas y taninos catéquicos en extracciones utilizando alcohol como disolvente y flavonoides, saponinas y compuestos reductores en las extracciones acuosas.

Fратиanni y col.,(2007) y Coinu y col., (2006), demostraron que las brácteas de alcachofa de algunas variedades poseen concentraciones importantes de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, es decir que contienen las mismas especies de compuestos

fenólicos que las hojas, y que las diferencias entre estas partes vegetales son principalmente cuantitativas, siendo el componente principal la cinarina.

Larrosa y col., (2002), obtuvieron  $4,4 \times 10^3$  mg caféico/kg en subproductos de alcachofa, y  $6,6 \times 10^3$  mg caféico/L en agua de escalde. Dabbou Sihem y col., (2014) publican para la variedad de alcachofa “Blanc d’Óran”, en extracto de brácteas escaldadas,  $6,6 \times 10^3$  mg caféico/kg, datos comparables a los obtenidos en el extracto B. Sin embargo, Cassano y col., (2005), en extracto de alcachofa clarificado, obtiene  $0,2 \times 10^3$  mg caféico/kg, este valor tan bajo se debe a que el extracto obtenido no se liofiliza. En otras publicaciones como la de Alamanni y col., (2007) en extracto liofilizado de alcachofa obtiene  $4,9 \times 10^3$  mg caféico/kg, valor dentro de los rangos obtenidos en los distintos extractos obtenidos (A y B).

Existen diferencias significativas en los valores obtenidos para cinarina y ácido caféico entre A y B. Esto corrobora que los subproductos, dependiendo del proceso industrial de la alcachofa (escalde o directa), influyen en la concentración de los compuestos fenólicos de manera significativa. Los resultados obtenidos en la concentración de cinarina demuestran que el proceso no destruye este compuesto de interés y su concentración se ve aumentada en una proporción 1/90 debido a la evaporación del agua.

Estos valores de fenoles totales son similares e incluso superiores a los obtenidos para otros vegetales. Así, por ejemplo, para pieles de naranjas, Fernández-López y col., (2004) y Braddock y col., (1995), publican valores entre  $1,8 \times 10^3$ - $2,4 \times 10^3$  mg/kg, Gil y col., (2002) y Redondo y col., (2012), para pieles de melocotón publican valores entre 621 y 1000 mg gálico/kg y para semillas de melocotón (Royal Glory)  $1,1 \times 10^3$  mg gálico/kg. Rodríguez-Burruezo y col., (2006) obtienen para pieles de pimiento rojo unos

valores de  $0,5 \times 10^3$ - $1,3 \times 10^3$  mg/kg. Sin embargo, Liv y col., (2007) señalan para lechuga valores superiores a  $15,0 \times 10^3$  mg gálico/kg, muy por encima de los valores obtenidos en nuestros extractos. Para pieles de tomate, Navarro-Gonzales y col (2011) publican valores de  $1,6 \times 10^3$  mg gálico/ kg.

En general, los valores de fenoles totales del extracto de alcachofa son superiores a los extractos obtenidos de otros subproductos.

#### 4.1.3. Caracterización de la capacidad antioxidante en extracto de alcachofa (métodos *in vitro*).

Se han realizado tres métodos para determinar la capacidad antioxidante del extracto de alcachofa: dos métodos *in vitro*, ABTS y FRAP, y uno *in vivo*, la impedancia eléctrica. La capacidad antioxidante del extracto de alcachofa está relacionado con su contenido en compuestos fenólicos

La determinación de la capacidad antioxidante total basada en el método FRAP y ABTS se realiza según la metodología descrita en el capítulo III de materiales y métodos. Los resultados obtenidos con ambos métodos se muestran en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Capacidad antioxidante de los extractos de alcachofa

	Extracto A ( $\bar{X} \pm SD$ )	Extracto B ( $\bar{X} \pm SD$ )	Significación
<b>FRAP</b> ( $\mu\text{MFe}^{+2}/\text{g}$ muestra)	$1,6 \times 10^4 \pm 0,8$	$7,8 \times 10^3 \pm 0,3$	*
<b>ABTS</b> ( $\mu\text{M}$ equivalentes Trolox/g)	$1,4 \times 10^3 \pm 0,3$	$0,9 \times 10^3 \pm 0,5$	NS

NS: no significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

En la **Tabla 12** se observa como el extracto de alcachofa A, que contiene más ácido caféico y cinarina (**Tabla 11**), es el que presenta mayor capacidad antioxidante de



acuerdo a los resultados obtenidos con el método FRAP,  $1,6 \times 10^4 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{g}$  del extracto A, frente a los  $0,8 \times 10^4 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{g}$  del extracto B, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). Las concentraciones obtenidas en ambos extractos, A y B, son muy superiores a los publicados por Kukic y col., (2007) en extractos de *Cynara cardunculus*,  $0,3 \times 10^3 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{g}$ , pero similares a los publicados por Gouveia y col., (2012) que obtiene  $6,75 \times 10^3 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{g}$  para extracto de alcachofa. Para hojas frescas de alcachofa, Pandino y col., (2011) publica valores muy por debajo, entre 4,2 y 10,7  $\text{mMFe}^{2+}/\text{kg}$ .

Muchos son los artículos referenciados que han publicado estudios sobre la capacidad antioxidante de los subproductos de alcachofa, sin embargo son pocos los que utilizan el método FRAP para su cuantificación por lo que se dispone de poca bibliografía con valores de referencia.

Estos valores obtenidos con el FRAP son similares a los obtenidos para brócoli, donde Barnejee y col., (2012), publican valores en torno a los  $15,0 \times 10^3 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{mL}$ , y superiores a otros como los publicados por Popa y col. (2011) para semillas de albaricoque con valores de  $0,8 \times 10^3 - 1,3 \times 10^3 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{mL}$ .

En cuanto los resultados de la capacidad antioxidante por el método ABTS, no se observan diferencias significativas para este parámetro entre los extractos, obteniéndose valores medios bajos. Esto señala que el método ABTS no es el adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de alcachofa, coincidiendo con lo publicado por Kuoski y col., (2005). Sin embargo, otros autores obtienen valores más elevados, Llorach y col., (2002), en extracto de alcachofa extraído con agua obtiene  $2,9 \times 10^3 \mu\text{MTrolox}/\text{g}$ ; Cassano y col., (2005) en extracto de alcachofa clarificado obtiene  $5,3 \times 10^3 \mu\text{MTrolox}/\text{litro}$  y Mabeau y col., (2007), valores en torno los

$7,0 \times 10^3 \mu\text{MTrolox/g}$  en extractos de alcachofa obtenidos con etanol. Dabbou Sihem y col., (2014) publican para la variedad de alcachofa “Blanc d’Óran” una concentración de  $6,3 \mu\text{MTrolox/g}$  ( $1,8 \mu\text{MTrolox/g}$ ) extracto alcohólico de brácteas escaldadas.

Estas diferencias podría deberse al disolvente utilizado, agua en nuestro caso frente a etanol empleado por estos autores.

Estos valores obtenidos para ABTS están por debajo a los obtenidos para brócoli y cebolla, donde Barnejee y col., (2012) y Larrosa y col., (2012) publican valores de  $4,7 \times 10^3 \mu\text{MTrolox/g}$  y  $4,3 \times 10^3 \mu\text{MTrolox/g}$  respectivamente, y para pimiento, donde Sim y col., (2008) obtienen  $2,7 \times 10^3 \mu\text{MTrolox/g}$ .

#### **4.1.4. Caracterización de la capacidad antioxidante en extracto de alcachofa (métodos *in vivo*)**

Este método de análisis se puso a punto con la intención de valorar *in vivo* la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de alcachofa a utilizar en esta Tesis (extracto A y extracto B). La utilización de la impedancia eléctrica para la medida de la capacidad antioxidante, presenta la ventaja de medir directamente la capacidad del agente y no del alimento sobre el que actúa éste, a diferencia de lo que ocurre en el resto de métodos *in vitro* descritos en la bibliografía, donde se determina un producto de reacción que resulta de la interacción antioxidante-alimento (Kuskoski y col., 2005).

Sin embargo al tratarse de un método que se basa en la medida del efecto antioxidante sobre un microorganismo vivo, tiene la desventaja que aquellos compuestos que presentan actividad antimicrobiana, además de la propia actividad antioxidante a evaluar, no son susceptibles de ser evaluados por este método.

En primer lugar se procede a la determinación de la posible capacidad antimicrobiana de los extractos de alcachofa, como se describe en la sección capítulo 3.1.4 de materiales y métodos, sobre cepas de *Sacharomices cerevisiae*, utilizando la medida indirecta de impedancia. En todos los casos (extracto A y B), se hicieron ensayos de control de cepa y medio. El control de cepa sin la adición de ningún antimicrobiano, nos indica el tiempo al que se inicia el crecimiento del microorganismo, así como la viabilidad del mismo. En cuanto al control de medio, en todos los casos el resultado debe ser negativo, es decir, no debe detectarse crecimiento alguno, ya que si lo hubiera, indicaría contaminación del medio. Tras someter a las células de levadura a estrés con peróxido de hidrógeno, se adicionó el agente antioxidante extracto A y extracto B al 2%. Se utiliza el doble de concentración que se utilizará en los siguientes ensayos, para asegurar que no tiene capacidad antimicrobiana y que no interfiere en la determinación de la capacidad antioxidante, mayor protección frente al estrés cuanto mayor sea la concentración del antioxidante.

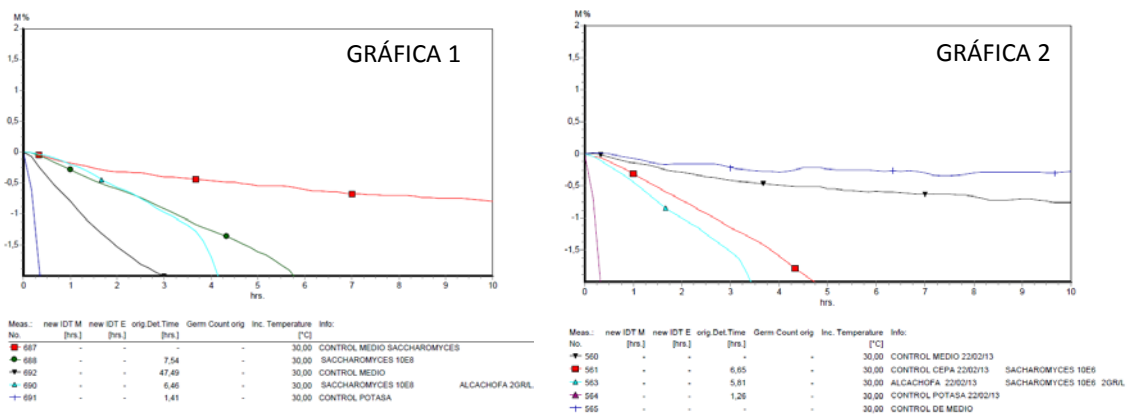
Los resultados obtenidos (Tabla 13), muestran que ambos extractos presentan el mismo tiempo de crecimiento que la levadura sin adición de extracto, lo que implica que este compuesto no inhibe su crecimiento y por lo tanto no tiene poder antimicrobiano para levaduras.

**Tabla 13.** Tiempo necesario para el crecimiento en horas de *Sacharomices cerevisiae*

	<i>Extracto A 2%</i> ( $\bar{X} \pm SD$ )	<i>Extracto B 2%</i> ( $\bar{X} \pm SD$ )	<b>Sig</b>
<i>Cepa (horas)</i>	7,54	6,65	NS
<i>Potasa (horas)</i>	1,49 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,02	NS
<i>Cepa + Extracto (horas)</i>	6,46 $\pm$ 0,01	5,81 $\pm$ 0,02	NS
<b>Significación</b>	NS	NS	

NS: No significativo

De manera gráfica en la **Figura 13**, se observa que la curva de crecimiento de la levadura se superpone prácticamente con la curva de crecimiento de la levadura a las que se le añadió en la misma cantidad los dos extractos A y B, de alcachofa. La aplicación del test ANOVA con un nivel de significación superior al 5%, indica que no existen diferencias significativas entre el tiempo de crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* en el que se añadió extracto de alcachofa A y B. Así mismo, no se encontraron diferencias significativas, entre el crecimiento de la levadura con y sin adición de extractos.



- **GRÁFICA 1.** Tiempo necesario para el crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* en extracto de alcachofa A 2%.
- **GRÁFICA 2.** Tiempo necesario para el crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* en agente antioxidante extracto de alcachofa B 2 %.

**Figura 13.** Gráficas del tiempo de crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* a los que se añadió el 2% de extracto de alcachofa A (gráfica 1) y B. (gráfica 2)

Una vez determinado que los extractos no poseen capacidad antimicrobiana, se hace viable utilizar la técnica “*in vivo*” por impedancia eléctrica para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de alcachofa obtenidos, para lo que se utiliza el equipo BacTrac 4000 Series, de acuerdo al método descrito en el capítulo 3 de materiales y métodos de esta tesis. Tras someter a las células de levadura a estrés con peróxido de hidrógeno, se adiciona el agente antioxidante (extracto de alcachofa A y B)

con el propósito de verificar que el método funciona correctamente (mayor protección frente al estrés cuanto mayor sea la concentración del antioxidante).

Se preparan cinco viales (por triplicado), partiendo de un cultivo de levaduras (*Sacharomices Cerevisiae*) a una concentración de  $10^6$  ufc/mL:

- ✓ Vial 1: Control de potasa 1mM
- ✓ Vial 2: Control cepa Sacharomices
- ✓ Vial 3: Cepa oxidada (800  $\mu$ L de cepa + 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- ✓ Vial 4: Control Extracto Alcachofa A directo (800  $\mu$ L de cepa +100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100  $\mu$ L) a diferentes concentraciones (2%, 5% y 10%).
- ✓ Vial 5: Control Extracto Alcachofa B directo (800  $\mu$ L de cepa +100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100  $\mu$ L) a diferentes concentraciones (2%, 5% y 10%).

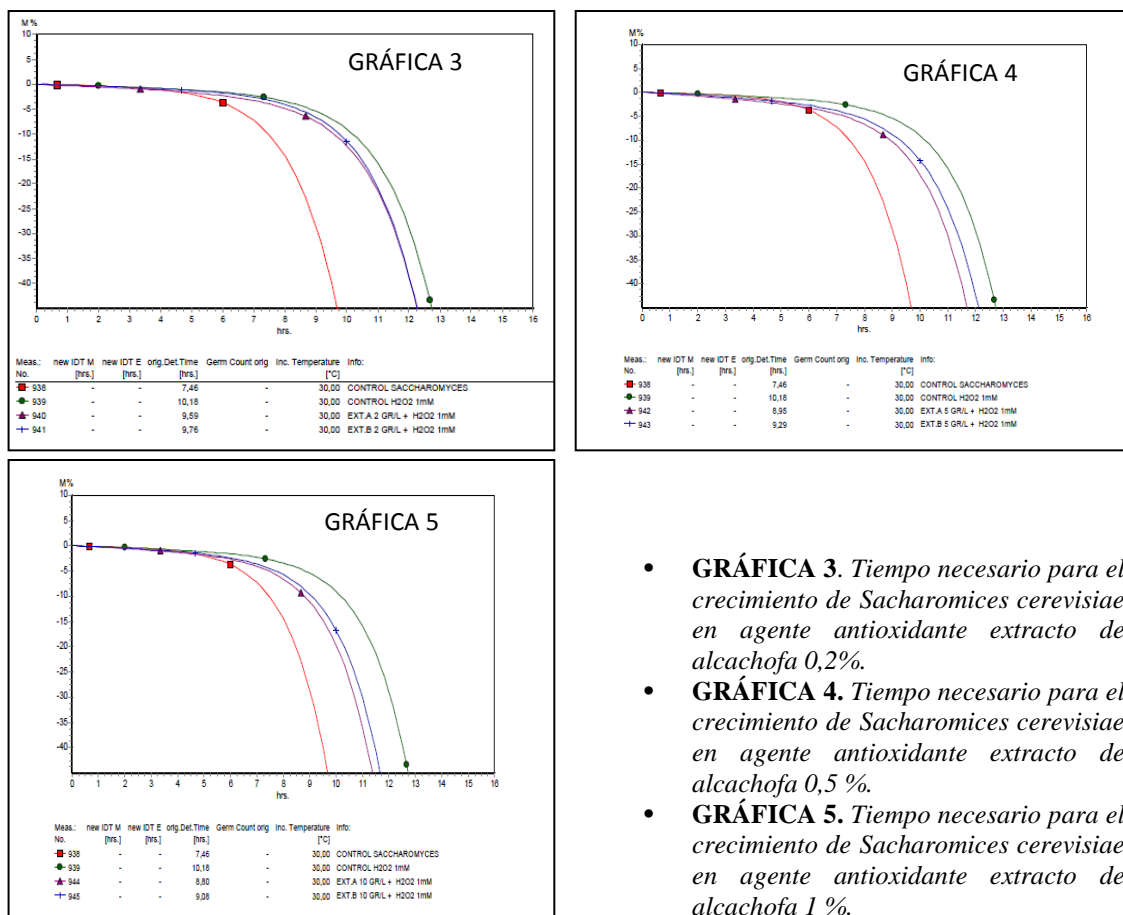
**Tabla 14.** Tiempo necesario para el crecimiento en horas de *Sacharomices cerevisiae*

	<b>Extracto A</b>			<b>Sig.</b>
	$(\bar{x} \pm SD)$			
	<b>0,2%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1,0%</b>	
<i>Cepa (horas)</i>	7,46	7,46	7,46	NS
<i>Cepa+Peróxido (horas)</i>	10,18 $\pm$ 0,02	10,18 $\pm$ 0,03	10,18 $\pm$ 0,03	NS
<i>Cepa+extracto (horas)</i>	9,59 $\pm$ 0,01	8,95 $\pm$ 0,02	8,80 $\pm$ 0,01	*
	<b>Extracto B</b>			
	$(\bar{x} \pm SD)$			
	<b>0,2%</b>	<b>0,5%</b>	<b>1,0%</b>	<b>Sig.</b>
<i>Cepa (horas)</i>	7,46	7,46	7,46	NS
<i>Cepa+Peróxido (horas)</i>	10,18 $\pm$ 0,01	10,18 $\pm$ 0,02	10,18 $\pm$ 0,02	NS
<i>Cepa+extracto (horas)</i>	9,76 $\pm$ 0,02	9,16 $\pm$ 0,02	9,08 $\pm$ 0,02	*
<b>Significación entre A y B</b>	NS	NS	NS	

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

En la **Tabla 14** y la **Figura 14**, se muestran los resultados y gráficas, obtenidos para la capacidad antioxidante del extracto de alcachofa referidos como el poder para permitir

el crecimiento de la levadura *Sacharomices cerevisiae*, sometida a un estrés oxidativo ( $H_2O_2$ ). Los resultados muestran que hay diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de extracto utilizadas, sin embargo no encuentra diferencias significativas entre el extracto A y B para la misma concentración. Como se observa en la **Tabla 14**, al añadir el extracto se minimiza el estrés oxidativo y disminuye el tiempo de crecimiento, aproximándose al tiempo normal de crecimiento del microorganismo. Esta capacidad antioxidante es mayor cuanto mayor es la concentración de extracto añadida, es decir menos tiempo tarda la levadura en crecer, siendo mayor este poder antioxidante en el extracto A, que es el que tiene mayor concentración de compuestos fenólicos.



- **GRÁFICA 3.** Tiempo necesario para el crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* en agente antioxidante extracto de alcachofa 0,2%.
- **GRÁFICA 4.** Tiempo necesario para el crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* en agente antioxidante extracto de alcachofa 0,5 %.
- **GRÁFICA 5.** Tiempo necesario para el crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* en agente antioxidante extracto de alcachofa 1 %.

**Figura 14.** Gráficas del tiempo de crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* a los que se añadió el 0,2%, 0,5% y 1% de extracto de alcachofa A y B

Se puede concluir que los extractos de alcachofa tienen capacidad antioxidante, corroborando los resultados obtenidos mediante técnicas *in vitro* FRAP y ABTS, datos que coinciden con distintos estudios publicados por Larrosa y col., (2012). Dueñas y col., (2009) y Mabeau y col., (2006), sobre la capacidad antioxidante del subproducto que se obtiene en la industria transformadora de conservas de alcachofa.

#### 4.2. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE AJO

En la Región de Murcia se pueden encontrar fábricas que elaboran especias y utilizan el ajo como materia prima para obtener productos como el ajo en polvo, obteniendo un gran volumen de desechos que supone más de 50 toneladas anuales de subproducto.

El subproducto del ajo tiene la particularidad de que tiene una alta densidad, por lo que su inconveniente mayoritario es el almacenamiento y transporte, de hecho, el porcentaje en peso del subproducto con respecto a la materia es del orden del 1-3%.

Para la obtención del extracto de ajo se sigue la metodología de extracción acuosa descrita por Navarro (2007) para bulbos de ajo. Durante la realización de los procesos de obtención del extracto a partir de subproductos se ha llevado un control de los pesos más significativos que nos han permitido determinar el rendimiento del proceso, cuyos valores medios se representan en la **Tabla 15.**

**Tabla 15.** Rendimiento procesos de extracción

MUESTRA	RENDIMIENTO (%) ( $\bar{X} \pm SD$ )
<i>Subproducto Ajo</i>	3,65±0,3

#### 4.2.1. Caracterización de la materia prima subproducto ajo

Una vez recogida la materia prima se conserva en refrigeración y se realiza un análisis del subproducto para su determinar la viabilidad para ser utilizado como materia prima para la elaboración del extracto de ajo y su posterior utilización como ingrediente alimentario. Se toma una muestra representativa del subproducto recogido en la empresa para el análisis del mismo previo al proceso de extracción acuosa.

**Tabla 16.** Caracterización subproducto ajo

Parámetro	Valores medios ( $\bar{X} \pm SD$ )	Sig.
<i>Salmonella</i> /25g	Ausencia	
<i>Listeria spp</i> /25g	Ausencia	
<i>Anaerobios Sulfito Reductores</i> ufc/g	$<10^2$	NS
<i>Plaguicidas</i> (mg/Kg)	No detectados	
<i>pH</i>	4,10 $\pm$ 0,02	NS
<i>Humedad</i> (g/100g)	58,00 $\pm$ 0,07	NS

NS: No significativo

Los resultados obtenidos para el subproducto de ajo (**Tabla 16**), formado principalmente por pieles de ajo, presenta una calidad microbiológica aceptable para su utilización como materia prima. En el caso de salmonella y listeria no hay presencia y la cantidad hallada para anaerobios sulfito reductores,  $10^2$  ufc/g, está por debajo del límite de  $10^3$  ufc/g, que permite el Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Los valores de pH de las pieles corresponden con el pH del fruto tal y como fue publicado por Dandan y col., (2015). Sobre la piel del ajo se han encontrado datos de humedad (Kallel y col., 2014) del 5%, muy inferiores a los obtenidos en los subproductos recogidos, debido a que estos autores separan las pieles del resto de subproductos para su análisis.



#### 4.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de ajo

Se han realizado dos métodos para determinar la capacidad antioxidante del extracto de ajo: ABTS y FRAP.

La determinación de la capacidad antioxidante total basada en el método FRAP y ABTS se realiza según la metodología descrita en el capítulo III de materiales y métodos. Los resultados obtenidos con ambos métodos se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Capacidad antioxidante en extracto de ajo

MUESTRA	FRAP	ABTS
	( $\mu\text{M Fe}^{+2}/\text{g}$ )	( $\mu\text{M Trolox/g}$ )
	( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )
<i>Extracto ajo</i>	$2,7 \times 10^3 \pm 0,3$	$2,8 \times 10^2 \pm 0,5$

Bernaert y col., (2011), analizan la capacidad antioxidante de ajo fresco por FRAP, donde publican valores muy por debajo de los obtenidos, con valores entre 14-34  $\mu\text{M Fe}^{+2}/\text{g}$ .

Lawrence y col., (2011) han estudiado, en ensayos realizados in vitro, la actividad antioxidante del aceite esencial de ajo, para lo cual se midió la estabilidad estabilizante del radical DPPH, el poder reductor, así como la actividad antinitrosativa de este aceite (habilidad del aceite para capturar el óxido nitroso). Ensayaron concentraciones de 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL de este aceite. El aceite de ajo presentó una actividad antirradical dependiente de la concentración, siendo su actividad inhibitoria en el radical DPPH estable y de barrido del óxido nítrico comparable con el estándar de BHT (sustancia utilizada como antioxidante en alimentos). Sin embargo, el poder reductor del

aceite fue significativamente menor al de BHT. Estos autores concluyen, que dado la capacidad para captar radicales libres del aceite esencial de ajo, este puede ser usado como una fuente de antioxidantes.

Wang y col., (2015) encuentran también actividad antioxidante en extractos acuosos de ajos enteros (bulbo y piel), utilizando los métodos *in vitro* ABTS y FRAP. Se han realizado los mismos métodos *in vitro*, ABTS y FRAP, para determinar la capacidad antioxidante del extracto de ajo que los utilizados en alcachofa, utilizando las mismas rectas patrón, no hallando capacidad antioxidante debido a que el subproducto de ajo utilizado, se compone mayoritariamente de pieles.

En cuanto resultados para fenoles no se detectaron en el extracto de ajo, Kallel y col., (2014) publican los resultados obtenidos en la composición de fenoles totales en extractos de subproductos de pieles de ajo obtenidos mediante diferentes sustancias de extracción, agua, etanol, metanol, mezcla agua-metanol y mezcla agua-etanol. Los resultados obtenidos muestran que en las extracciones con agua no se detectan fenoles, siendo el mejor sistema de extracción las mezclas de agua con metanol, corroborando que las pieles de ajo no presentan capacidad antioxidante.

Solamente se obtuvieron resultados relevantes para el FRAP (Tabla 17), en cantidades muy inferiores a las publicadas por Wang y col., (2015) y Lawrence y col., (2011). Esto se debe a que los principales compuestos antioxidantes del ajo se encuentran en el bulbo y no en la piel, tal como describe Santosha y col., (2013).

En comparación con la capacidad antioxidante de otros vegetales y la alcachofa, ya descritos en el apartado 4.2.1 de esta tesis, se obtienen valores muy inferiores en los métodos de análisis FRAP y ABTS para el extracto de ajo.

### 4.2.3. Determinación de la capacidad antimicrobiana del extracto de ajo

Para determinar el efecto antimicrobiano del extracto de ajo se realizan técnicas de difusión en agar y técnicas de impedancia eléctrica, siguiendo la metodología descrita en la sección 3.1.4, caracterización de los extractos, del capítulo de materiales y métodos de esta tesis.

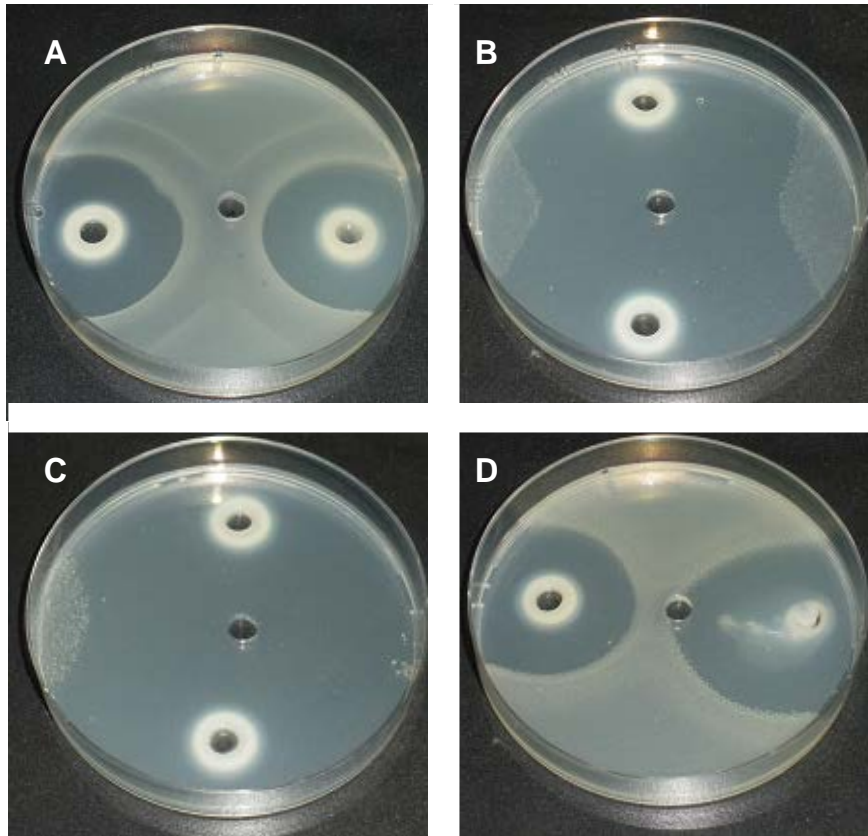
Las dos técnicas utilizadas se emplean para comparar y verificar los resultados obtenidos sobre la capacidad antimicrobiana del extracto de ajo en ambas. La impedancia es una técnica que en la actualidad se está utilizando con mucha frecuencia a nivel industrial, como técnica cualitativa por la rapidez de respuesta.

La técnica de difusión en agar comienza con la siembra de las cepas bacterianas, adicionándole 20 mL de medio PCA en placas Petri, previamente inoculado con la cepa patrón (0,1 mL de caldo TSB de 24 horas). Posteriormente se hacen pocillos de 6 mm de diámetro sobre el agar y en cada uno se adicionan 50µL del extracto de ajo, a una concentración de 2gr/L. Además, se utilizó un pocillo como control en cada ensayo. Las placas se incubaron a 37° C por 24 horas. La presencia de un halo de inhibición, definido alrededor del pocillo con extracto indica actividad antibacteriana positiva. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada cepa y extracto ensayado

La lectura de las placas se realizó después de 24 horas. Los valores obtenidos se promediaron hallándose el diámetro promedio que fue utilizado como índice de actividad antibacteriana (Pascual, 1999).

La **Figura 15** muestra los resultados de la capacidad antimicrobiana del extracto de ajo de acuerdo a la técnica de difusión en agar.

Los resultados se expresaron en mm de diámetro del halo de inhibición, incluidos los 6 mm de diámetro del disco, provocado frente a cada una de las cepas investigadas (**Figura 15**), se consideró un halo de inhibición aceptable cuando éste fue superior a 16 mm de diámetro total, para halos inferiores a 6 mm se consideró que no existía actividad antimicrobiana, entre 6 y 16 mm una actividad moderada.



**Figura 15.** Resultados obtenidos en el ensayo “*in vitro*” de screening de capacidad antimicrobiana de extracto de ajo frente a cepas de: A) *Escherichia coli*, B) *Listeria monocytogenes*, C) *Sacharomices cerevisiae* y D) *Salmonella spp*

Para todas las cepas los halos de inhibición fueron superiores a 16 mm, resultados que concuerdan con los publicados por Kallel (2014) para extractos de pieles de ajo utilizando agua como medio de extracción. García y col., (2007) publicaron para extractos acuosos de ajo fresco unos valores de halos de inhibición para *E.coli* y *S.aureus* ente 2-4 mm y 6-7 mm respectivamente, resultados por debajo de los

obtenidos en este trabajo. Sin embargo, Guardia (2014) obtiene halos de inhibición para *S.aureus* de 45.7 mm para extracto alcohólico de ajo entero.

O´Gara y col., (2000) evaluaron la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de ajo (GO) y de polvo de ajo deshidratado (GP) contra la bacteria *Helicobacter pylori*.

Se observó que el GO presentaba actividad antimicrobiana mayor que los obtenidos con polvo de ajo. Estos autores también señalan que la actividad antimicrobiana de los sulfuros de dialilo se incrementaba al aumentar el número de átomos de azufre.

Lu y col., (2012) publicaron que la capacidad de sulfuro de dialilo para matar a la bacteria *campylobacter* fue 100 veces más eficaz que la eritromicina y antibióticos tales como la ciprofloxacina.

Shams-Ghahfarokhi y col., (2006) publican la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de ajo frente a un amplio espectro de hongos patógenos y es activo frente a distintas especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella spp* y *Proteus spp*.

Para extractos obtenidos de plantas, Cruz-Carrillo y col., (2010) obtienen para extractos de Passiflora halos de inhibición de 8,6 mm para *E.coli* y 4 mm para *S. aureus*. Singh y col., (2010) señalan que el aceite de semillas de albaricoque presentaba actividad antimicrobiana contra determinadas bacterias patógenas, tales como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Pyogenes*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, y *E. coli*. Škerget y col., (2009) publican que los extractos de piel de cebolla roja presentan una elevada actividad antibacteriana contra el crecimiento de bacterias *B.Cereus*, *P.fluorescens* y *E. Coli*.

Una vez evaluado el extracto de ajo obtenido mediante técnicas de microbiología clásica, revelándose el extracto de ajo obtenido como un antimicrobiano de amplio espectro, se procedió a corroborar los resultados aplicando la técnica de impedancia eléctrica, sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, y *Sacharomices cerevisiae*, utilizando medida directa de impedancia para patógenos e indirecta para la levadura.

En el método directo para crecimiento de bacterias, se utilizan cepas de *Salmonella Enterica* subsp. *Enterica*, serovar *Typhimurium* (CECT 4594) y *E. coli* (*Escherichia coli* CECT 515), de la Colección Española de Cultivos Tipo, con una concentración de  $10^6$  ufc/mL, utilizando como medio de cultivo 001A (Sy-Lab, Austria), realizando las medidas de impedancia a 30 °C. Básicamente, la cepa liofilizada se introduce en TBS durante 24 h a 37 °C, medio en el que se alcanza una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/mL. Tras ello, se adicionaron 9 mL de medio Sy-Lab001A a los tubos a introducir en el equipo BacTrac, inoculando a cada uno de ellos 0,1 mL de cepa a una concentración  $10^6$  ufc/mL y el agente antimicrobiano a ensayar. Tras ello, los tubos se introdujeron en el equipo, dejando incubar durante al menos 24h. En la **Tabla 18**, se indican las concentraciones y cantidades ensayadas.

**Tabla 18.** Cepas de bacterias y concentraciones de antimicrobianos utilizados

Volumen medio (mL)	Cepa	Volumen Cepa (mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Antimicrobiano adicionado (g/L) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Volumen antimicrobiano (mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )
9	<i>Salmonella</i>	0,1 $\pm$ 0,01	Control medio	-
9	<i>Salmonella</i>	0,1 $\pm$ 0,01	Ajo 9,60 $\pm$ 0,04	1 $\pm$ 0,01
9	<i>E. coli</i>	0,1 $\pm$ 0,01	Control medio	-
9	<i>E. coli</i>	0,1 $\pm$ 0,01	Ajo 9,60 $\pm$ 0,02	1 $\pm$ 0,01

En todos los casos, se hicieron ensayos de control de cepa y medio. El control de cepa sin la adición de ningún antimicrobiano, nos indica el tiempo al que se inicia el crecimiento del microorganismo, así como la viabilidad del mismo. En cuanto al control de medio, en todos los casos el resultado debe ser negativo, es decir, no debe detectarse crecimiento alguno, ya que si lo hubiera, indicaría contaminación del medio, estos resultados concuerdan con los obtenidos en la **Tabla 19** para *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

**Tabla 19.** Tiempo necesario para el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en extracto de ajo

<b>Antimicrobiano</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Salmonella spp.</i></b>
	<b>Tiempo necesario para el crecimiento en horas</b>	<b>Tiempo necesario para el crecimiento en horas</b>
	<b>(<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>	<b>(<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>
<i>Control de medio</i>	n.d.c.	n.d.c.
<i>Control de Escherichia</i>	3,00 ± 0,01	3,98 ± 0,01
<i>Extracto ajo</i>	n.d.c.	n.d.c.

*n.d.c. no detectado crecimiento*

Como se puede observar, tanto para *Escherichia coli* como para *Salmonella spp*, el extracto de ajo utilizado a una concentración de 2 gr/L, presenta un acusado efecto antimicrobiano al no permitir el crecimiento del microorganismo.

Para comprobar el efecto sobre el crecimiento de levaduras, se procedió a desarrollar el método indirecto de impedancia eléctrica. Se partió de un cultivo de levaduras (*Sacharomices Cerevisiae*) a una concentración de  $10^7$  ufc/mL, preparando cuatro viales. Las medidas de impedancia se realizaron a 30° C. La cepa liofilizada se introduce en TBS durante 24 h a 37 °C, medio en el que se alcanza una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/mL. A continuación, se prepararon unos viales estériles a los que

se les adicionaron 2,4 mL de medio cuya composición es: glucosa (10g), mycopeptona (5g), extracto de levadura (3g), extracto de malta (3g), enrasando hasta 1L con agua estéril. Cada uno de los tubos se inoculó con 0,3 mL de cepa a una concentración  $10^6$  ufc/mL y el agente antimicrobiano extracto de ajo en una concentración de 2gr/L. Tras ello, cada vial se introdujo en un tubo conteniendo 2 mL de potasa (KOH) al 2%, provisto de electrodos que determinan la saturación de la potasa. En la **Tabla 20** se muestran las concentraciones utilizadas.

**Tabla 20.** Cepa de levadura y concentración de antimicrobiano utilizado

Volumen medio (mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Cepa	Volumen Cepa(mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Antimicrobiano adicionado (g/L) ( $\bar{X} \pm SD$ )	Volumen antimicrobiano (mL) ( $\bar{X} \pm SD$ )
2,4 $\pm$ 0,01	<i>Sacharomices Cerevisiae</i>	0,3 $\pm$ 0,01	Control medio	-
2,4 $\pm$ 0,01	<i>Sacharomices Cerevisiae</i>	0,3 $\pm$ 0,01	9,60 $\pm$ 0,01 extracto ajo	0,3 $\pm$ 0,01

En todos los casos, se hicieron ensayos de control de cepa y medio. Los tiempos obtenidos en el crecimiento de la levadura se muestran en la **Tabla 21**. El control de cepa sin la adición del antimicrobiano, nos indica el tiempo al que se inicia el crecimiento del microorganismo, así como la viabilidad del mismo. En cuanto al control de medio, en todos los casos el resultado ha sido negativo, es decir, no se detecta crecimiento alguno, ya que si lo hubiera, indicaría contaminación del medio. Tampoco se detecta crecimiento de la levadura en las muestras de la cepa a la que se añadió 2gr/L de extracto de ajo, lo cual indica que inhibe el crecimiento de levaduras.



Estos datos concuerdan con los obtenidos en la sección anterior, donde se obtuvieron halos aceptables para *Sacharomices* de 15 mm y 42 mm, respectivamente; apareciendo inhibición casi completa (halo >16 mm) cuando se empleó extracto de ajo al igual que ocurre en este ensayo, donde no se detectó crecimiento tras 20 horas.

**Tabla 21.** Tiempo necesario para el crecimiento de *Sacharomices cerevisiae* en agente antimicrobiano extracto ajo

<b>Antimicrobiano</b>	<b><i>Sacharomices cerevisiae</i></b>
	<b>Tiempo necesario para el crecimiento en horas</b>
	<b>(<math>\bar{X} \pm SD</math>)</b>
<i>Control de medio</i>	n.d.c.
<i>Control de Sacharomices</i>	2,25 $\pm$ 0,02
<i>Extracto ajo</i>	n.d.c.

*n.d.c: no detectado crecimiento*

Los resultados obtenidos por difusión en Agar y por impedancia eléctrica demuestran que el extracto de ajo obtenido por extracción acuosa del subproducto de la fabricación industrial de productos a base de ajo presenta un amplio espectro antimicrobiano, resultados que concuerdan con los publicados por Kallel y col., (2014), para pieles de ajo utilizando técnicas de microbiología clásicas y por Sánchez y col., (2010) para extractos naturales de ajo mediante la utilización de técnicas de medida de impedancia eléctrica.

#### **4.3. ENSAYOS PREVIOS A LA SELECCIÓN DE EXTRACTOS**

Tras la obtención de los extractos y antes de realizar la caracterización de los mismos, se realizan pruebas adicionando estos extractos en diferentes platos preparados

refrigerados con el objeto de determinar de manera sensorial, que cantidad óptima puede ser utilizado en la elaboración de estos platos preparados.

Sólo a las concentraciones que se consideran sensorialmente aptos para su uso, se les realiza el estudio de caracterización antioxidante y antimicrobiana, cuyos resultados se recogen en el apartado anterior 4.1 y 4.2. Debido a que los extractos obtenidos aportan sabor, color y aroma, se buscan productos en los que la adición de estos extractos no altere el sabor ni color, como en el caso de cremas de verduras, salsas, gazpachos, pastas, etc. Concretamente para las pruebas iniciales se emplean gazpacho, cremas de verduras y pasta.

El extracto de alcachofa (rico en cinarina y con capacidad antioxidante) y el extracto de ajo (capacidad antimicrobiana) se emplearon a una concentración de entre 1,5 y 6 g/L en la elaboración de gazpacho y cremas de verduras, para la pasta refrigerada los extractos se añaden en el agua de cocción. Los productos elaborados fueron mantenidos en refrigeración, a pesar de que en algún caso recibieron tratamientos de pasterización para incrementar su vida útil al destruir cualquier contaminación por microorganismos con el objeto de conservar sus propiedades organolépticas hasta la fecha de su consumo.

Los tres productos elaborados con los extractos presentan características similares a los platos preparados comerciales. Para seleccionar los platos se realizó una prueba de aceptación con un panel de consumidores, obteniéndose diversidad de opiniones en base a la diferencia de productos alimenticios preparados. El gazpacho y la pasta cocida fueron bien valorados por el panel de catadores, mientras que las cremas de verduras no fueron bien aceptadas debido fundamentalmente al atributo color.

Así, en las cremas de verduras, la adición de extracto de alcachofa provocó un cambio en el color, un oscurecimiento, y un sabor que los consumidores no relacionan con el típico del producto, dado que el extracto de alcachofa aporta color a la preparación y un olor intenso, se recomienda utilizarlo en productos que posean un color o sabor donde el extracto pase desapercibido. Por el contrario, este extracto no afecta a la textura del producto y este atributo ha sido mejor valorado.

En base a los resultados de aceptabilidad, se seleccionaron el gazpacho y la pasta para completar el estudio y se descartaron las cremas de verduras.

A partir de aquí, se diseñan diversas pruebas para determinar la concentración de extractos y temperatura de proceso óptimas y el sistema de envasado.

En el caso del gazpacho, previamente se elaboraran varias recetas variando algunos ingredientes y la concentración de alguno de ellos y se desarrolla el proceso a seguir (pelado del tomate o no, tipo de tamiz en pasadora, etc.) para obtener una formulación óptima.

La formulación final se decidió a partir de un panel de 6 catadores, habituados a la cata de este tipo de producto, pertenecientes al CTC.

#### **4.3.1. Optimización y desarrollo de gazpacho PRUEBA A**

En esta primera prueba, se emplea una elevada concentración de extractos (entre 5 y 10 g/kg) y una temperatura de tratamiento mínima, con el fin de evaluar el efecto y aceptabilidad del producto.

Para ello, se elabora un gazpacho al que se le añaden los extractos de alcachofa y ajo, según receta como se describe en el capítulo de materiales y métodos y en un lote sin

extractos. Toda la mezcla de ingredientes se tritura, se pasa por un tamiz de 1,6 mm, se homogeniza, se calienta a distintas temperaturas, se envasa en botella de cristal de 212 mL y se almacena en condiciones de refrigeración durante el tiempo de vida útil. La adición de los extractos se realiza de manera independiente para evitar sinergias en la adición conjunta de los extractos y poder validar la actuación de cada uno de ellos en el producto gazpacho.

Con objeto de determinar si los extractos de ajo y alcachofa tienen capacidad antimicrobiana y/o antioxidante en el gazpacho y valorar sensorialmente como afectan al sabor, color y textura del producto, se realizan muestras con 5 g/L de extracto de ajo y 10 g/L de extracto de alcachofa, se envasan a 60°C y se almacenan en refrigeración a 4°C, durante los días de estudio, y se realiza un análisis microbiológico de aerobios mesófilos, control de la evolución del índice de peróxidos, grasa, pH y análisis sensorial. Para validar los resultados obtenidos este ensayo denominado **PRUEBA A**, todos los análisis y pruebas se realizan por triplicado.

En la **Tabla 22** se describen las muestras realizadas y su codificación, así como la concentración de extracto añadida y la temperatura de envasado.

**Tabla 22.** Características de las muestras de gazpacho de la prueba A

<b>MUESTRA</b>	<b>EXTRACTO (g/L)</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	<b>T<sup>a</sup> ENVASADO (°C)</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	<b>CODIGO</b>
<i>BLANCO</i>	-	60	Gb60
<i>ALCACHOFA</i>	5±0,01	60	G10af60
<i>AJO</i>	5±0,02	60	G5aj60

En la **Tabla 23** se recogen los resultados del control microbiológico de aerobios mesófilos durante los días de estudio. Tal como se observa, el extracto de ajo presenta

capacidad antimicrobiana, observándose un menor recuento en estas muestras en el día de su elaboración. El extracto de alcachofa, no presentó capacidad antimicrobiana.

**Tabla 23.** Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (ufc/mL) en la prueba A

MUESTRA	DÍAS DE ALMACENAMIENTO					Sig.
	0	3	6	10	18	
<i>Gb60</i>	$0,4 \times 10^3 \pm 0,98$	$1,5 \times 10^3 \pm 1,34$	$2,0 \times 10^3 \pm 1,90$	$>3,0 \times 10^3$	$>3,0 \times 10^3$	*
<i>G10af60</i>	$0,4 \times 10^3 \pm 1,23$	$1,4 \times 10^3 \pm 2,13$	$2,3 \times 10^3 \pm 0,34$	$>3,0 \times 10^3$	$>3,0 \times 10^3$	*
<i>G5aj60</i>	$0,4 \times 10^2 \pm 1,34$	$0,3 \times 10^2 \pm 1,39$	$0,9 \times 10^2 \pm 0,34$	$0,7 \times 10^2 \pm 1,12$	$1,1 \times 10^2$	NS
<b>Significación</b>	*	*	*	*	*	

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

La aplicación del Test ANOVA para un nivel de significación superior al 5% indica que existen diferencias significativas en el crecimiento de ufc/mL de *aerobios mesófilos*, de las distintas muestras de gazpacho elaboradas, por lo que se utilizó el test de Tukey para demostrar que la muestra de gazpacho a la que se añadió extracto de ajo es significativamente distinta, a partir del día 10, a las muestras de gazpacho sin adición de extractos (blanco) y a las que se adicionó extracto de alcachofa. De acuerdo a los resultados microbiológicos se verifica la capacidad antimicrobiana del extracto de ajo en las muestras de gazpacho. En el día 0 se observan menores recuentos en las tres muestras y van aumentando durante los días de almacenamiento. Estos resultados demuestran que la baja temperatura de envasado utilizada, no ha sido suficiente para controlar el crecimiento microbiano. El objeto de esta prueba es comprobar la efectividad del extracto como agente antimicrobiano, por lo que el tratamiento térmico aplicado fue muy suave para que la destrucción de microorganismos por efecto del calor no interfiera en la valoración de la capacidad antimicrobiana de los extractos en estudio.

Sin embargo, en la muestras de gazpacho con extracto de ajo, los recuentos se mantienen hasta límites aceptables hasta el día 10, mientras que en las muestras control y con extracto de alcachofa el crecimiento de aerobios mesófilos supera los  $3,0 \times 10^3$  ufc/mL, siendo considerados no aptos para ser consumidos.

El pH fue similar para los tres grupos de muestras y se mantuvo prácticamente constante hasta el día 10 de almacenamiento, no observándose por tanto un efecto significativo ni por el extracto empleado ni por el tiempo.

En cuanto al parámetro de grasa su comportamiento fue similar al descrito para el pH, no mostrándose efecto significativo por acción del extracto y del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, en relación a la capacidad antioxidante medida como índice de peróxidos, los valores más elevados correspondieron a las muestras blanco/control y los más bajos al gazpacho elaborado con extracto de alcachofa, siendo las diferencias entre los tres lotes estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), lo que pone de manifiesto de manera muy clara el efecto antioxidante de este extracto.

Para el día 18 no se analizaron estos parámetros porque a ese día se consideró el gazpacho no apto desde el punto de vista microbiológico.

En la **Tabla 24** se muestran los resultados de pH, índice de peróxidos y grasa obtenida en las distintas muestras de la **PRUEBA A**.

**Tabla 24.** Evolución de los parámetros físico-químicos en la prueba A

MUESTRA	ANÁLISIS	DÍAS DE ALMACENAMIENTO				Sig.
		0	3	6	10	
Gb60	Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	10,2±0,3	18,1±0,3	22,4±0,1	32,4±0,1	*
	Grasa (%)	9,2±0,1	9,8±0,2	9,0±0,2	9,0±0,3	NS
	pH	4,28±0,01	4,28±0,03	4,26±0,02	4,26±0,04	NS
G10af60	Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	9,6±0,3	19,5±0,3	19,6±0,2	18,8±0,2	*
	Grasa (%)	9,1±0,3	9,1±0,1	8,3±0,3	9,3±0,1	NS
	pH	4,32±0,01	4,34±0,03	4,33±0,01	4,32±0,302	NS
G5aj60	Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	11,1±0,2	18,5±0,2	30,2±0,1	30,6±0,3	*
	Grasa (%)	9,0±0,4	9,2±0,1	8,9±0,1	8,8±0,2	NS
	pH	4,30±0,01	4,33±0,01	4,30±0,02	4,32±0,01	NS
<b>Significación</b>	<b>I. Peroxidos</b>	NS	NS	*	*	
	<b>Grasa</b>	NS	NS	NS	NS	
	<b>pH</b>	NS	NS	NS	NS	

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

Así mismo, se observa un efecto significativo del tiempo de almacenamiento sobre la oxidación lipídica, mostrándose en todos los casos un incremento de los valores del índice de peróxidos a partir del día 3.

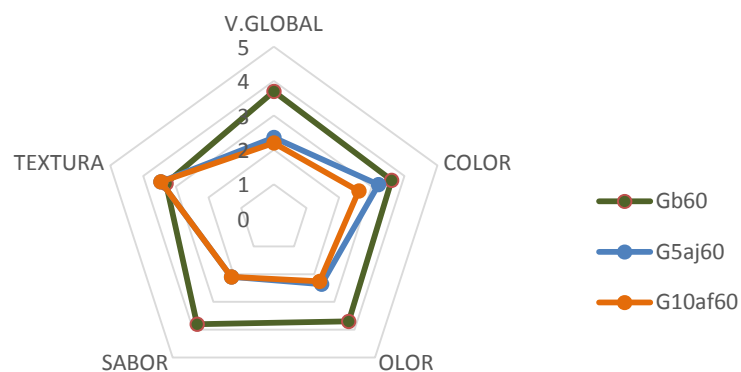
Se realiza un análisis sensorial de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis. El objetivo del estudio realizado es evaluar las características organolépticas del gazpacho con las tres referencias. Se realizó una prueba de aceptación para conocer la opinión de los consumidores sobre las muestras elaboradas en la prueba A, Gb60, G10af60 y G5aj60. Cada panelista que participó en la

cata recibió un cuestionario previamente diseñado. En él se pedía evaluar los parámetros color, olor, sabor, textura y valorar globalmente el producto utilizando una escala hedónica de intervalo de cinco puntos en la que el valor 3 se considera el límite de aceptación.

Los resultados obtenidos para los distintos parámetros evaluados en la prueba de gazpacho muestran que no existen diferencias significativas para el parámetro textura, sin embargo se obtienen diferencias significativas entre el gazpacho control y gazpachos con extracto para el resto de atributos, lo que pone de manifiesto que las muestras de gazpacho a las que no se añade ningún extracto (blanco) son significativamente distintas en relación a los parámetros, color, olor, sabor y valoración global.

En la **Figura 16** se muestran las puntuaciones de las muestras obtenidas para cada parámetro sometido a estudio.

### ANÁLISIS SENSORIAL PRUEBA A



**Figura 16.** Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba A.

Como se puede observar en la **Figura 16**, los gazpachos con extractos presentan menores puntuaciones de aceptabilidad que el gazpacho control. Concluyendo se puede



afirmar que los consumidores valoran de manera negativa la adición de los extractos en concentraciones de 5g/L para el ajo y de 10g/L para la alcachofa.

#### 4.3.2. Optimización y desarrollo de gazpacho PRUEBA B

Los resultados obtenidos en la anterior prueba determinan que el extracto de ajo añadido en gazpacho tiene capacidad antimicrobiana y que el extracto de alcachofa tiene capacidad antioxidante, pero a las concentraciones ensayadas (5 g/L y 10 g/L respectivamente) las muestras con extracto son rechazadas sensorialmente por los consumidores. Se realiza un segundo ensayo, **PRUEBA B**, en la que se elabora gazpacho siguiendo el mismo procedimiento que el realizado en la prueba A, pero utilizando concentraciones menores de los extractos de alcachofa y de ajo. Se realizan las pruebas por triplicado. En la **Tabla 25**, se indican las distintas concentraciones de extracto utilizados en la elaboración de cada una de las muestras y la codificación utilizada. Todas las muestras son envasadas a 60°C.

**Tabla 25.** Características de las muestras de gazpacho de la prueba B

MUESTRA	EXTRACTO (g/L) ( $\bar{X} \pm SD$ )	T <sup>a</sup> ENVASADO (°C) ( $\bar{X} \pm SD$ )	CÓDIGO
<i>BLANCO</i>	-	60	<i>Gb60</i>
	5,0±0,2		<i>G5af60</i>
<i>ALCACHOFA</i>	6,0±0,3	60	<i>G6af60</i>
	8,0±0,2		<i>G8af60</i>
	1,0±0,1		<i>G1aj60</i>
<i>AJO</i>	1,5±0,1	60	<i>G1,5aj60</i>
	2,0±0,2		<i>G2aj60</i>

Las siete muestras elaboradas se almacenan en refrigeración durante el estudio, y se realiza de forma periódica un control del crecimiento de microorganismos mesófilos y

análisis sensorial para determinar la concentración máxima de extracto de alcachofa y ajo aceptada por el consumidor para la elaboración de gazpacho.

En la **Tabla 26** se muestran los resultados del recuento de microorganismos aerobios mesófilos durante los 30 días de almacenamiento en refrigeración.

**Tabla 26.** Recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (ufc/mL) en la prueba B

MUESTRA	DÍAS DE ALMACENAMIENTO					Sig
	0	5	10	18	30	
<i>Gb60</i>	0,9x10 <sup>3</sup> ±1,23	0,9x10 <sup>3</sup> ±1,34	1,8x10 <sup>3</sup> ±3,56	2,8x10 <sup>3</sup> ±1,23	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
<i>G5af60</i>	0,6x10 <sup>3</sup> ±2,45	0,9x10 <sup>3</sup> ±3,45	1,7x10 <sup>3</sup> ±2,45	2,9x10 <sup>3</sup> ±0,24	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
<i>G6af60</i>	0,9x10 <sup>3</sup> ±4,95	1,1x10 <sup>3</sup> ±0,80	2,2x10 <sup>2</sup> ±2,45	2,7x10 <sup>3</sup> ±1,34	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
<i>G8af60</i>	0,8x10 <sup>3</sup> ±0,93	0,9x10 <sup>3</sup> ±2,14	1,8x10 <sup>3</sup> ±0,98	2,8x10 <sup>3</sup> ±4,23	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
	NS	NS	NS	NS	NS	
<i>G1aj60</i>	0,3x10 <sup>2</sup> ±3,10	0,7x10 <sup>2</sup> ±2,45	1,2x10 <sup>2</sup> ±2,34	3,1x10 <sup>2</sup> ±2,34	5,5x10 <sup>2</sup> ±1,56	NS
<i>G1,5aj60</i>	0,2x10 <sup>2</sup> ±2,15	0,8x10 <sup>2</sup> ±1,56	0,8x10 <sup>2</sup> ±3,45	0,8x10 <sup>2</sup> ±2,13	0,9x10 <sup>2</sup> ±1,95	NS
<i>G2aj60</i>	0,5x10 <sup>2</sup> ±2,34	0,6x10 <sup>2</sup> ±2,56	1,1x10 <sup>2</sup> ±3,45	0,8x10 <sup>2</sup> ±1,98	1,2x10 <sup>2</sup> ±1,78	NS
	NS	NS	NS	*	*	
<b>Significación</b>	*	*	*	*	*	

NS: No significativo; \*Diferencias significativa  $P < 0,05$

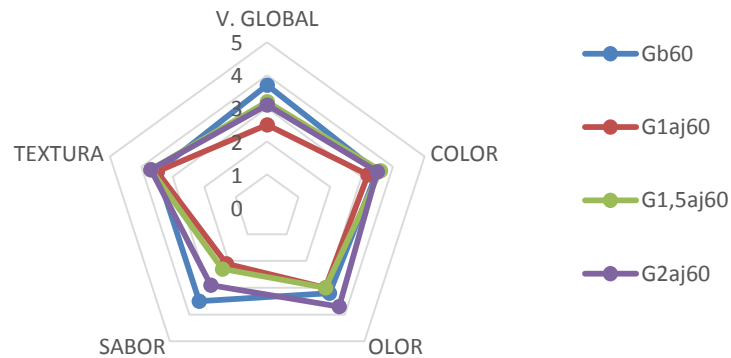
El crecimiento de aerobios mesófilos en las muestras de gazpacho sin adición de extractos aumenta significativamente durante los días de almacenamiento, al igual que ocurre con las muestras a las que se les añadió distintas concentraciones de extracto de alcachofa, demostrando que el extracto de alcachofa no posee poder antimicrobiano en la conservación del gazpacho refrigerado a distintas concentraciones. Sin embargo, las

muestras a las que se añadió extracto de ajo en diferentes dosis, no mostraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento. Por el contrario, si se observa un efecto significativo de las dosis de extracto empleado sobre el recuento de aerobios mesófilos, siendo las muestras de gazpacho con 1 g/l de ajo las que presentan los recuentos más elevados. Es decir los resultados demuestran que el extracto de ajo tiene capacidad antimicrobiana, la cual aumenta conforme aumenta la concentración del extracto en el gazpacho, no siendo significativas estas diferencias entre la concentración de 1,5 g/L y 2 g/L de extracto de ajo añadidos. Por otro lado, se corrobora que el extracto de alcachofa no tiene un efecto antimicrobiano significativo.

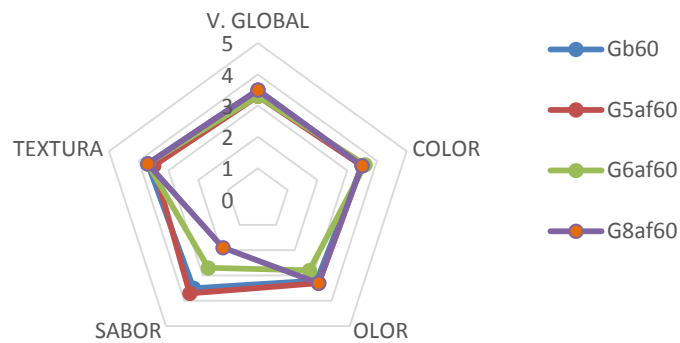
Siguiendo la metodología descrita se realiza el análisis sensorial de las muestras elaboradas en la prueba B. Los valores obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados se muestran en la **Figura 17**.

No se observan diferencias significativas en función a la concentración de extracto de alcachofa empleada para los atributos de color, olor y textura, pero si para el sabor. Las puntuaciones de este atributo descienden al incrementar la concentración de extracto, mostrando, por tanto, diferencias entre las muestras con 5g/L respecto a las muestras con 6 y 8 g/L. Así mismo, este último presenta diferencias estadísticamente significativas con el gazpacho blanco.

ANÁLISIS SENSORIAL PRUEBA B EXTRACTO AJO



ANÁLISIS SENSORIAL PRUEBA B EXTRACTO ALCACHOFA



**Figura 17.** Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba B

En base a los resultados obtenidos se decide seleccionar la concentración mínima de 5g/L de extracto de alcachofa, ya que las concentraciones de 6 y 8 g/L afectan de manera negativa a los parámetros de olor y sabor del gazpacho.

Al aplicar el test de ANOVA a los resultados obtenidos en los parámetros evaluados del gazpacho al que se añaden distintas concentraciones de extracto de ajo 1, 1,5 y 2 g/L y gazpacho blanco se encuentran diferencias significativas en los 4 muestras, mostrando

estas diferencias las muestras de gazpacho con 2 g/L de ajo y el resto. Es decir, la dosis de 1 g/L de extracto de ajo es la menos aceptada por los consumidores para los parámetros evaluados de color, sabor, olor y textura. Se decide seleccionar la dosis de 2 g/L en lugar de 1,5 g/L, ya que es aceptada por el consumidor y al mayor concentración de extracto de ajo mayor capacidad antimicrobiana.

#### 4.3.3. Optimización y desarrollo de gazpacho PRUEBA C

Con estos porcentajes se elabora un tercer ensayo, denominado **PRUEBA C**, con el objeto de determinar que temperatura de envasado es la óptima para conseguir una calidad microbiológica suficiente para la comercialización del gazpacho sin afectar a sus características organolépticas. En la **Tabla 27** se muestran las distintas condiciones de las muestras elaboradas en la prueba 4, en cuanto a la concentración de extracto añadido y temperatura de envasado así como su codificación. Se realizan las pruebas por triplicado.

**Tabla 27.** Características de las muestras de gazpacho de la prueba B

MUESTRA	EXTRACTO g/L	Tª ENVASADO °C	CÓDIGO
BLANCO	-	30	<i>Gb30</i>
		60	<i>Gb60</i>
		75	<i>Gb75</i>
		90	<i>Gb90</i>
ALCACHOFA	5 $\pm$ 0,01	30	<i>G5af30</i>
		60	<i>G5af60</i>
		75	<i>G5af75</i>
		90	<i>G5af90</i>
AJO	2 $\pm$ 0,02	30	<i>G2aj30</i>
		60	<i>G2aj60</i>
		75	<i>G2aj75</i>
		90	<i>G2aj90</i>

Una vez elaborados las muestras de gazpacho se almacenan a 4°C y se realiza un seguimiento del crecimiento de aeróbios mesófilos (ufc/mL), los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 28**.

El estudio del crecimiento de ufc/mL de aerobios mesófilos se realizó durante 30 días. En la **Tabla 28** se observa que tanto las muestras de gazpacho a las que se añadió extracto de ajo, como las que se añadió extracto de alcachofa y las que no se añade extracto (blanco) envasadas a 90°C permanecen sin alteración, no existiendo diferencias significativas en cuanto al recuento de aerobios mesófilos para el mismo tiempo de almacenamiento. Esto se debe a que se produce una destrucción de estos microorganismos por efecto de la elevada temperatura de envasado. Tampoco se encuentran diferencias significativas en los tratamientos realizados a 75°C en relación al crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos. A temperaturas de 30 y 60°C se encuentran diferencia significativas entre el gazpacho de ajo y gazpacho blanco y alcachofa, siendo más acusadas en las muestras a 30°C. Existen diferencias significativas, para una misma temperatura en las muestras de gazpacho blanco, con extracto de ajo y extracto de alcachofa. El gazpacho que contiene extracto de ajo, excepto para temperaturas de 75 y 90°C, inhibe el crecimiento de microorganismos de manera significativa, con respecto al gazpacho blanco y al que se adiciona extracto de alcachofa.

**Tabla 28.** Crecimiento de aerobios mesófilos (ufc/mL) en la prueba C

MUESTRA	DÍAS DE ALMACENAMIENTO						SIG
	0	7	13	18	25	30	
<i>Gb30</i>	0,9x10 <sup>3</sup> ±2,85	1,2x10 <sup>3</sup> ±1,95	>3,0x10 <sup>3</sup>	>3,0x10 <sup>3</sup>	>3,0x10 <sup>3</sup>	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
<i>G5af30</i>	0,9x10 <sup>3</sup> ±3,56	0,9x10 <sup>3</sup> ±4,15	>3,0x10 <sup>3</sup>	>3,0x10 <sup>3</sup>	>3,0x10 <sup>3</sup>	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
<i>G2aj30</i>	0,8x10 <sup>2</sup> ±2,58	1,0x10 <sup>2</sup> ±2,48	1,1x10 <sup>2</sup> ±2,83	1,2x10 <sup>3</sup> ±1,45	1,5x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	NS
<b>Significación</b>	*	*	*	*	*	*	
<i>Gb60</i>	0,4x10 <sup>3</sup> ±3,01	10 <sup>3</sup> ±1,85	1,2x10 <sup>3</sup> ±4,01	2,0x10 <sup>3</sup> ±1,85	>3,0x10 <sup>3</sup>	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
<i>G5af60</i>	0,3x10 <sup>3</sup> ±1,93	0,9x10 <sup>3</sup> ±2,02	1,8x10 <sup>3</sup> ±1,45	2,3x10 <sup>3</sup> ±3,85	2,9x10 <sup>3</sup> ±1,85	>3,0x10 <sup>3</sup>	*
<i>G2aj60</i>	0,5x10 <sup>2</sup> ±1,56	1,2x10 <sup>2</sup> ±1,85	1,1x10 <sup>2</sup> ±2,85	1,2x10 <sup>2</sup> ±3,86	1,3x10 <sup>2</sup> ±3,58	1,4x10 <sup>2</sup> ±2,95	NS
<b>Significación</b>	*	*	*	*	*	*	
<i>Gb75</i>	0,3x10 <sup>2</sup> ±2,38	0,7x10 <sup>2</sup> ±2,35	0,8x10 <sup>2</sup> ±3,12	1,4x10 <sup>2</sup> ±2,55	2,0x10 <sup>2</sup> ±2,55	2,0x10 <sup>2</sup> ±4,85	NS
<i>G5af75</i>	0,3x10 <sup>2</sup> ±3,85	0,6x10 <sup>2</sup> ±3,84	0,7x10 <sup>2</sup> ±2,63	1,4x10 <sup>2</sup> ±2,95	1,6x10 <sup>2</sup> ±4,85	2,0x10 <sup>2</sup> ±2,55	NS
<i>G2aj75</i>	0,3x10 <sup>2</sup> ±2,23	0,5x10 <sup>2</sup> ±3,57	0,7x10 <sup>2</sup> ±1,75	0,7x10 <sup>2</sup> ±1,85	0,9x10 <sup>2</sup> ±1,58	0,9x10 <sup>2</sup> ±3,85	NS
<b>Significación</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
<i>Gb90</i>	0,9x10 <sup>2</sup> ±2,85	0,4x10 <sup>2</sup> ±2,75	0,6x10 <sup>2</sup> ±1,04	0,5x10 <sup>2</sup> ±3,85	0,9x10 <sup>2</sup> ±3,85	0,8x10 <sup>2</sup> ±2,95	NS
<i>G5af90</i>	0,9x10 <sup>2</sup> ±1,85	0,6x10 <sup>2</sup> ±2,85	0,6x10 <sup>2</sup> ±3,07	0,6x10 <sup>2</sup> ±3,53	0,4x10 <sup>2</sup> ±2,89	0,9x10 <sup>2</sup> ±2,78	NS
<i>G2aj90</i>	0,5x10 <sup>2</sup> ±2,85	0,6x10 <sup>2</sup> ±3,85	0,4x10 <sup>2</sup> ±3,98	0,2x10 <sup>2</sup> ±2,58	0,4x10 <sup>2</sup> ±5,03	0,6x10 <sup>2</sup> ±2,97	NS
<b>Significación</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
<b>Significación entre T<sup>a</sup></b>	*	*	*	*	*	*	

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

Tras el estudio estadístico de los resultados del envasado a distintas temperaturas se puede concluir, que la temperatura de envasado de 75°C es suficiente para las tres muestras de gazpacho (blanco, con extracto de ajo y extracto de alcachofa) para inhibir el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos. Que en temperaturas por debajo de 75°C, las muestras a las que se añade extracto de ajo inhiben el crecimiento de aerobios mesófilos de manera significativa en comparación con las muestras de gazpacho a las que no se añade extractos y las que se añadieron extractos de alcachofa.

#### **4.3.4 Optimización y desarrollo de pasta refrigerada**

Como segundo plato preparado se aplican los extractos de ajo y alcachofa obtenidos en la elaboración de pasta refrigerada. La elección de este plato se debe a los datos publicados por MAGRAMA (2013) en cuanto a las variedades de platos preparados consumidos en los hogares españoles en el año 2013 en los que los platos de pasta refrigerada ocupan el tercer puesto (17,7%) siendo las sopas frías, entre las que se encuentra el gazpacho, las que encabezan este ranking con un 34,8% de consumo, seguidos por los platos preparados congelados con una cuota de consumo del 21,2%.

En los capítulos anteriores se ha demostrado que la capacidad antimicrobiana del extracto de ajo obtenido y la capacidad antioxidante del extracto de alcachofa aumentan conforme aumenta la concentración del extracto, por lo que se realizan unos ensayos preliminares para determinar la concentración máxima de extractos que son aceptados por el consumidor.

Se preparan platos de pasta refrigerada con distintas concentraciones de extractos y se determinan sensorialmente cuales son las dosis máximas aceptadas por el panel de catadores expertos en la calidad de platos preparados, compuesto por seis personas de edades comprendidas entre 30-60 años, pertenecientes al CTC. En este análisis cada



juez puntúa la muestra con un valor de “TÍPICO” o “ATÍPICO” de acuerdo a la guía para la realización de estudios de vida útil publicada por la Comisión Europea (2008). Se realiza un control sensorial de la pasta refrigerada recién elaborada y se les pide a los jueces que valoren los parámetros sensoriales color, olor, sabor y textura, para determinar la aceptabilidad organoléptica del producto a distintas concentraciones de extractos.

La pasta se elabora de acuerdo al procedimiento descrito en materiales y métodos. Se elaboran un total de 7 muestras, tres muestras a las que se añade en el agua de cocción 2g/L, 4g/L y 6 g/l de extracto de ajo, tres muestras a las que se añade 5 g/L, 6 g/L y 8 g/L de extracto de alcachofa en el agua de cocción y una última muestra a la que no se le añade extractos. Las muestras se codifican de acuerdo a la **Tabla 29**.

**Tabla 29.** Características de las muestras de pasta ensayos preliminares

MUESTRA	EXTRACTO (g/L) ( $\bar{X} \pm SD$ )	CÓDIGO
<i>BLANCO</i>	-	<i>Pb</i>
<i>ALCACHOFA</i>	5 $\pm$ 0,01	<i>P5af</i>
	6 $\pm$ 0,02	<i>P6af</i>
	8 $\pm$ 0,01	<i>P8af</i>
<i>AJO</i>	2 $\pm$ 0,02	<i>P2aj</i>
	4 $\pm$ 0,02	<i>P4aj</i>
	6 $\pm$ 0,02	<i>P6aj</i>

Las tres muestras a las que se añadió extracto de ajo o extracto de alcachofa se presentan de manera conjunta con la muestra de pasta a la que no se añadió ningún tipo de extracto en el agua de cocción. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 30**.

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial (**Tabla 30**), muestran para el caso de la pasta a la que se añade extracto de ajo en el agua de cocción, que para concentraciones de 6g/L y 8g/L no son aceptables en relación a los parámetros olor y sabor, por lo que se decide utilizar la concentración máxima de 4 g/L, valorada como TÍPICA en todos los parámetros sensoriales.

**Tabla 30.** Análisis sensorial de pasta ensayos preliminares

MUESTRA	COLOR	OLOR	SABOR	TEXTURA
<i>Pb</i>	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO
<i>P5af</i>	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO
<i>P6af</i>	ATÍPICO	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO
<i>P8af</i>	ATÍPICO	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO
<i>P2aj</i>	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO
<i>P4aj</i>	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO	TÍPICO
<i>P6aj</i>	TÍPICO	ATÍPICO	ATÍPICO	TÍPICO

De acuerdo a las valoraciones obtenidas para la pasta a la que se añade extracto de alcachofa, la concentración máxima valorada como TÍPICA por los catadores en todos los parámetros evaluados es la de 5 g/L, que se usará en los ensayos posteriores.

#### 4.4. VIDA ÚTIL DE GAZPACHO REFRIGERADO

Con los resultados de los ensayos preliminares se decide que la concentración óptima de extracto de ajo a utilizar es de 2 g/L y de 5 g/L para el extracto de alcachofa. De acuerdo a los resultados sensoriales obtenidos se decide no aplicar temperatura al gazpacho antes de su envasado para preservar las características sensoriales del producto. Los ingredientes que se utilizan son los mismos que en los ensayos preliminares y en las mismas proporciones. Se realizan dos pruebas de envasado con el

objeto de aumentar la vida útil del gazpacho lo máximo posible, para conseguir un tiempo suficiente para su comercialización, que para este tipo de elaborados debe ser superior a 30 días, de acuerdo con los productos comerciales de gazpacho refrigerado que se encuentran en los lineales de los puntos de venta al público. En la primera prueba de envasado, denominada **PRUEBA D**, el gazpacho elaborado se envasa en botella de cristal de 212 mL y se almacena en condiciones de refrigeración, durante el tiempo de vida útil. En la segunda prueba, denominada **PRUEBA E**, el gazpacho se envasa en tarrinas plásticas con atmósfera protectora.

Las muestras obtenidas en ambas pruebas son sometidas al estudio de vida útil, de acuerdo al artículo 3.2 del Reglamento (CE) 20173/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. La metodología que se sigue es la propuesta por la comisión europea en 2008 en la guía para la realización de estudios de vida útil.

#### **4.4.1. Estudio de vida útil de las muestras de gazpacho PRUEBA D**

En la **PRUEBA C** se demuestra que para poder observar un efecto antimicrobiano con la adición de extractos hay que utilizar una temperatura de envasado baja (por debajo de 75°C). En esta prueba las muestras de gazpacho a las que no se les adicionan ningún extracto, a las que se les adiciona 2 g/L de extracto de ajo y 5 g/L de extracto de alcachofa, se envasan a temperatura ambiente en botellas de cristal de 212 mL y se almacena en refrigeración. En esta **PRUEBA D** se utilizó la misma materia prima que se utilizará en la **PRUEBA E**, para de este modo eliminar variables que puedan influir en los resultados del estudio de vida útil y poder concluir el efecto de la utilización del envasado en atmósfera protectora en tarrinas frente el envasado en botellas de vidrio.

En la **Tabla 31** aparecen descritas las muestras elaboradas, así como el código utilizado para cada una de ellas.

**Tabla 31.** Características de las muestras de gazpacho de la prueba D

MUESTRA	EXTRACTO (g/L) ( $\bar{X} \pm SD$ )	T <sup>a</sup> ENVASADO (°C) ( $\bar{X} \pm SD$ )	CÓDIGO
BLANCO	-	30	GbBOT
ALCACHOFA	5±0,01	30	G5afBOT
AJO	2±0,01	30	G2ajBOT

Durante el almacenamiento de las muestras se realiza un seguimiento de A. mesófilos, E.coli, Listeria, L. monocytogenes y Salmonella spp. Los resultados aparecen en la **Tabla 32**.

Se encuentran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos aplicados al gazpacho (blanco, extracto de alcachofa y ajo), siendo las muestras de gazpacho a las que se añade extracto de ajo significativamente distintas, con respecto al gazpacho sin adición de extractos y con extracto de alcachofa.

Los resultados de la **Tabla 32**, muestran que las muestras que no tienen extractos y las muestras de gazpacho a las que se añaden extracto de alcachofa, presentan una calidad microbiológica aceptable para su consumo durante 10 días almacenadas a 4°C.

**Tabla 32.** Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba D

		DÍAS DE ALMACENAMIENTO					
MUESTRA	ANÁLISIS	0	3	10	18	30	Sig
GbBOT	<i>A.mesófilos</i> , (ufc/g)	0,3x10 <sup>3</sup> ±2,98	0,7x10 <sup>3</sup> ±1,78	5,8x10 <sup>3</sup> ±1,45	>3,0x10 <sup>5</sup>	>3,0x10 <sup>5</sup>	*
	<i>E.coli</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>Rto.Listeria</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>L. monocytogenes</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<i>Salmonella spp</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	-----						
G5afBOT	<i>A.mesófilos</i> , (ufc/g)	0,3x10 <sup>3</sup> ±3,67	0,8x10 <sup>3</sup> ±1,75	4,0x10 <sup>3</sup> ±4,01	>3,0x10 <sup>5</sup>	>3,0x10 <sup>5</sup>	*
	<i>E.coli</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>Rto.Listeria</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>L. monocytogenes</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<i>Salmonella spp</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	-----						
G2ajBOT	<i>A.mesófilos</i> , (ufc/g)	0,04x10 <sup>3</sup> ±3,56	0,4x10 <sup>3</sup> ±1,94	3,4x10 <sup>3</sup> ±3,85	7,8x10 <sup>3</sup> ±1,7	>3,0x10 <sup>5</sup>	*
	<i>E.coli</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>Rto.Listeria</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>L. monocytogenes</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<i>Salmonella spp</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<b>Significación</b>		NS	NS	*	*	NS

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

Se encuentran diferencias significativas en el crecimiento de aerobios mesófilos durante los días de almacenamiento para todas las muestras, lo que pone de manifiesto el efecto del tiempo de almacenamiento sobre el crecimiento microbiano. En los análisis realizados para *E.coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*, se encontró el mismo resultado, ausencia para los tres patógenos, este resultado se debe a que las muestras fueron tratadas de acuerdo a las guías de buenas prácticas de fabricación de platos preparados publicada por la Consejería de Sanidad de la Región de Murcia en 2010. Este resultado corrobora que el extracto de

alcachofa obtenido no presenta propiedades antimicrobianas, ya que evoluciona de manera similar a las muestras de gazpacho blanco. En el caso del gazpacho en el que se adicionó 2 g/L de extracto de ajo, esta calidad microbiológica se prolongó hasta 18 días tras su elaboración, almacenado a 4°C.

Los valores de referencia que se establecen, son los que aparecen en el Reglamento (CE) 20173/2005, en el que indican que no debe haber crecimiento en ninguno de los microorganismos analizados, excepto en el caso de aerobios mesófilos que permite hasta 10<sup>6</sup> ufc/g.

Se analiza el pH e índice de peróxidos (**Tabla 33**), en las tres muestras de gazpacho elaboradas en la **PRUEBA D**. No se analizó el contenido en grasa, porque en los estudios preliminares se comprobó que no existían diferencias de este parámetro ni por efecto del tiempo ni del extracto durante almacenamiento. EL valor de pH si se controla, aunque no varía, como indicador de la calidad del gazpacho.

**Tabla 33.** Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba D

MUESTRA	ANÁLISIS	DÍAS DE ALMACENAMIENTO					Sig
		0	3	10	18	30	
GbBOT	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	6,2±0,1	5,5±0,3	7,6±0,1	19,8±0,2	25,4±0,3	*
	pH	4,10±0,03	4,00±0,02	4,08±0,03	4,06±0,01	4,03±0,02	NS
G2ajBOT	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	7,7±0,3	6,6±0,1	8,5±0,1	22,0±0,2	26,6±0,3	*
	pH	4,02±0,01	4,10±0,02	4,08±0,02	4,05±0,03	4,10±0,01	NS
G5afBOT	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	2,5±0,1	1,2±0,3	2,1±0,1	4,5±0,1	5,0±0,2	NS
	pH	4,01±0,01	4,10±0,01	4,09±0,03	4,03±0,02	4,07±0,03	NS
<b>Significación</b>	<b>I.Peroxidos</b>	*	*	*	*	*	
	<b>pH</b>	NS	NS	NS	NS	NS	

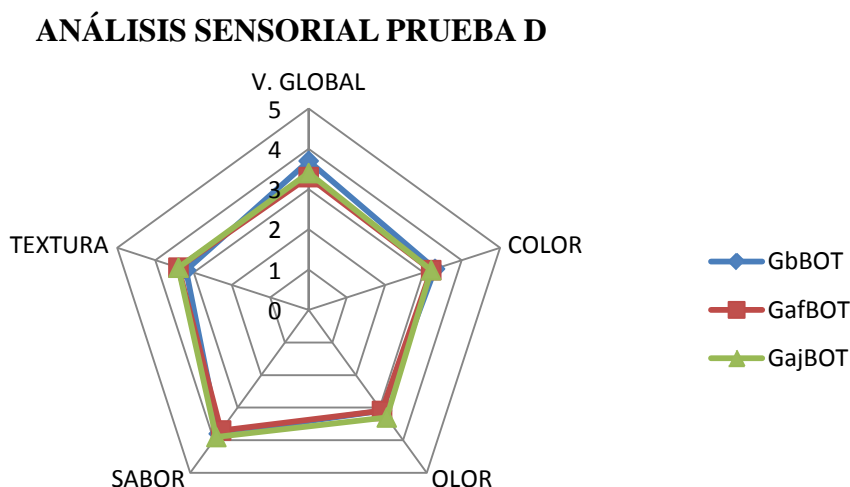
NS: No significativo; \*Diferencias significativas P<0,05

No se encontraron diferencias significativas en relación a la evolución del pH con respecto al tiempo de almacenamiento, ni entre los distintos tratamientos (blanco, ajo y alcachofa). Para los resultados obtenidos en la evolución del índice de peróxidos si existen diferencias significativas entre los tres tratamientos, el gazpacho con extracto de alcachofa es significativamente distinto con respecto al gazpacho sin adición de extractos y el gazpacho al que se le adicionó el extracto de ajo.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a los valores del índice de peróxidos y los días de almacenamiento para las muestras de gazpacho con extracto de alcachofa. En las muestras de gazpacho con extracto de ajo y blanco si existen diferencias significativas con respecto a la evolución del índice de peróxidos respecto a los días de almacenamiento. Las muestras de gazpacho G5afBOT presentan menor índice de peróxidos que en las muestras elaborados sin extractos, GbBOT, y las muestras de gazpacho a las que se les añadió 2 g/L de extracto de ajo, G2ajBOT. Esto demuestra que la adición de 5 g/L extracto de alcachofa en gazpacho retarda su oxidación.

Por último se realiza el análisis sensorial de las tres muestras elaboradas, a los diez días de almacenamiento, ya que a partir de esta fecha las muestras de gazpacho Blanco y con extracto de alcachofa no son aptas para su consumo. Se sigue la metodología descrita en el capítulo 3 de materiales y métodos de esta tesis. Cada persona que participó en la cata recibió un cuestionario previamente diseñado. En él se pedía evaluar los parámetros color, olor, sabor, textura y valorar globalmente el producto utilizando una escala hedónica de intervalo cinco puntos en la que el valor 3 es el límite de aceptación.

En la **Figura 18** se muestran las puntuaciones de las muestras obtenidas para cada parámetro sometido a estudio.



**Figura 18.** Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba D

Los resultados de los parámetros sensoriales analizados muestran que para todas las muestras elaboradas se obtiene una puntuación en torno al valor 3 de aceptabilidad, no encontrando diferencias significativas entre los tres tratamientos de gazpacho en ninguno de los parámetros evaluados, tras la utilización del Test ANOVA.

De acuerdo a la guía para la realización de estudios de vida útil publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un control sensorial durante el estudio de vida útil para determinar la aceptabilidad organoléptica del producto, realizando una cata con el personal del departamento, experto en la fabricación de gazpacho comercial, compuesto por seis personas de edades comprendidas entre 30-60 años. En este análisis cada juez puntúa la muestra con un valor de “TIPICO” o “ATIPICO” de acuerdo a la experiencia de los jueces. Este análisis se realizó para todas las muestras durante los días 0, 3, 10 y 18 días de almacenamiento. En todos las muestras y para todos los parámetros valorados, color, olor, sabor y textura, se obtuvo una puntuación “TIPICO”, a partir de esta fecha no se continua con el examen



sensorial al presentar las muestras recuentos en microorganismos aerobios mesófilos superiores a las recomendaciones de salubridad.

Por último, de acuerdo a la guía publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un análisis nutricional de las 3 muestras, **Tabla 34**, a los 18 días de almacenamiento de las tres muestras.

**Tabla 34.** Resultados del análisis nutricional de la prueba D de gazpacho

DETERMINACIÓN	GbTAR	G5afTAR	G2ajTAR	Sig
<i>Cinarina mg/Kg</i>	-	21,2±0,5	-	
<i>Cenizas Totales g/100g</i>	1,3±0,1	1,4±0,2	1,3±0,2	NS
<i>Grasa g/100g</i>	8,5±0,5	8,2±0,2	8,1±0,2	NS
<i>Hidratos de Carbono g/100g</i>	5,2±0,3	5,3±0,2	5,1±0,3	NS
<i>Proteínas g/100g</i>	0,9±0,1	0,8±0,2	0,9±0,2	NS
<i>Sal g/100g</i>	1,2±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	NS
<i>Valor energético KJ/100g</i>	418±0,7	407±0,7	402±0,3	NS
<i>Valor energético Kcal/100g</i>	101±0,7	98±0,7	97±0,3	NS

NS: Diferencias no significativas

No se han encontrado diferencias significativas en los valores nutricionales en ninguna de las tres muestras de gazpacho (blanco, extracto de ajo y extracto de alcachofa). La adición de extractos de alcachofa y ajo al gazpacho, solo afecta nutricionalmente a la aparición de la cinarina en las muestras de gazpacho enriquecidas con 5 g/L de extracto de alcachofa.

#### 4.4.2. Estudio de vida útil de las muestras de gazpacho PRUEBA E

En esta prueba el objetivo es aumentar la vida útil del gazpacho para conseguir un tiempo de vida útil mínimo de 30 días, valor de vida útil de los gazpachos refrigerados envasados en cartón (Alimarket, 2010). Una vez se elaboran los tres tipos de muestras, blanco, con adición de 2 g/L de extracto de ajo y gazpacho con adición de 5 g/L de extracto de alcachofa, estas

son envasadas sin tratamiento térmico en tarrinas de 250 mL en atmósfera modificada (20% CO<sub>2</sub>+80%N<sub>2</sub>).

En la **Tabla 35** aparecen descritas las muestras elaboradas, así como el código utilizado para cada una de ellas.

**Tabla 35.** Características de las muestras de gazpacho de la prueba E

	EXTRACTO g/L	% CO <sub>2</sub> %N <sub>2</sub>	T <sup>a</sup> ENVASADO °C	CÓDIGO
<i>BLANCO</i>	-	20 80	30	<i>GbTAR</i>
<i>ALCACHOFA</i>	5	20 80	30	<i>G5afTAR</i>
<i>AJO</i>	2	20 80	30	<i>G2ajTAR</i>

Durante 30 días se realiza un seguimiento de *A. mesófilos*, *E.coli*, *Listeria*, *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* Los resultados aparecen en la **Tabla 36**.

Se observan diferencias significativas entre el gazpacho al que se añadió extracto de ajo y los otros dos tratamientos. También se hallaron, para los tres tratamientos, diferencias significativas en el recuento de aerobios mesófilos a partir de los 45 días de almacenamiento. En los análisis realizados para *E.coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, se encontró el mismo resultado, ausencia para los tres patógenos, este resultado se debe a que las muestras fueron tratadas de acuerdo a las guías de buenas prácticas de fabricación de platos preparados publicada por la Consejería de Sanidad de la Región de Murcia en 2010.

Tabla 36. Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba E

MUESTRA	ANÁLISIS	DÍAS DE ALMACENAMIENTO						Sig
		0	4	18	30	45	60	
<b>GbTAR</b>		$0,2 \times 10^2 \pm 2,14$	$0,1 \times 10^2 \pm 2,37$	$0,2 \times 10^2 \pm 3,12$	$0,2 \times 10^2 \pm 2,98$	$4,2 \times 10^2 \pm 2,34$	$>3 \times 10^3$	*
	<i>E.coli</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>Rto.Listeria</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>L.monocytogenes</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<i>Salmonella</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
<b>G5ajTAR</b>	<i>A.mesófilos</i> , (ufc/g)	$0,04 \times 10^2 \pm 1,84$	$0,08 \times 10^2 \pm 1,98$	$0,07 \times 10^2 \pm 1,45$	$0,1 \times 10^2 \pm 2,76$	$3,9 \times 10^2 \pm 2,65$	$>3 \times 10^5$	*
	<i>E.coli</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>Rto.Listeria</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>L.monocytogenes</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<i>Salmonella</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
<b>G2ajTAR</b>	<i>A.mesófilos</i> , (ufc/g)	$0,1 \times 10^2 \pm 2,14$	$0,02 \times 10^2 \pm 1,14$	$0,06 \times 10^2 \pm 2,76$	$0,1 \times 10^2 \pm 3,14$	$0,6 \times 10^2 \pm 1,44$	$1,0 \times 10^2 \pm 2,98$	*
	<i>E.coli</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>Rto.Listeria</i> , (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NS
	<i>L. monocytogenes</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<i>Salmonella</i> , (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
<b>Significación</b>		NS	NS	NS	NS	*	*	

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

En relación a la evolución del índice de peróxidos en estas muestras se combina el efecto de la utilización de la atmósfera protectora con la adición del extracto de alcachofa. Así, las muestras de gazpacho con extracto de alcachofa son diferentes significativamente a las de gazpacho blanco y con extracto de ajo. En cuanto el pH, no existen diferencias significativas entre las muestras ni a lo largo del tiempo de almacenamiento. En la **Tabla 37** aparecen los valores del índice de peróxidos y pH. Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos para el gazpacho envasado en botellas de vidrio en cuanto a que el gazpacho con extracto de alcachofa presenta valores menores durante el almacenamiento, aunque los gazpachos envasados en atmósfera modificada los mantienen durante más tiempo.

**Tabla 37.** Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba E

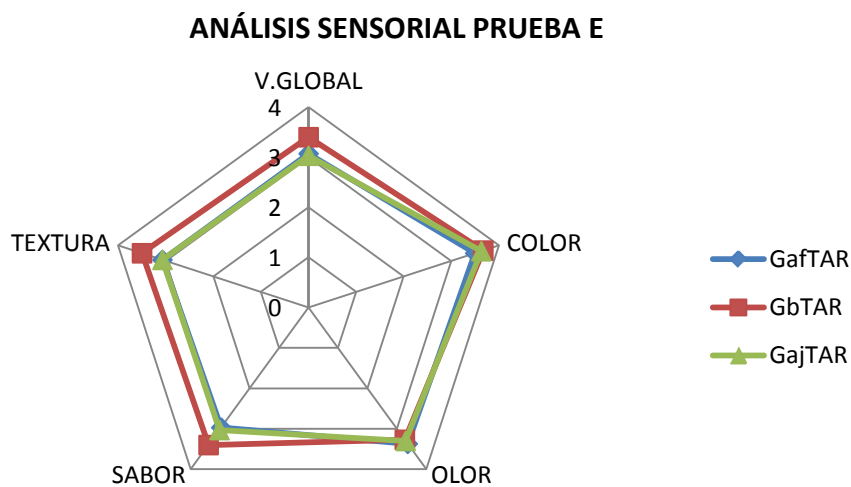
MUESTRA	ANÁLISIS	DÍAS DE ALMACENAMIENTO						Sig
		0	4	18	30	45	60	
GbTAR	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	7,5±0,1	8,4±0,4	7,8±0,2	9,7±0,2	12,2±0,2	19,2±0,2	*
	pH	4,10±0,02	4,15±0,02	4,12±0,02	4,13±0,01	4,10±0,02	4,12±0,02	NS
G2ajTAR	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	8,1±0,1	7,5±0,1	9,3±0,2	9,5±0,3	10,9±0,3	18,6±0,1	*
	pH	4,12±0,03	4,13±0,01	4,20±0,03	4,18±0,02	4,12±0,01	4,16±0,01	NS
G5afTAR	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	5,9±0,3	5,5±0,1	5,8±0,1	5,9±0,3	7,1±0,2	9,8±0,1	*
	pH	4,16±0,03	4,20±0,01	4,12±0,02	4,10±0,01	4,10±0,01	4,15±0,02	NS
Significación	I.Peróxidos	NS	NS	*	*	*	*	
	pH	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

NS: No significativo; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

En las tres muestras de gazpacho refrigerado de la **PRUEBA E** se realiza el análisis sensorial a los 45 días de elaboración, debido a que a partir de este día, el gazpacho presenta recuentos altos y un valor de peróxidos muy elevado. Igual que en las pruebas

anteriores, cada persona que participó en la cata, 60 catadores, recibió un cuestionario previamente diseñado. En él se pedía evaluar los parámetros color, olor, sabor, textura y valorar globalmente el producto utilizando una escala hedónica de intervalo cinco puntos en la que el valor 3 es el límite de aceptación.

En la **Figura 19** se muestran las puntuaciones de las muestras obtenidas para cada parámetro sometido a estudio.



**Figura 19.** Resultados del análisis sensorial de las muestras de gazpacho con distintas concentraciones de extracto de alcachofa y extracto de ajo de la prueba E

En general, los valores obtenidos para las muestras de gazpacho a las que se les adicionó extracto de alcachofa (5 g/L) y extracto de ajo (2 g/L), son comparables con los valores obtenidos en las muestras de gazpacho a las que no se adicionó ningún extracto, no obteniéndose diferencias significativas en cuanto a los parámetros color y olor. El gazpacho sin adición de extractos es significativamente diferente al gazpacho al que se le añadieron extractos de ajo y alcachofa en los parámetros valoración global, textura y sabor.

De acuerdo a la guía para la realización de estudios de vida útil publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un control sensorial durante el estudio de vida útil para determinar la aceptabilidad organoléptica del producto, realizando una cata con el personal del departamento, experto en la fabricación de gazpacho comercial, compuesto por seis personas de edades comprendidas entre 30-60 años. En este análisis cada juez puntúa la muestra con un valor de “TÍPICO” o “ATÍPICO” de acuerdo a la experiencia de los jueces. Este análisis se realizó para todas las muestras durante los días 0,4, 18, 30, 45 y 60 días de almacenamiento. Hasta el día 30 en todas las muestras se obtuvo en los parámetros valorados, color, olor y textura, una puntuación “TÍPICO”, a partir de esta fecha se observan en todas las muestras en los parámetros color, sabor y textura el valor “ATÍPICO”.

Por último, de acuerdo a la guía publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un análisis nutricional de las 3 muestras de la prueba E, envasado en tarrinas plásticas en atmósfera modificada, Tabla 38, a los 30 días de almacenamiento de las tres muestras.

No se han encontrado diferencias significativas en los valores nutricionales en ninguna de las tres muestras de gazpacho (blanco, extracto de ajo y extracto de alcachofa). La adición de extractos de alcachofa y ajo al gazpacho, solo afecta nutricionalmente a la aparición de la cinarina en las muestras de gazpacho enriquecidas con 5 g/L de extracto de alcachofa, G5afTAR. Así mismo los valores obtenidos coinciden con marcas comerciales de gazpacho de la mayoría de las marcas consultadas que se encuentran en el mercado (Carrefour y Hacendado) y en revista Consumer, artículo “Gazpacho en brik y en frasco, pasteurizado y refrigerado” (2007).

**Tabla 38.** Resultados del análisis nutricional de la prueba E de gazpacho

DETERMINACIÓN	GbTAR	G5afTAR	G2ajTAR	Sig
<i>Cinarina mg/Kg</i>	-	18,2±0,5	-	
<i>Cenizas Totales g/100g</i>	1,2±0,1	1,2±0,2	1,2±0,2	NS
<i>Grasa g/100g</i>	7,5±0,5	8,0±0,2	7,9±0,2	NS
<i>Hidratos de Carbono g/100g</i>	5,2±0,3	4,9±0,2	5,3±0,3	NS
<i>Proteínas g/100g</i>	0,8±0,1	0,8±0,2	0,9±0,2	NS
<i>Sal g/100g</i>	1,0±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	NS
<i>Valor energético KJ/100g</i>	386±0,7	390±0,7	391±0,3	NS
<i>Valor energético Kcal/100g</i>	93±0,7	94±0,7	94±0,3	NS

NS: No significativo

Se concluye que estas dosis de extracto de ajo (2 g/L) y extracto de alcachofa (5 g/L) son susceptibles de ser utilizadas como ingredientes antimicrobiano (ajo) y antioxidante (alcachofa) para la fabricación de gazpacho refrigerado, con una vida útil de 30 días. El gazpacho envasado en atmósfera modificada presenta una vida útil mayor que los envasados en botellas de vidrio, ya que el CO<sub>2</sub> tiene poder bacteriostático y la ausencia de oxígeno retarda la oxidación del producto y evita el crecimiento de microorganismos aerobios.

Estos resultados de vida útil de gazpacho refrigerado, concuerdan con los publicados por Elez-Matínez y col., (2006) para gazpacho fresco tratado con pulsos eléctricos y por Ghawi y col., (2014) para sopas de tomate aditivadas con diferentes especias.

#### 4.5. VIDA ÚTIL DE PASTA CON TOMATE REFRIGERADA

Como segundo plato preparado se realiza la elaboración de un plato de pasta cocida refrigerada, para determinar si la adición de los extractos de ajo y alcachofa obtenidos son capaces de aumentar la vida útil de este producto que copa el 12% del mercado en 2012 de platos preparados (Magrama, 2012).

Las diferentes etapas de proceso seguidas para la elaboración y envasado de la pasta refrigerada, consisten en la cocción de la pasta con y sin extractos en un calderín. El extracto se añade en el agua de cocción, en la cantidad de 4 g/L de extracto de ajo y 5g/L de extracto de alcachofa. Una vez cocida la pasta se procedía a la preparación de la salsa de tomate de manera independiente en un calderín.

Los ingredientes y proporciones utilizados para la cocción de la pasta y la elaboración del tomate frito se describen en las **Tabla 39**. Posteriormente se mezcla la pasta cocida con la salsa de tomate y se realizan dos pruebas de envasado de la pasta. En la **PRUEBA F**, el envasado de la pasta con la salsa de tomate se realiza al vacío en tarrinas con una capacidad de 250 gramos al vacío. En la segunda prueba de envasado, **PRUEBA G**, el envasado se realiza en las mismas tarrinas de 250 gr en atmósfera de 80% N<sub>2</sub> + 20 CO<sub>2</sub>. Las muestras obtenidas en ambas pruebas se almacenan en refrigeración para la determinación de su vida útil.

**Tabla 39.** Cocción de pasta y elaboración de salsa de tomate

PASTA			SALSA DE TOMATE		
INGREDIENTE	%	Gramos	INGREDIENTE	%	Gramos
<i>Pasta seca</i>	27,1	1500±2,7	<i>Tomate</i>	93	4000±6,8
<i>agua</i>	72,4	4000±4,6	<i>Aceite</i>	5	215±2,5
<i>Aceite Oliva VE</i>	0,4	20±0,98	<i>Sal</i>	2	86±0,98
<i>sal</i>	0,1	5±0,3	<i>Orégano</i>	0.07	3±0,09
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>5525±9,6</b>	<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>4300±8,7</b>



#### 4.5.1. Estudio de vida útil de las muestras de pasta de la PRUEBA F

Las muestras de pasta elaboradas en la **PRUEBA F** y envasadas al vacío se codifican según se muestra en la **Tabla 40** y se les realiza un estudio de vida útil de acuerdo a la guía publicada por la Comisión Europea (2008), bajo las directrices del artículo 3 del Reglamento (CE) 20173/2005. Se realiza un seguimiento microbiológico, análisis físico químico y análisis sensorial.

**Tabla 40.** Características de las muestras de pasta de la prueba F

<b>MUESTRA</b>	<b>EXTRACTO g/L</b>	<b>ATÓSFERA ENVASADO</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>BLANCO</i>	-	VACIO	<i>PbVAC</i>
<i>ALCACHOFA</i>	5	VACIO	<i>PafVAC</i>
<i>AJO</i>	4	VACIO	<i>PajVAC</i>

Los análisis se realizan según el Reglamento (CE) 20173/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 41**.

**Tabla 41.** Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba F

MUESTRA	ANÁLISIS	DÍAS DE ALMACENAMIENTO				Sig
		1	7	15	30	
<b>PbVAC</b>	A.mesófilos, (ufc/g)	0,006x10 <sup>3</sup> ±0,98	0,01x10 <sup>3</sup> ±1,34	2,8x10 <sup>3</sup> ±2,65	>3,0x10 <sup>5</sup>	*
	E.coli, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	Rto.Listeria, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	L. monocytogenes, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	Salmonella, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
<b>PafVAC</b>	A.mesófilos, (ufc/g)	0,05x10 <sup>3</sup> ±1,98	0,01x10 <sup>3</sup> ±2,76	2,0x10 <sup>3</sup> ±3,89	>3,0x10 <sup>5</sup>	*
	E.coli, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	Rto.Listeria, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	L. monocytogenes, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	Salmonella, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
<b>PajVAC</b>	A.mesófilos, (ufc/g)	0,01x10 <sup>3</sup> ±2,45	0,03x10 <sup>3</sup> ±2,76	2,0x10 <sup>3</sup> ±2,76	13,0x10 <sup>3</sup> ±4,86	*
	E.coli, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	Rto.Listeria, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	L. monocytogenes, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	Salmonella, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
<b>Significación</b>		NS	NS	NS	*	

NS: No significativo; \* Diferencias significativas  $P < 0,05$

En la **Tabla 41** de los resultados microbiológicos se observa que, a excepción de las muestras de pasta en las que se añade al agua de cocción 4 g/L de extracto de ajo, a partir de los 15 días de almacenamiento, presentan unos valores de ufc/g de aeróbios mesófilos superiores a los recomendados para la higiene alimentaria de este tipo de alimentos. Existen diferencias significativas entre las tres muestras, la pasta en la que se utilizó extracto de ajo es estadísticamente diferente a las otras dos muestras.

En los análisis realizados para *E.coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*, se encontró el mismo resultado, ausencia para los tres patógenos, este resultado se debe a que las muestras fueron tratadas de acuerdo a las guías de buenas prácticas de fabricación de platos preparados publicada por la Consejería de Sanidad de la Región de Murcia en 2010.

En la **Tabla 42** se muestran los valores medios de los parámetros físico-químicos analizados durante la vida útil de producto.

**Tabla 42.** Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba F

MUESTRA	ANÁLISIS	DIAS DE ALMACENAMIENTO				Sig
		1	7	15	30	
<b>PbVAC</b>	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	9,5±0,1	10,1±0,3	16,9±0,2	22,5±0,3	*
	pH	5,46±0,01	5,48±0,02	5,47±0,03	5,42±0,02	NS
<b>PajVAC</b>	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	9,8±0,2	9,7±0,1	12,2±0,1	21,8±0,2	*
	pH	5,47±0,02	5,47±0,01	5,45±0,01	5,40±0,02	NS
<b>PafVAC</b>	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	9,2±0,3	9,3±0,3	9,5±0,1	9,5±0,2	NS
	pH	5,60±0,01	5,47±0,03	5,47±0,02	5,40±0,03	NS
<b>Significación</b>	<b>Peróxidos</b>	NS	NS	*	*	
	<b>pH</b>	NS	NS	NS	NS	

NS: No significativo; \* Diferencias significativas  $P < 0,05$

Los valores obtenidos en el índice de peróxidos para las muestras en las que se añadió 5 g/L de extracto de alcachofa (PafVAC) en el agua de cocción se mantienen constantes durante los 30 días de almacenamiento. Los valores del índice de peróxidos para las muestras sin adición de extractos y en las muestras que se adicionó el extracto de ajo, en

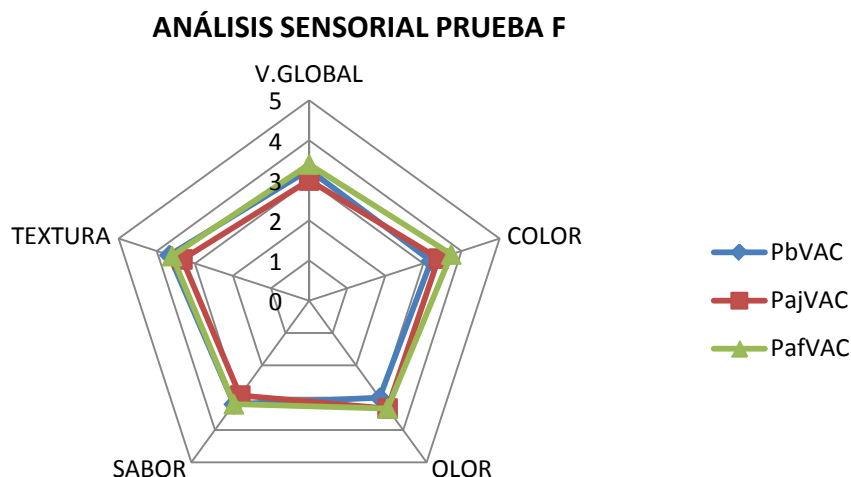
el agua de cocción, el valor del índice de peróxidos aumenta durante el almacenamiento, es decir, se oxidan conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, este valor permanece estable en la pasta con extracto de alcachofa.

La muestra de pasta que se coció con extracto de alcachofa es significativamente distinta, para un nivel de significación superior al 5%. Sin embargo para la pasta cocida con extracto de ajo y la cocida solo con agua si existen diferencias significativas en la evolución del índice de peróxidos durante el tiempo de almacenamiento.

Se realiza un análisis sensorial a los 15 días de almacenamiento, de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo de materiales y métodos de esta tesis. Se realizó una prueba de aceptación para conocer la opinión de los consumidores sobre las muestras elaboradas en la prueba F. Cada persona que participó en la cata recibió un cuestionario previamente diseñado para evaluar los parámetros color, olor, sabor, textura y valorar globalmente el producto utilizando una escala hedónica de intervalo cinco puntos en la que el valor 3 es el límite de aceptación.

En *Figura 20* se muestran las puntuaciones de las muestras obtenidas para cada parámetro sometido a estudio.

La aplicación del Test ANOVA, con un nivel de significación superior al 5%, muestra que no existe diferencia significativa entre las distintas muestras de pasta, para ninguno de los parámetros evaluados.



**Figura 20.** Resultados del análisis sensorial de las muestras de pasta con salsa de tomate envasadas al vacío de la prueba F

En la **Figura 20** se puede observar que todas las muestras obtienen valores por encima de 3, nivel de aceptabilidad del consumidor. Lo que demuestra que las concentraciones de extractos utilizados (4 g/L para el extracto de ajo y 5 g/L para el extracto de alcachofa) son aceptadas por el consumidor.

De acuerdo a la guía para la realización de estudios de vida útil publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un control sensorial durante el estudio de vida útil para determinar la aceptabilidad organoléptica del producto, realizando una cata con el personal del departamento, experto en la fabricación de gazpacho comercial, compuesto por seis personas de edades comprendidas entre 30-60 años. En este análisis cada juez puntúa la muestra con un valor de “TÍPICO” o “ATÍPICO” de acuerdo a la experiencia de los jueces. Este análisis se realizó para todas las muestras durante los días 1,7, 15 y 30 días de almacenamiento, para la pasta con extracto de ajo PajVAC . Hasta el día 15 en todas las muestras se obtuvo en los parámetros valorados, color, olor, sabor y textura, una puntuación “TÍPICO”, a partir de esta fecha se observan en todas las muestras en

los parámetros color, sabor y textura el valor “ATÍPICO”. Con respecto a las muestras sin adición de extractos y con extractos de alcachofa, la pasta presentaba valoraciones ATÍPICAS, en todos los parámetros evaluados a los 30 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

Por último, de acuerdo a la guía publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un análisis nutricional de las 3 muestras de la **PRUEBA F**, envasado en tarrinas plásticas al vacío (**Tabla 43**), a los 30 días de almacenamiento de las tres muestras.

La adición de extractos de alcachofa y ajo al agua de cocción de la pasta, solo afecta nutricionalmente a la aparición del polifenolcinarina en las muestras de pasta con tomate en las que se utilizó 5 g/L de extracto de alcachofa en el agua de cocción, PafVAC. La aplicación del test ANOVA, para un nivel de significación superior al 5%, muestra que no hay diferencias significativas en los valores nutricionales de las tres muestras de pasta.

**Tabla 43.** Resultados del análisis nutricional de la prueba F de pasta

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>PbVAC</b>	<b>PafVAC</b>	<b>PajVAC</b>	<b>Sig</b>
<i>Cinarina mg/Kg</i>	-	14,5±0,7	-	-
<i>Cenizas Totales g/100g</i>	1,2±0,4	1,3±0,1	0,8±0,1	NS
<i>Grasa g/100g</i>	1,5±0,2	1,5±0,1	1,6±0,1	NS
<i>Hidratos de Carbono g/100g</i>	21,4±0,9	23,7±2,5	25,8±3,7	NS
<i>Proteínas g/100g</i>	3,7±0,3	4,0±0,2	4,6±0,5	NS
<i>Sal g/100g</i>	1,5±0,3	1,4±0,1	1,6±0,1	NS
<i>Valor energético KJ/100g</i>	505	550	576	NS
<i>Valor energético Kcal/100g</i>	120	130	136	NS

NS: No significativo

Los resultados del análisis nutricional muestran que la adición de los extractos de alcachofa en la concentración de 5 g/L y de ajo (4 g/L) en el agua de cocción de la pasta no afecta a su composición nutricional. Así mismo los valores obtenidos coinciden con

marcas comerciales de pasta con tomate refrigerada de la mayoría de las marcas blancas que se encuentran en el mercado consultadas (Carrefour y Hacendado).

#### **4.5.2. Estudio de vida útil de muestras de pasta de la PRUEBA G.**

Las muestras de pasta elaboradas en la **PRUEBA G**, a diferencia de las elaboradas en la prueba F, están envasadas en una atmósfera protectora con un gas que contiene un porcentaje del 80% en nitrógeno y un 20% de dióxido de carbono. La operación de envasado se realiza en tarrinas de 350 gramos de pasta ya cocida con la salsa de tomate, equivalentes a las utilizadas en la **PRUEBA F**. Tras realizar el vacío la máquina envasadora inyecta la mezcla de gases (80% N<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub>) en cantidad suficiente para ocupar el espacio de cabeza de la tarrina, de esta forma se asegura la eliminación del oxígeno y la utilización de una mezcla de gases que evite el crecimiento de microorganismos y la oxidación del alimento. Las muestras así obtenidas se codifican según se muestra en la **Tabla 44** y se almacenan a 4°C durante el estudio de vida útil. Como en las pruebas anteriores, se sigue la metodología descrita en la guía publicada por la Comisión Europea (2008), bajo las directrices del artículo 3 del Reglamento (CE) 20173/2005. Se realiza un seguimiento microbiológico, control sensorial, análisis físico químico y análisis sensorial durante 30 días de almacenamiento a 4°C.

Los análisis se realizan según el Reglamento (CE) 20173/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 45**.

**Tabla 44.** Características de las muestras de pasta de la prueba G

<b>MUESTRA</b>	<b>EXTRACTO (g/L)</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	<b>ATMOSFERA ENVASADO</b>	<b>CÓDIGO</b>
<i>BLANCO</i>	-	80% N <sub>2</sub> 20% CO <sub>2</sub>	<i>PbMAP</i>
<i>ALCACHOFA</i>	5±0,3	80% N <sub>2</sub> 20% CO <sub>2</sub>	<i>PafMAP</i>
<i>AJO</i>	4±01	80% N <sub>2</sub> 20% CO <sub>2</sub>	<i>PajMAP</i>

Los resultados del seguimiento del crecimiento de aerobios mesófilos (ufc/g) en las tres muestras realizadas en la **PRUEBA G**, muestran un comportamiento microbiológico análogo al proceso de envasado al vacío de las muestras realizadas en la prueba F. Es decir, no existe ventaja en la utilización de un envasado al vacío y un envasado en MAP para la conservación microbiológico de pasta cocida con salsa de tomate conservada en refrigeración. Esto se debe a que partimos de un producto que ha sido cocinado y en este proceso se ha reducido el nivel de contaminación inicial del alimento en el momento de su envasado, que se realiza en caliente. Como ocurre en la **PRUEBA F**, solo las muestras en las que la pasta se coció con 4 g/L de extracto de ajo mantienen unos niveles de aerobios mesófilos aceptables a los 30 días de fabricación y almacenados en refrigeración.

Hay diferencias entre los distintos tipos de pasta, en relación al crecimiento de microorganismos mesófilos, las muestras de pasta cocidas con ajo son significativamente distintas a las otras dos. Con respecto al crecimiento de microorganismos no existen diferencias significativas en las muestras de pasta cocidas con agua y con extracto de alcachofa durante el tiempo de almacenamiento.



**Tabla 45.** Estudio de los parámetros microbiológicos de la prueba G

MUESTRA	ANÁLISIS	DÍAS DE ALMACENAMIENTO				Sig
		1	7	15	30	
<i>PbMAP</i>	A.mesófilos, (ufc/g)	0,01x10 <sup>3</sup> ±2,53	0,01x10 <sup>3</sup> ±1,78	10 <sup>3</sup> ±2,53	>3,0x10 <sup>5</sup>	*
	E.coli, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	Rto.Listeria, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	L. monocytogenes, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	Salmonellaspp, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<hr/>					
<i>PafMAP</i>	A.mesófilos, (ufc/g)	0,01x10 <sup>3</sup> ±2,49	0,04x10 <sup>3</sup> ±1,78	2,0x10 <sup>3</sup> ±3,78	>3,0x10 <sup>5</sup>	*
	E.coli, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	Rto.Listeria, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	L. monocytogenes, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	Salmonellaspp, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<hr/>					
<i>PajMAP</i>	A.mesófilos, (ufc/g)	0,01x10 <sup>3</sup> ±2,27	0,01x10 <sup>3</sup> ±1,56	1,0x10 <sup>3</sup> ±4,63	2,0x10 <sup>3</sup> ±1,65	*
	E.coli, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	Rto.Listeria, (ufc/g)	<1	<1	<1	<1	NS
	L. monocytogenes, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	Salmonellaspp, (Ausencia/25g)	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NS
	<b>Significación</b>		NS	NS	NS	*

NS: No significativas; \*Diferencias significativas  $P < 0,05$

En los análisis realizados para *E.coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*, se encontró el mismo resultado, ausencia para los tres patógenos, este resultado se debe a que las muestras fueron tratadas de acuerdo a las guías de buenas prácticas de fabricación de platos preparados publicada por la Consejería de Sanidad de la Región de Murcia en 2010.

Para ver el efecto del envasado en atmósfera protectora de la pasta con salsa de tomate en el aumento de su vida útil, se controla la evolución de los parámetros pH e índice de peróxidos (**Tabla 46**), siguiendo la misma metodología utilizada en la **PRUEBA F**.

**Tabla 46.** Evolución de los parámetros físico-químicos de la prueba G

MUESTRA	ANÁLISIS	DÍAS DE ALMACENAMIENTO				Sig
		1	7	15	30	
<i>PbMAP</i>	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	8,5±0,2	10,3±0,1	15,9±0,3	19,5±0,3	*
	pH	5,16±0,01	5,38±0,02	5,57±0,02	5,48±0,01	NS
<i>P4ajMAP</i>	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	8,8±0,1	11,7±0,2	14,7±0,2	16,8±0,1	*
	pH	5,37±0,01	5,32±0,01	5,37±0,03	5,39±0,02	NS
<i>P5afMAP</i>	I.Peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	9,2±0,1	9,3±0,2	9,5±0,2	10,5±0,4	NS
	pH	5,60±0,02	5,47±0,01	5,47±0,02	5,40±0,02	NS
<b>Significancia</b>	<b>I.Peróxidos</b>	NS	NS	*	*	
	<b>pH</b>	NS	NS	NS	NS	

NS: No significativo; \* Diferencias significativas  $P < 0,05$

Con respecto a la evolución de los valores del índice de peróxidos, se observa que en todas las muestras hay un aumento en el valor de oxidación a partir de los 15 días de almacenamiento en refrigeración de manera significativa. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en la evolución del índice de peróxidos en las muestras de pasta cocida con extracto de alcachofa.

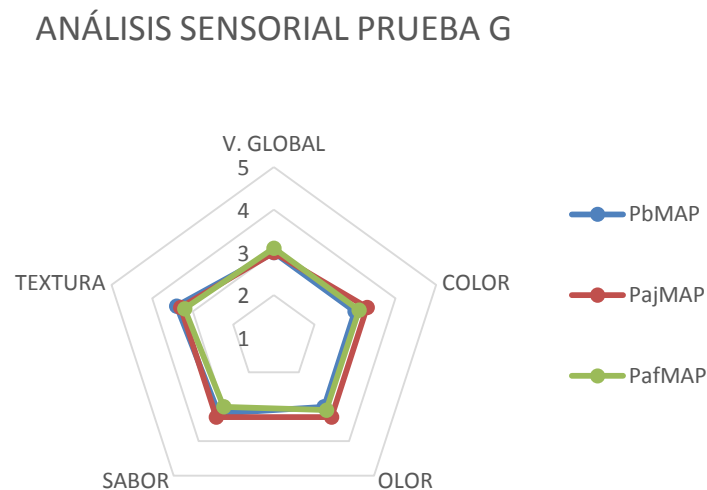
Se sigue evidenciando la capacidad antioxidante del extracto de alcachofa en cantidades de 5 g/L en el agua de cocción de la pasta, comparando los valores en el índice de peróxidos obtenidos para esta muestra (PafMAP), frente al blanco (PbMAP) y las muestras en las que se utilizaron el extracto de ajo (PajMAP).

Se realizó una prueba de aceptación para conocer la opinión de los consumidores sobre las muestras elaboradas en la prueba G a los 15 días de almacenamiento, siguiendo la metodología y en las mismas condiciones que la realizada en la prueba F. El panel que realizó la prueba se compuso de 60 catadores para minimizar en lo posible la

variabilidad asociada a este tipo de pruebas hedónicas no descriptivas. Cada persona que participó en la cata recibió un cuestionario previamente diseñado.

En él se pedía evaluar los parámetros color, olor, sabor, textura y valorar globalmente el producto utilizando una escala hedónica de intervalo cinco puntos en la que el valor 3 es el límite de aceptación.

En la **Figura 21** se muestran las puntuaciones de las muestras obtenidas para cada parámetro sometido a estudio.



**Figura 21.** Resultados del análisis sensorial de las muestras de pasta con salsa de tomate envasadas en atmósfera protectora de la prueba G

A los 15 días de almacenamiento todos los valores obtenidos en las muestras elaboradas en la **PRUEBA G**, (PbMAP, PajMAP y PafMAP), se encuentran cercanos al valor de aceptabilidad 3, incluso por debajo en el parámetro valoración global de la pasta con extracto de ajo añadido en el agua de cocción, PajMAP, que obtiene una puntuación de 2,8, por debajo del límite de aceptación. Tras aplicar el test de ANOVA no se observan diferencias significativas.

De acuerdo a la guía para la realización de estudios de vida útil publicada por la Comisión Europea (2008), se realiza un control sensorial durante el estudio de vida útil para determinar la aceptabilidad organoléptica del producto. Este análisis se realizó para todas las muestras durante los días 1,7, 15 y 30 días de almacenamiento, para la pasta aditivada con extracto de ajo PajVAC.

Hasta el día 15 en todas las muestras se obtuvo en los parámetros valorados, color, olor, sabor y textura, una puntuación “TÍPICO”, a partir de esta fecha se observan en todas las muestras en los parámetros color, sabor y textura el valor “ATÍPICO”. Con respecto a las muestras sin adición de extractos y las aditivadas con extractos de alcachofa, la pasta presentaba valoraciones ATÍPICAS, en todos los parámetros evaluados a los 15 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración, el día 30 no se analizan porque los valores de ufc/g de aerobios mesófilos, se encontraban por encima del límite permitido para su consumo.

Los resultados del análisis nutricional muestran que la adición de extractos de alcachofa y ajo al agua de cocción de la pasta, solo afecta nutricionalmente a la aparición del polifenolcinarina en las muestras de pasta en las que se utilizó extracto de alcachofa en el agua de cocción. No hay diferencias significativas en los valores nutricionales de las tres muestras de pasta. Los resultados se muestran en la **Tabla 47**.

Los resultados del análisis nutricional muestran que la adición de los extractos de alcachofa en la concentración de 5 g/L y de ajo 4 g/L, en el agua de cocción de la pasta no afecta a su composición nutricional. Así mismo los valores obtenidos coinciden con marcas comerciales de pasta con tomate refrigerada de la mayoría de las marcas blancas consultadas que se encuentran en el mercado (Carrefour y Hacendado).

**Tabla 47.** Resultados del análisis nutricional de la prueba F de pasta

DETERMINACIÓN	PbMAP	PafMAP	PajMAP	Sig.
<i>Cinarina mg/Kg</i>	-	19,5±0,7	-	-
<i>Cenizas Totales g/100g</i>	1,2±0,4	1,3±0,1	1,1±0,1	NS
<i>Grasa g/100g</i>	1,8±0,2	1,9±0,1	1,9±0,1	NS
<i>Hidratos de Carbono g/100g</i>	25,4±0,9	24,7±2,5	25,8±3,7	NS
<i>Proteínas g/100g</i>	4,7±0,3	4,2±0,2	4,3±0,5	NS
<i>Sal g/100g</i>	1,8±0,3	1,6±0,1	1,6±0,1	NS
<i>Valor energético KJ/100g</i>	578	561	580	NS
<i>Valor energético Kcal/100g</i>	136	133	137	NS

NS: No significativo

Comparando los resultados de vida útil obtenidos para la pasta con salsa de tomate elaborados en la **PRUEBA F** y **G** se puede concluir que desde el punto de vista microbiológico, el envasado en atmósfera protectora no presenta mejora frente al envasado al vacío. Sin embargo desde el punto de vista sensorial el envasado al vacío preserva mejor las características sensoriales del alimento.

Estos resultados concuerdan con los publicados por Carini y col., (2013), donde publican que los platos de pasta *ready to eat* tras dos semanas de almacenamiento en refrigeración, envasados en atmósfera protectora empiezan a sufrir deterioro organoléptico y es más acusado a los 21 días (sobre todo en el parámetro de Textura por pérdida de humedad). Miceli y col., (2014), publican que la adición de extracto de *Borago officinalis* (antimicrobiano) sobre platos a base de pasta fresca (tagliatelle) almacenada en refrigeración aumenta la vida útil de estos platos respecto a platos tradicionales pero que existen diferencias organolépticas, sobre todo en el parámetro color, aunque son apreciadas positivamente por el consumidor, lo que corrobora los resultados sensoriales obtenidos en este trabajo.



## ***CAPÍTULO V. CONCLUSIONES***





**Primera.-** Se ha desarrollado una metodología a partir de los subproductos originados en la fabricación industrial de productos a base alcachofa y ajo para su transformación, mediante tratamientos tecnológicos sostenibles con el medio ambiente, sin la utilización de disolventes orgánicos (extracción, concentración,..), para obtener extractos naturales con efectos beneficiosos. Se han utilizado técnicas económicas asociadas a tecnologías ya implantadas en las empresas del sector que facilitan la aplicación de este proceso.

**Segunda.-** La obtención de extractos en polvo obtenidos, presentan una baja humedad, lo que permiten conservarlos a temperatura ambiente y hacerlos disponibles para su utilización en cualquier época y lugar, especialmente si se envasan a vacío, aunque habría que llevar a cabo un estudio de vida útil del propio extracto para determinar la estabilidad de su capacidad antioxidante o antimicrobiana.

**Tercera.-** El extracto de alcachofa obtenido a partir de subproductos del procesado industrial en la elaboración de conservas vegetales posee elevadas concentraciones de cinarina y capacidad antioxidante. Así mismo constituye un ingrediente natural que puede ser utilizado adecuadamente en la preparación de alimentos a base de vegetales y en platos preparados de pasta.

**Cuarta.-** El extracto de ajo obtenido a partir de subproductos de su procesado industrial posee capacidad antimicrobiana y constituye un ingrediente natural que puede ser utilizado adecuadamente en la preparación de alimentos a base de vegetales y pasta cocida refrigerada.

**Quinta.**-La capacidad o efecto de cada extracto depende en gran medida del tipo, variedad, modo del tratamiento y conservación del subproducto del que proceda, ya que cuanto más tiempo transcurra desde su producción a la recogida para su procesamiento y según las condiciones de almacenamiento (humedad, temperatura, higiene,..) puede verse afectada su capacidad antimicrobiana/antioxidante.

**Sexta.**-Los extractos obtenidos aportan una ligera coloración, sobre todo el extracto de alcachofa, y sabor a los alimentos, por lo que su utilización ha de ser en productos en los que no modifiquen estas características o presenten estos ingredientes en su composición, para una mayor aceptación.

**Séptima.**- Se ha demostrado que los compuestos presentes en el extracto de alcachofa y del ajo obtenidos, en las concentraciones finales utilizadas, han sido capaces de incrementar la vida útil de productos alimentarios sin afectar negativamente a la aceptabilidad sensorial de los mismos. El empleo de envasado en atmósferas modificadas junto con los extractos, supone un incremento adicional en el caso del gazpacho.

Como comentario general, recopilatorio del trabajo de investigación llevado a cabo en esta tesis, se puede asegurar que existe un alto potencial de valorización en los subproductos generados por las empresas de transformados vegetales de ajo y alcachofa, ya que de un material cuyo destino es la alimentación animal o eliminación con coste para la empresa que debe gestionarlo como residuo. Actualmente se pueden llegar a obtener nuevos productos considerados como aditivos o ingredientes que aporten un beneficio para las empresas agroalimentarias. Así mismo, se deduce que los extractos

obtenidos de subproductos de la industria de alcachofa, tallos y hojas, y del ajo, pieles y descartes, constituye un ingrediente natural y de gran interés funcional para la elaboración de productos refrigerados sin aditivos (Clean label), aumentando su vida útil respecto a productos que no llevan conservantes.



***CAPÍTULO VI. RESUMEN/SUMMARY***



**RESUMEN**

El sector de los transformados vegetales agrupa las actividades relacionadas con la conserva, congelados, zumos, concentrados y néctares de frutas y hortalizas. Es un sector muy dinámico de la industria alimentaria que representa aproximadamente el 7% de la producción total. La actividad de esta industria genera cantidades importantes de residuos y subproductos orgánicos, que oscila entre un 13% y un 65%, de la materia prima que utilizan. El marco normativo desarrollado en Europa y en España establece como prioridad el reciclado y la valorización de los residuos frente a su eliminación.

Por otro lado, las tendencias de los consumidores hacía alimentos libres de aditivos, ha provocado el aumento del sector de ingredientes naturales, aumentando en los últimos años la utilización de extractos naturales con propiedades tecnológicas (conservantes, antioxidantes) y funcionales (ricos en fibra, vitaminas).

Dentro de este marco legislativo y tendencias de consumo, se basa la investigación realizada en esta tesis en la que se han desarrollado y validado tecnologías de extracción, sin la utilización de disolventes orgánicos, de compuestos de interés a partir de los subproductos generados en la industria de la alcachofa y el ajo para su revalorización como ingredientes con capacidad antimicrobiana y antioxidante.

Se han obtenido extractos de alcachofa y ajo en los que se analizó su composición para asegurar su salubridad para su utilización como ingredientes alimentarios. Así mismo, se han caracterizado las propiedades antimicrobianas del extracto de ajo obtenido y las

propiedades antioxidantes del extracto de alcachofa mediante la utilización de técnicas in vitro e in vivo.

La validación del uso de los extractos obtenidos se ha realizado utilizando el extracto de ajo y el extracto de alcachofa como ingredientes en la elaboración de dos platos refrigerados, gazpacho y pasta refrigerada, utilizando distintas concentraciones de extractos y sistemas de envasado. El aumento de la vida útil de estos dos alimentos debido a la utilización de los extractos obtenidos valida su utilización como ingredientes naturales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

**Palabras clave:** Revalorización, subproductos, vida útil, extractos naturales, ajo, alcachofa, gazpacho, pasta refrigerada, antimicrobianos, antioxidantes.

## **SUMMARY**

The vegetable manufactured sector involves activities related to canned, frozen, juice concentrates and nectars of fruits and vegetables. It is a very dynamic sector of the food industry and represents about 7% of total production. The activity of this industry generates significant amounts of waste and by-products, between 13% and 65% of the raw material used. The regulatory framework developed in Europe and Spain prioritizes recycling and waste recovery instead of elimination.

Furthermore, the trends of consumers towards Clean Label foods, has led to an increase in the natural ingredients sector. The use of natural extracts with technological



properties (preservatives, antioxidants, ...) and functional properties (rich in fiber, vitamins, ...) has grown in recent years.

Organic solvent free extraction technologies have been developed and validated in this thesis in accordance with the legislative framework and consumers trends in order to obtain functional compounds of byproducts generated in the artichoke and garlic industry for their reuse as food ingredients with antimicrobial and antioxidant capacity.

Artichoke and garlic extracts were obtained from byproducts. The composition was analyzed to ensure their safety use as food ingredients. In addition, the antimicrobial properties of the garlic extracts and antioxidant properties of the artichoke extracts obtained have been characterized using *in vitro* and *in vivo* assays.

The shelf life of gazpacho and chilled pasta, was compared using garlic and artichoke extracts as ingredients, at different concentrations and package conditions, in order to validate the functional their functional properties. Increasing the shelf life of these two enriched products due to the use of extracts, validates their use as antioxidants and natural ingredients with antimicrobial properties.

**Key words:** Revalorization, byproducts, shelf life, natural extracts, artichoke, garlic, antimicrobial, antioxidant.



## ***CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA***



## A

- Abu-Reidah, I.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Extensive characterization of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Chem.* Num 141, pp 2269–2277.
- Adzet, T.; Camarasa, J.; Laguna, J.C. (1987). Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl<sub>4</sub> toxicity in isolated rat hepatocytes. *J. Nat. Prod.* Num 50, pp 612–617.
- Ahmad, M.S.; Pischetsrieder, M.; Ahmed, N. (2007). Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation products. *European Journal of Pharmacology.* Num 561, pp 32-38.
- Alamanni ,M. C.; Cossu M. (2003) .Antioxidant activity of the extracts of the edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) var. spinoso sardo., vol. 15, no2, pp. 187-195.
- Almeida da Trindade, R.; Mancini-Filho, J.; Casañas Haasis Villavicencio, A.N. (2009). Effects of natural antioxidants on the lipid profile of electron beam-irradiated beef burgers. *European Journal of Lipid Science and Technology.* Volume 111, Issue 11, pp 1161-1168.
- Amani, T.; Arráez-Román, D.; Barrajon-Cataláne, E.; Ruiz-Torrese, V.; Pérez-Sánchez, A.; Herrero, M.; Ibañez, E.; Micole, V.; Zarrouka, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology.* Volume 50, Issue 6, pp 1817–1825.

- Amzad-Hossain, M.; Mizanur-Rahman, S.M. (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*. Volume 44, Issue 3, April. Pp. 672-676.
- Arai, T.; Tanaka, Y.; Urabe, S.; Kusaba, A.; Tazaki, H.; Ozawa, T.; Kimura, N.; Jung, K.K.; Waragaya, K.; Yuyama, T.; Haseba, Y.; Imai, S. 2006. Changes in peripheral leukocytes enzymes activity and plasma, metabolite concentrations in growing Holstein Calves. *Res. Vet. Sci.* Num 81, pp 19-23.
- Artemio Z. Tulio, Joseph E. Jablonski, Lauren S. Jackson, Claire Chang, Indika Edirisinghe, Britt Burton-Freeman. (2015). Phenolic composition, antioxidant properties, and endothelial cell function of red and white cranberry fruits'. *Food Chemistry*, Volume 166, 1 January., Página 514.
- Asociación Española de Elaboradores de Platos Refrigerados. (2015). [www.platosrefrigerados.com](http://www.platosrefrigerados.com).
- Aubert, S.; Foury, C. (1981). Couleur et pigmentation antohicyanique de l'artichaut (*Cynara scolymus*.L.). En *Studi sul Carciofo*, V. Marzi & V. Lattanzio (Eds. Mundi-Prensa.
- Augusti, K.T. (1990). Therapeutic and medicinal values of onions and garlic. In: H. D. Rabinowitch y J. L. Brewster (eds.). Vol. III. *Onions and Allied Crops*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 94-108.
- Ayse, K.; Ozcelik, B.; Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. Volume 2, Issue 1, pp 41-60.
- Ayuso, L.M.; Gómez, A.; Morales, A.B. (2014). Subproductos del sector agroalimentario. Fuente de compuestos bioactivos para la salud. Edita Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación.

Azhar, K.F.; Nisa, K. (2006). Lipids and their oxidation in seafood. *J.Chem.Soc. of Pakistan*. Num 28, pp 298-305.

Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant material: a review” *J. Food Eng.* Num 117, pp 426–436.

## **B**

Bañón, M., Blesa Pedreño, Masilla B. (2010). Guía de buenas prácticas higiénico-sanitarias en restauración colectiva. Consejería de Sanidad y Política Social. Dirección General de Salud ISBN: 84-8768687-7

Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. (1998). High intensity pulsed electric fields: processing equipment and design. *Nonthermal Preservation of Foods* Marcel Dekker, Inc. pp 53–112.

Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. (1998). Oscillating magnetic fields for food processing. *Nonthermal Preservation of Foods* Marcel Dekker, Inc. pp. 113–138.

Barnejee R., Werma A.K., Das A.K., Rajkumar V., Shewalkar A.A. y Narkhede H.P. (2012). Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat nuggets. *Meat Science*, 91: 179-184.

Bauer, AW.; Kirby, WM.; Sherris, J.C.; Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Apr*;45 (4):493-6.

Bello, J. (1998). *Ciencia y Tecnología Culinaria*. Madrid. Ed. Díaz de Santos.

Benítez García, V. (2011). Caracterización de subproductos de cebolla como fuente de fibra alimentaria y otros compuestos bioactivos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Química Agrícola.

- Bente L. Halvorsen, Rune Blomhoff. (2011). Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods. *Food Chemistry*. Volumen 127. Pp 761-768.
- Bernaert, N., De Paepe, D., Bouten, C., De Clercq, H., Stewart, D., Van Bockstaele, E., & Van Droogenbroeck, B. (2012). Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*). *Food chemistry*, 134(2), 669-677.
- Bianco, V.V. (2005). Present situation and future potential of artichoke in the Mediterranean basin. *Acta Horticulturae*. Num 681, Pp 39–55.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Bobillo, E.; Plaza, P.; Rodi , J. U.; Costa, E. (2006). La desinfecci n de envases y c maras de conservaci n. *Horticultura: Revista de industria, distribuci n y socioeconom a hort cola: frutas, hortalizas, flores, plantas,  rboles ornamentales y viveros*. Volumen 193. Pp 58-59.
- Boyd, L. C. (1997). Influence of processing on the flavor of seafoods. In: *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods* (F. Shahidi and K. R. Cadwallader, eds). ACS Symposium Series 674, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 9-19.
- Braddock R.J. (1995). By-products of citrus fruits. *Food Technology*, Volumen 49. Pp 74-77.
- Brody, A. L. (1989). Microbiological safety of modified/controlled atmosphere packaging of foods. In: *Controlled/Modified Atmosphere Vacuum Packaging of Foods* (A. L. Brody, ed.). Food & Nutrition Press, Inc, Trumbull, CT. pp. 159-174.



## C

- Cabeza, M.C.; Cambero, I.; Hoz, L.; Ordóñez, J. A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham ”Innovative Food Science and Emerging Technologies. Num 8, pp. 299–305.
- Calvarano, M.; Postorino, E.; Gionfriddo, F.; Calvarano, I.; Bovalò, F. (1996). “Naringin extraction from exhausted bergamot peels” *Perfur. Flavor*. Num 21, pp 1–4.
- Carini E.; Curti E.; Littardi P.; Luzzini M.; Vittadini E. January (2013). Water dynamics of ready to eat shelf stable pasta meals during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 17, pp. 163–168.
- Carini. E.; Curti, E.; Cassotta, F.; Najm, N.E.O.; y Vittadini, E. (2014). Physico-chemical properties of ready to eat, shelf-stable pasta during storage. *Food Chemistry*. Volumen 144. Pp74-79.
- Casad, E. Agosto (2014). *Gazpacho y cremas refrigeradas: la categoría se pasa al rojo*. Alimarket.
- Cassano, A.; Conidi, C.; Figueroa, R.; Muñoz, R.C. (2015). A Two-Step Nanofiltration Process for the Production of Phenolic-Rich Fractions from Artichoke Aqueous Extracts. *International journal. Molecular Science* 2015, 16(4), pp 8968-8987.
- Ceccarelli, N.; Curadi, M.; Picciarelli, P.; Martelloni, L.; Sbrana, C.; Giovannetti, M. (2010). Globe artichoke as functional food. *Mediterr. J. Nutri. Metabol.* Num 3, pp 197–201.
- Chen, J.; Xu, H.; Mi, L.F.; Bao, R. (2011). Study on the enzymatic assisted extraction, isolation, purification and antioxidant activity of flavonoids in onion skin. *Food Science*. Num 32, pp 37-41.

- Chiquirrín, M. Dossier platos preparados. Tecnifood Junio (2015). Pp. 71-73.
- Christaki, E.; Bonos, E.; Florou-Paneri, P. (2012). Nutritional and functional properties of *Cynara* crops (globe artichoke and cardoon) and their potential applications: a review. *Int. J. Appl. Sci. Technol.* Num 2, pp 64–70.
- Clifford, M. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* Num 80, pp 1033–1043.
- Clifford, M.; Walkerm R. (1987). Chlorogenic acids-confounders of coffee-serum cholesterol relationships. *Food Chem.* Num 24, pp 77–80.
- Código Alimentario Español (CAE). (2007). Legislación alimentaria. Código alimentario español y disposiciones complementarias. 7ª Edición. Edi. Tecnos. ISBN84-309-4314-5.
- Commission of the European Communities. (2008). *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to -eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.
- Costa, A. I. A.; Dekker, M.; Beumer, R. R.; Rombouts, F. M.; Jongen, W. M. F. (2001). A consumer-oriented classification system for home meal replacements. *Food Quality and Preference*, Volume 12(4), pp 229-242.
- Costa, A. I. A.; Schoolmeester, D.; Dekker, M.; Jongen, W. M. F. (2007). To cook or not to cook: A means-end study of motives for choice of meal solutions. *Food Quality and Preference.* Num 18, pp 77–88.
- Costa, F. O.; Carvalho, G. R. (2007). The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Life Sciences Society and Policy*, Volume 3(2), p 29.

Cruz-Carrillo, A.; Rodríguez, N. y Rodríguez, C. E. (2010). In vitro evaluation of the antibacterial effect of *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* and *Silybum marianum*. UDCA Actualidad & Divulgación Científica. Volumen 13. Pp 117-124.

## D

Dabbou,S.; Gasco,L.; Gai,F.; Zoccarato,I.; Rotolo,L. ; Brugiapaglia,A.; Helal,A.N.; and Peiretti,P.G. (2014). Dried artichoke bracts in rabbits nutrition: effects on the carcass characteristics, meat quality and fatty-acid composition. *Animal*. Pp 1547 – 1553.

Datamonitor. (1998). Ready meals: in-the-home convenience (Market Report). Datamonitor: London.

Del Torre, M.; Stecchini, M.; Braconnier, M.; Peck, M. (2004). Prevalence of *Clostridium* species and behaviour of *Clostridium botulinum* in gnocchi, a REPFED of Italian origin. *International Journal of Food Microbiology*. Num 96, pp 115–131.

Dillon, S.A.; Burmi, R.S.; Lowe, G.M.; Billington, G.; Rahman, K. (2003). Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sciences*. Num 72, pp 1583-1594.

Dobarganes, C.; Marquez-Ruiz, G. (2003). Oxidized fats in foods. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. Num 6, pp 157-163.

DOMCA. (2014). Tecnología y productos para la industria alimentaria. [www.domca.com](http://www.domca.com).

Dorsch, W. (1996). *Allium cepa* L. (onion): Part 2. Chemistry, analysis and pharmacology. *Phytomedicine*. Num 3, pp 391-397.

Downing,D. (1996). A Complete Course in Canning and Related Processes, 13th Edition .Processing Procedures for Canned Food Products. Jun.

Driss,D. Chaari,F.; Belghith,L.; Bouaziz,F.;Ghorbel,R.; Chaabouni,S.E.; Kallel, F. (2014). Garlic (*Allium sativum*L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and Products* 62. Pp 34–41.

Dueñas J., Naranjo B. y Araujo P. (2009). Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos del procesamiento de alcachofas, Tesis de grado, Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador.

## E

Eisenbach, W.; Götsch, P.J.; Niemann, K.; Zosel, K. (1983). Extraction with supercritical gases: The first twenty years. *Fluid Phase Equilibria*. Volume 10, pp 315-318.

Elez-Martinez, P. y Martín-Belloso, P. (2007). Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*. Volumen 102. Pp 201–209.

Environmental Protection Agency. (2013). [www.epa.gov](http://www.epa.gov).

Esselen, W. B.; Pflug, I. J. (1956). Thermal resistance of putrefactive anaerobe No-3679 spores in vegetables in the temperature range of 250-degrees-F-290-degrees-F. *Food Technology*. Volume 10, pp 557-560.

## F

FAO. (2007). FAO Statistical Database. Food and Agriculture Organization. [www.fao.org](http://www.fao.org).

- FDA. ( 2015). Food and drug administration. [www.fda.gov](http://www.fda.gov).
- Fellows, P. (1994). Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y prácticas. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.
- Fernández-López J., Fernández-Ginés J.M., Aleson-Carbonell L., Sendra E., Sayas-Barberá E. y Pérez-Alvarez J.A. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3-4): 176-185.
- Fernández-López J., Sendra E., Sayas-Barberá E., Navarro C. y Pérez-Alvarez J.A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of "salchichón" (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 80(2): 410-417.
- Fierheller, M. G. (1991). Modified atmosphere packaging of miscellaneous products. In: *Modijied Atmosphere Packaging of Food* (B. Ooraikul and M. E. Stiles, eds). Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK. pp. 246-257.
- Fратиани, F.; Tucci, M.; De Palma, M.; Pepe, R.; Nazzaro, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry*. Num 104, pp 1282–1286.
- Fратиани, F.; Tucci, M.; De Palma, M.; Pepe, R.; Nazzaro, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry*, Volume 104, Issue 3, pp 1282–1286.

## G

- García de Fernando, G.; Gañán, M.; Rodríguez, M.R.; Aguirre, J. (2011). Envasado de alimentos en atmósferas modificadas. Equipack. Dic. Pp 44-49.
- García Iglesias, E.; Gago Cabezas L.; Fernández Nuevo, J.L. (2006). Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. CEIM, Dirección General de Universidades e Investigación.
- García, R. y Herrera, F. (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* estudio preliminar in vitro. Volumen 5. Pp 68-79.
- García-Linares, M.C.; González-Fandos, E.; García-Fernández, M.C.; García-Arias, M.T. (2004). Microbiological and nutritional quality of sous vide or traditionally processed fish: Influence fat content. J. of Food Qual. Num 27, pp 371-387.
- Gavilán, A. (2010). Tecnifood. GB Consultig. Ingredientes funcionales. Tecnifood. Marzo/Abril. Pp 56-65.
- Gawlik-Dziki, U.; Swieca, M.; Dariusz Dziki, D.; Baraniak, B.; Justyna Tomiło, J; Czýz, J. (2013). Quality and antioxidant properties of breads enriched with dry onion (*Allium cepa* L.) skin. Food Chemistry. Num 138, pp 1621-1628.
- Gebhardt, R. (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. Toxicology and Applied Pharmacology. Num 144, pp 279–286.
- Gebhardt, R. (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. Num 144, pp 279–286.

- Geeroms, N.; Verbeke, W.; Van Kenhove, P. (2008). Health advertising to promote fruit and vegetable intake: Application of health-related motive segmentation. *Food Quality and Preference*. Num 19, pp 481–497.
- Gennaro, L.; Leonardi, C.; Esposito, F.; Salucci, M.; Maiani, G.; Quaglia, G; Fogliano, V. (2002). Flavonoid and Carbohydrate Contents in Tropea Red Onions: Effects of Homelike Peeling and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Num 50, pp 1904-1910.
- Ghawi, S.K; Rowland, I. y Methven, L. Enhancing consumer liking of low salt tomato soup over repeated exposure by herb and spice seasonings. (2014). *Appetite*. volumen 81. Pp 20-29.
- Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B. y Kader A.A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids and vitamin c contents of nectarine, peach and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17): 4976-4982.
- Gofton, L. (1995). Convenience and the moral status of consumer practices. In. G. W. Marshall, *Food choice and the consumer*. Cambridge: Chapman & Hall. pp. 153-181.
- Gombas, D.; Chen, Y.; Clavero, R.; Scott, V. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection*. Num 66, pp 559–569.
- Gómez-López, V.M.; Ragaert, P.; Debevere, J.; Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: A review *Trends in Food Science & Technology*. Num 18, pp 464–473.
- Gooding, C.M. (1945). Process of inhibiting growth of molds. U.S. patent 2,379,294.

- Gouveia, S.C y. Castilho, P.(2012). Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke based dietary supplements. Food Research International. Volumen 48. Pp 712-714.
- Greco, M.F. (2011). Estudio de procesos de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio bioactivo. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Cuyo.
- Greengras, J. (1996). Envasado de alimentos en atmósfera modificada. Ediciones, Madrid, España. pp 79-118.
- Guardia, R. y Seber, H. (2014). El ajo y sus efectos antimicrobianos. In crescendo. Volumen 1. Pp415-419.
- Gyawali, R.; Ibrahim, S.A. (2014). Review Natural products as antimicrobial agents. Food Control. Num 46. pp 412-429.

## H

- Hamburger, M.; Baumann, D.; Adler, S. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. Phytochemical Analysis. Num 15, pp 46-54.
- Herrera, M. C.; De Castro, M. L. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. Journal of Chromatography A, Volume 1100(1), pp 1-7.
- Horwitz, W. (1981). Analytical methods for sulfonamides in foods and feeds. I. Review of methodology. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, pp.104–130.



## I

Ilbaeck, N-G.; Friman, G. (2007). Interactions Among Infections, Nutrients and Xenobiotics. *Food Sci.and Nutr.* Num 47, pp 499-519.

Industrie Grafiche Laterza. (2015). El origen de la cebolla. pp 57-76. Infoagro.

IRI Consulting. (2015). Newsletters Febrero. [www.iriworldwide.es](http://www.iriworldwide.es)

## J

Jofré, M.; Garriga, T. (2008). Aymerich. “Inhibition of *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration” *Meat Science.* Num 78, pp. 53–59.

Joseph E. Jablonski, Lauren S. Jackson, Claire Chang, Indika Edirisinghe, Britt Burton-Freeman. (2015). Phenolic composition, antioxidant properties, and endothelial cell function of red and white cranberry fruits. *Food Chemistry*, Volume 176, 1 June. Pp 504.

## K

Kader, A.A.; Ben-Yehoshua, S. (2000). Effects of superatmospheric oxygen levels on postharvest physiology and quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* Num 20, pp 1–13.

Kähkönen, M.; Anu, I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.P.; Piha-laja, K.; Kujala, T.S. Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant ex-tracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, pp 3954 – 3962.

Kang, C.S. (2006). Method of changing physical properties of various foodstuffs by using chlorella cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3449–3453.

- Kang, S.; Kim, Y.; Hyun, K.; Kim, Y.; Seo, J.; Park, Y. (1998). Development of separating techniques on quercetin-related substances in onion (*Allium cepa* L.). 2 Optimal extracting condition of quercetin-related substances in onion. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. Num 27, pp 687–692.
- Karbowiak, T.; Debeaufort, F.; Voilley, A. (2007). Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloids*. Num 21, pp 879-888.
- Kendler, B.S. (1987). Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): A review of their relationship to cardiovascular disease. *Preventive Medicine*. Num 16, pp 670-685.
- Kim, W.; Lee, B.C.; Lee, J.H.; Nam, S.C. (2008). Effect of electron-beam irradiation on the antioxidant activity of extracts from *Citrus unshiu* pomaces. *Radiat. Phys. Chem*. Num 77, pp 87–91.
- King, J.W. (2000). Advances in critical fluid technology for food processing. *Food Science and Technology Today*. Num 14, pp 186–191.
- Knorr, D.; Zenker, M.; Heinz, V.; Lee, D.U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing *Trends Food Sci. Technol*. Num 15, pp 261–266.
- Ko, M.J.; Cheigh, C.I.; Cho, S.W.; Chung, M.S. (2011). Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *Journal of Food Engineering*. Num 102, pp 327-333.
- Kucukgergin, C.; Aydin, A.F.; Ozdemirler, G.O.; Mehmetcik, G.; Kocar-Toker, N.; Uysal, M. (2010). Effect of artichoke leaf extract on hepatic and cardiac oxidative stress in rats fed on high cholesterol diet. *Biol. Trace. Elem. Res*. Num 135, pp 264–274.

Kuskoski, A.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J.; F., Roseane. (2005).

Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 25, pp 726-732.

## L

Lakshmanan, R.; Dalgaard, P. (2004). Effect of high-pressure processing on *Listeria monocytogenes*, spoilage microflora and multiple compound quality indices in chilled cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* Num 96, pp 398–408.

Larrosa M., Llorach R., Espín J.C. y Tomás-Barberán F.A. (2002). Increase of antioxidant activity of tomato juice upon functionalisation with vegetable byproduct extracts. *LWT- Food Science and Technology*, 35(6): pp 532-542.

Larrosa, M.; Llorach, R.; Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. (2002). Increase of Antioxidant Activity of Tomato Juice Upon Functionalisation with Vegetable Byproduct Extracts. Volume 35, Issue 6. *LWT - Food Science and Technology*. September. Pp 532–542.

Larrosa,M.; Llorach R.; Espín;J.C.; Tomás-Barberán, F.A. (2002) .Increase of Antioxidant Activity of Tomato Juice Upon Functionalisation with Vegetable Byproduct Extracts. *Food Science and Technology*.Volume 35, Issue 6, September 2002, pp 532–542.

Lattanzio, V.; Kroon, P. A.; Linsalata, V.; Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, Volume 1(2), pp 131-144.

Lattanzio, V.; Kroon, P.A.; Linsalata, V.; Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Func. Foods*. Num 1, pp 131–144.

- Lattanzio, V.; Kroon, P.A.; Linsalata, V.; Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J. Func. Foods*. Num 1, pp 131–144.
- Lattanzio, V.; Van Sumere, C.F. (1987). Changes in phenolic compounds during the development and cold storage of artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*. 24, pp 37-50.
- Lattanzio, V.K.; Cardinali, A.; Di Venere, J.; Linsalata, V.; Palmieri, S. (1994). Browning phenomena in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads: Enzymatic or chemical reactions. *Food Chemistry*. 50, pp 1-7.
- Lattanzio, V.K.; Linsalata, V.; Palmieri, S.; Van Sumere, C.F. (1989). The beneficial effect of citric and ascorbic acid on the phenolic browning reaction in stored artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*. 33, pp 93-106.
- Lattanzio, V.; Kroon, P.A.; Linsalata, V.; Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, Volume 1, Issue 2, pp 131–144.
- Lawrence R. y Lawrence K. (2011). Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium Sativum*) grown in north Indian plains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, pp 1-3.
- Lawson, L.D.; Hughes, B.G. (1992). Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Medica*. Num 58, pp 345–350.
- Li, B.B.; Smith, B.; Hossain, Md.M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separat. Purificat. Technol.* Num 48, pp 182–188.
- Lipinski, B. et al. (2013). Reducing Food Loss and Waste. Working Paper, Installment 2 of Creating a Sustainable Food Future. Washington, DC: World Resources Institute.

- Liu H.G. y Xu L.H. (2007). Garlic oil prevents tributyltin-induced oxidative damage in vivo and in vitro. *Journal of Food Protection*, 70: 716-721.
- Llorach R., Tomás-Barberán F.A. y Ferreres F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): pp 3458-3464.
- Llorach R., Tomás-Barberán F.A. y Ferreres F. (2005). Functionalisation of commercial chicken soup with enriched polyphenol extract from vegetable by-products. *European Food Research and Technology*, 220(1): pp 31-36.
- Llorach, R.; Espin, J.C.; Tomas-Barberan, F.A.; Ferreres, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *J. Agric. Food Chem.* Num 50, pp 3458–3464.
- Lombard, K.; Peffley, E.; Geoffriau, E.; Thompson, L.; Herring, A. (2005). Quercetin in onion (*Allium cepa* L.) after heat-treatment simulating home preparation. *Journal of Food Composition and Analysis*. Num 18, pp 571–581.
- Lorenzo, J.M.; Sineiro, J.; Amado, I.R.; Franco, D. (2014). Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. *Meat science*, Elsevier.
- Lu, X.; Samuelson, D.R.; Rasco, B.A. y Konkel, M.E. (2012). Antimicrobial effect of diallyl sulphide on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Volumen 1. Pp1-12.
- Lunger, A.N.; Malean, E.; Craig, S.R. (2007). The effects of organic protein supplementation upon growth, feed conversion and textura quality parameters of juvenile coibia (*Rachycentron canadum*). *Aquacult.* Num 264, pp 342-352.

Luque de Castro, M. D.; Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. Num 369, pp 1-10.

## M

Mabeau, S.; Baty-Julien, C.; Hélias, A.B.; Chodosas, O.; Surbled, M.; Metra, P.; Mekideche, K. (2006). Antioxidant activity of artichoke extracts and by-products. In VI International Symposium on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives 730: pp 491-496.

MAGRAMA. (2012). Presentación de los datos de consumo alimentario en España 2011. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. [www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es).

MAGRAMA. (2013). Datos de consumo alimentario en 2013. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. [www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es).

MAGRAMA. (2015). Bases de datos de consumo en hogares. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. [www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es).

Man, M.; Epel, B.L. (2004). Characterization of regulatory elements within the coat protein (CP) coding region of Tobacco mosaic virus affecting subgenomic transcription and green fluorescent protein expression from the CP subgenomic RNA promoter. *J. of Gen. Virol.* Num 85, pp 1727-1738.

Mancebo-Campos, V., Desamparados Salvador, M., Fregapane, G. (2014). Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40 °C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food Chemistry*. Volume 150, 1 May, pp 374-381.

- Mangaraj, S.; Goswami, T.K.; Mahajan, P.V. (2009). Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of fruits and Vegetables. *Food Eng. Rev.* pp 133-158.
- Martinez, M. (2011). Soluciones Comida Refrigeradas Comidas Refrigeradas: Vuelven a las andadas. La distribución se alza como el motor de sus aspiraciones. *Alimarket*. Julio pp 46-53.
- Martino, K.G.; Guyer, D. (2004). Supercritical fluid extraction of quercetin from onion skins. *Journal of Food Process Engineering*. Num 27, pp 17–28.
- Megias, M.D.; Martinez-Teruel, A.; Hernandez, M.R. (1999). Potential environmental impact of effluents from the artichoke (*Cynara scolymus* L.) by product ensiling process using additives. *J. Agric. Food Chem.* Num 47, pp 245–255.
- Miceli, A.; Francescan, N.; Moschetti, G. y Settanni, L. (2015). The influence of addition of *Borago officinalis* with antibacterial activity on the sensory quality of fresh pasta. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. Volumen 2. Pp 93–97.
- Monje, M. Julio (2015). Refrigerados Hortofrutícolas: Hacia la diversificación. *Alimarket*.
- Moritz, J.S.; Parsons, A.S.; Buchanan, N.P.; Calvalcanti, W.B.; Cramer, K.R.; Beyer, R.S. (2005). Effect of gelatinizing dietary starch through feed processing on zero-to three-week broiler performance and metabolism. *J. of Appl. Poul. Res.* Num 14, pp 47-54.
- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Dominguez, J.M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Nuñez, M.J.; Parajo, C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. Num 72, pp 145-171.

Mulinacci, N.; Prucher, D.; Peruzzi, M.; Romani, A.; Pinelli, P.; Giaccherini, C.; Vincieri, F.F. (2004). Commercial and laboratory extracts from artichoke leave: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *J. Pharm. Biomed. Anal.* Num 34, pp 349–357.

Murcia, M.A.; López-Ayerra, B.; García-Carmona, F. (1999). Effect of processing methods and different blanching times on brócoli: proximate composition and fatty acids. *L-W-T.* Num 32, pp 238-243.

## N

Navarro, M.C. (2007). Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Revista de Fitoterapia.* Num 7, pp 131-151.

Navarro-González, I.; García-Valverde, V.; García-Alonso, J. y Periago, M. (2011). Chemical profile and functional and antioxidant properties of tomato dietary fiber. *Food Research International.* Volumen 44. Pp 1528-1536.

Negro, D.; Montesano, V.; Grieco, S.; Crupi, P.; Sarli, G.; De Lisi, A.; Sonnante, G. (2002). Polyphenols compounds in artichoke plant tissues and varieties. *J. Food Sci.* Num 77, pp 244–251.

Niness, K.R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *J. Nutr.* Num 129, pp 1402–1406.

Note, K. (2013), *Ready Meals: Market Report Plus 2013*, (fourteenth ed.)

## O

O’Gara, E.A.; Hill, D.J; y Maslin D.J. (2000). Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology.* Volumen 3. Pp 2269–2273.

Olivera, D. F.; Salvadori, V. O. (2012). Kinetic modeling of quality changes of chilled ready to serve lasagna. *Journal of Food Engineering*, 110(3), pp 487-492.



Ooraikul, B.; Stiles, M. E. (1991). *Modified Atmosphere Packaging of Food*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK.

Orlovskaya, T.V.; Luneva, I.L.; Chelombit'ko, V.A. (2007). Chemical composition of *Cynara scolymus* leaves. *Chemistry of Natural Compounds*. Num 43, pp 239–240.

## **P**

Pan, X.; Niu, G.; Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*. Num 42, pp 129-133.

Pandino, G; Lombardo,S; Mauromicale, G y Williamson, G. (2011). Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*. Volumen 126. Pp 417-422.

Parry, R.T. (2012). *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*. Editorial Springer-Science+Business Media, B.V.

Pascual y Calderón. (2000). *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª Edición. Díaz Santos.

Pascual, M.R.; Calderón, V. (1999). *Microbiología Alimentaria*. Ediciones Diaz de Santos.

Patente 20090018194. (2008). García-Pareja, P.; Sánchez-Vaquero, E.; Guillamon-Ayala, E.; Martínez- Lopez, F. Use of antimicrobial agents derived from alliaceous plants for the prevention and control of crop diseases, post-harvest rot and as environmental disinfectant products. DMC Research Center, S.L. July 11. September 9.

Patente WO 2008/105023. (2008). Pizzichini, M.; Romani, A.; Daniele, Russo, P.C.; Pinelli, P. Process for producing refined nutraceutic extracts from artichoke waste and from other plants of the cynara genus. Isr Ecoindustria S R L.

Patente: 20070160725. (2004). Lara-Cambil, A.; Garcia- Pareja, P.. Use of extracts and compounds of allium-genus plants as preservatives in the food and agri-food industries. MOUSALA, S., L.March 3.

Piscopo, A.; De Bruno, A.; Zappia, A.; Poiana. M. (2014). Antioxidant activity of dried green olives (Carolea cv.). LWT - Food Science and Technology, Volume 58, Issue 1, September. Pp. 49-54.

Platek, T.; Wegrowski, J.; Jerzewska, M.; Krygier, K. (1999). Effect of refining processes on the oxidative stability of rapeseed oil. Part V. Summary and conclusions. *Tluszcz Jadalne*. Num 34, pp 32-41.

Popa V.M., Bele C., Poiana M.A., Dumbrava D., Raba D.N. y Jianu C. (2011). Evaluation of bioactive compounds and of antioxidant properties in some oils obtained from food industry by-products. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(3): 6234-6241.

Prakash, D.; Singh, B.N.; Upadhyay, G. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*. Num 102, pp 1389-1393.

## **R**

Real Decreto 1109/1991, de 12 de julio, por el que se aprueba la Norma General relativa a los alimentos ultracongelados destinados a la alimentación humana.

Real Decreto 1254/1991, de 2 de agosto, por el que se dictan normas para la preparación y conservación de la mayonesa de elaboración propia y otros alimentos de consumo inmediato en los que figure el huevo como ingrediente.

Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor.

Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

Real Decreto 2001/1995, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

Real Decreto 2181/1975, de 12 de Septiembre de 1975, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de pastas alimenticias. (B.O.E. 13.09.1975). Modificado por: Real Decreto 1771/1976, de 2 de julio. (B.O.E. 28.07.1976). Real Decreto 2811/1983, de 13 de octubre (B.O.E. 11.11.1983). Real Decreto 1093/87, de 19 de junio (B.O.E. 08.09.1987). Corrección de errores (B.O.E. 13.9.1989). Real Decreto 1534/1991, de 18 de octubre (B.O.E. 30.10.1991).

Real Decreto 2452/1998, de 17 de Noviembre de 1998, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, distribución y comercio de caldos, consomés, sopas y cremas. (B.O.E. 24.11.1998). Este Real Decreto ha sido modificado por Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios.

Real Decreto 2483/1986, de 14 de noviembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria sobre condiciones Generales de transporte terrestre de alimentos y productos alimentarios a temperatura regulada.

Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos vegetales.

Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Este Real Decreto ha sido modificado por Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios. (B.O.E. 25.02.2010).

Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios.

Real Decreto 847/2011, de 17 de junio, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con los alimentos.

Redondo Taberner D. (2012). El aclareo en fruto: ¿una nueva fuente de compuestos funcionales?. Trabajo Fin de Máster. Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

Reed, Z.; McIlveen, H.; Strugnell, C. (2000). The retailing environment in Ireland and its effect on the chilled ready meal market. *Journal Consumer Study and Home Economics*. Num 24, pp. 234–241.

Reglamento (CE) n 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo (DOUE 24/11/2009)

Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo Texto pertinente a efectos del EEE. (DOUE 16/03/2005) y posteriores modificaciones.

Reglamento (CE) n° 2023/2006 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2006, sobre buenas prácticas de fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.

Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Este reglamento ha sido modificado por Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007, sin embargo esta modificación no afecta a platos preparados.

Reglamento (UE) n° 1183/2012 de la Comisión, de 30 de noviembre de 2012, por el que se modifica y corrige el Reglamento (UE) n° 10/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos

Reglamento (UE) n° 1282/2011 de la Comisión, de 28 de noviembre de 2011, por el que se modifica y corrige el Reglamento (UE) n° 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimento

Reglamento 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

Regueiro, J. G., & Díaz, I. (2006). Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. Centro de Tecnología de la Carne, 3.

- Richardson, T.; Finley, J. W. (1985). *Chemical Changes in Food during Processing*. AVI Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY.
- Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J Chromatogr A*. Jun 6, página 657.
- Rodríguez-Burruezo A., Raigón M.D. y Nuez F. (2006). Variación de compuestos nutricionales en una colección de tipos variedades de pimiento (*C. annuum*). *Actas de Horticultura*, 45: 91-92.
- Rodríguez-Carpena JG1, Morcuende D, Andrade MJ, Kylli P, Estévez M. (2011). Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *J Agric Food Chem*. May 25; 59(10):5625-35
- Romdhane, N.; Gourdon, C. (2002). Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*. Num 87, pp 11-19.
- Rop, O.; Balík, J.; Rezníček, V.; Juríková, T.; Skardová, P.; Salas, P.; Kramárová, D. (2011). Chemical Characteristics of Fruits of Some Selected Quince. *Czech J. Food Sci*. Volume 29(1), pp 65-73.
- Roy, B. C.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose, T. (1996). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oils and cuticular waxes from peppermint leaves. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Num 67, pp 21-26.
- Ruiz-Canoa, D. ; Pérez-Llamasa, F; Frutos, M.J., Marino B.; Arnaoc, M.; Espinosa, C.; López-Jiménez, J.A.; Castillo, J.; Zamora, S. (2014). Chemical and functional properties of the different by-products of artichoke (*Cynara scolymus* L.) from industrial canning processing. *Food Chemistry* Volume 160, 1 October, pp134–140.

S

- Saengkanuk, A.; Nuchadomrong, S.; Jogloy, S.; Patanothai, A.; Srijaranai, S. (2011). A simplified spectrophotometric method for the determination of inulin in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Euro. Food Res. Technol.* Num 233, pp 609–616.
- Samadpour, M. (2005). Trend analysis and statistical process control using multitargeted screening assays for microbial contamination and monitoring. *PCT Int. Appl.*
- Sánchez Pineda de las Infantas, M.T. (2003). Procesos de elaboración de alimentos y bebidas. *Amv Ediciones.* p 339.
- Sánchez-Guijarro, M. (2010). Utilización de agentes antimicrobianos y antioxidantes en la elaboración de alcachofa de IV Gama. Tesis doctoral Universidad Católica de San Antonio . Pp125-143.
- Sanchez-Rabaneda, F.; Jauregui, O.; Lamuela-Raventos, R.M.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. (2003). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* Num 1008, pp 57–72.
- Santhosha, S.G.; Jamuna,P.; Prabhavathi, S.N. (2013).Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review *Food Bioscience* Volume 3, September. Pages 59–74
- Sapers, G.M.; Hicks, K.B.; Miller, R.L. (2002). Antibrowning agents. *Food Sci. and Tech.*, 116 (Food Additives, 2nd Edition). peppers. *Eur. Food Res. Technol.* Num 225, pp 261-270.
- Shahidi, F.; Cadwallader, K. R. (1997). Flavor and lipid chemistry of seafoods: an overview.

- Shams-Ghahfarokhi, M.; Shokoohamiri, M.R.; Amirrajab, N.; Moghadasi, B.; Ghajari, A.; Zeini, F.; Sadeghi, G. y Razzaghi-Abyaneh, M. (2006). In vitro antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeast and dermatophytes. *Fitoterapia*. Volumen 77. Pp 321-323.
- Sheely, M. (2008). Global adoption of convenience foods, *SS-AAEA J. Agric. Econ.* pp. 1–13.
- Sim, K. H., & Sil, H. Y. (2008). Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum*) pericarp and seed extracts. *International journal of food science & technology*, 43(10), 1813-1823.
- Singh, R.; Gupta, S.; Joshi, D.D. y Nainwal, N.C. (2010). Wild apricot (*Prunus armeniaca*) kernel oil: a strategic alternative to value added fatty acids. *The International Journal of Essential Oil Therapies*. Volumen 4. Pp 132-148.
- Singh, R.P. (1994). *Scientific principles of shelf life evaluation*. C.M.D. Man. pp 3-26.
- Singh, R.P.; Wani, A.A.; Goyal, G.K. (2011). Quality of chilled ready-to-bake pizza stored in air and under modified atmospheres: microbiological and sensory attributes. *Food Science and Biotechnology*. Num 20, pp. 1–6.
- Siroli, L.; Patrignani, F.; Serrazanetti, D.I.; Tabanelli, D. (2014). Efficacy of natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed apples packaged in modified atmosphere. *Food Control*, Elsevier.
- Škerget, M.; Majhenič, L.; Bezjak, M. y Knez, Z. (2009). Antioxidant, Radical Scavenging and Antimicrobial Activities of Red Onion (*Allium cepa* L) Skin and Edible Part Extracts. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. Volumen 23. Pp 436-444.
- Sloan, A. E. (1997). What's cooking? *Food Technology*. Num 51, p 32.



## T

Takeshita, K.; Shibato, J.; Sameshima, T.; Fukunaga, S.; Isobe, S.; Arihara, K. (2003).

Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*. Num 85, pp. 151–158.

Taoa, D.; Zhoua, B.; Zhanga, L.; Hua, X.; Liaoa, X.; Zhang, Y. (2015). Kinetics of

“Laba” garlic greening and its physiochemical properties treated by Dense Phase Carbon Dioxide. *Food Science and Technology*. Volume 64, Issue 2, December.

Pages 775–780.

Tingting, M., Chengrui, T., Jiyang, L., Rui Z., Xiangyu S., Jinjin, M. (2013). Influence

of technical processing units on polyphenols and antioxidant capacity of carrot (*Daucus carrot L.*) juice. *Food Chemistry*. Volume 141. Issue 3, 1 December 2013, pp. 1637-1644.

Tucker, G.S. (2004). *Manual del envasado de alimentos y bebidas*. AMV Ediciones. pp

44-82.

## U

UNE-EN 12393-1. (2014). *Alimentos de origen vegetal. Métodos multiresiduos para la*

determinación mediante cromatografía de gases o LC-MS/MS de los residuos de plaguicidas. Parte 1: Consideraciones generales.

UNE-EN 15662. (2009). *Alimentos de origen vegetal. Determinación de residuos de*

plaguicidas utilizando GC-MS y/o LC-MS /MS seguido de extracción/división de acetonitrilo y método de purificación dispersiva SPE-QuEChERS.

## V

Vallejo Cabrera, F.A.; Estrada Salazar, E.I. (2004). *Producción de hortalizas de clima*

cálido. Universidad Nacional de Colombia.

Ventura, J., Alarcón-Aguilar F, Roman-Ramos, R., Campos-Sepulveda, E., Reyes-Vega ML, Daniel Boone-Villa, V., Jasso-Villagómez, EI., Aguilar, CN. (2013). Quality and antioxidant properties of a reduced-sugar pomegranate juice jelly with an aqueous extract of pomegranate peels. *Food Chemistry* Volume 136, Issue 1, 1 January, pp. 109–115.

Vogel, B.F.; Ng, Y.Y.; Hyldig, G.; Mohr, M.; Gram, L. (2006). Potassium lactate combined with sodium diacetate can inhibit growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum packed cold smoked salmon and has no adverse sensory effects. *J. Food Prot. Num* 69, pp 2134–2142.

## **W**

Wang, T.; MacGregor, S.J.; Anderson, J.G.; Woolsey, G.A. (2005). Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Res. Num* 39, pp 2921–2925.

Wang, X.; Liu, R; Yang,Y.; Zhan,M. (2015). Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. *Food Chemistry* 18, pp 37–43.

## **X**

Xu, G.H.; Chen, J.C.; Liu, D.H.; Zhang, Y.H.; Jiang, P.; Ye, X.Q. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *J. Food Sci. Num* 73, pp 11–18.

## **Y**

Yang, T.; Sauve, A.A. (2006). NAD metabolism and sirtuins: Metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *The APPS Journal. Volume* 8, Issue 4, pp E632, E643.

## **Z**

Zafra, J. (2013). La cadena de valor de la cebolla. *Distribución y consumo, Vol.* 3. pp 24-27.

- Zeng, B-B.; Xiao, K-J.; Shi, L.; Xiao, R-W. (2007). Application of LAMP in detecting food microorganisms. *Xiandai Shipin Yu Yaopin Zazhi*. Num 17, pp 22-25.
- Zhu, M.; Du, M.; Cordray, J.; Ahn, D.U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf.* Num 4, pp 34–42.
- Zia-ur-Rehman; Shah, W.H. (2000). Chemical and oxidative changes in fried bitter gourd and onion during storage. *Pakistan J. of Sci. and Ind. Res.* Num 43, pp 381-385.
- Zohri, A.N.; Abdel-Gawad, K. S.; Saber, S. (1995). Antibacterial, antidermatophytic and antioxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiological Research*. Num 150, pp 167-172.

