

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA



PROGRAMA DE DOCTORADO
NUTRICIÓN Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

EFFECTO EN EL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE
TRANSMISIÓN ALIMENTARIA, Y SU RELACIÓN CON EL
CONTENIDO EN MINERALES ESENCIALES, DE
CONDIMENTOS Y VERDURAS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

Realizado por:
JOSÉ M^a GARCÍA GALDEANO

Granada, a 17 de febrero del año 2022



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA, Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO EN MINERALES ESENCIALES, DE CONDIMENTOS Y VERDURAS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

TESIS DOCTORAL REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. MIGUEL NAVARRO ALARCÓN Y LA DRA. MARINA VILLALÓN MIR

Memoria presentada por el Licenciado en Farmacia/Licenciado en Ciencia y Tecnología de los alimentos/Diplomado en Nutrición Humana y Dietética, D. José María García Galdeano para optar al grado de Doctor

Granada 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José María García Galdeano
ISBN: 978-84-1117-336-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/74958>

DON MIGUEL NAVARRO ALARCÓN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA, Y DOÑA MARINA VILLALÓN MIR, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

CERTIFICAN: Que Don José María García Galdeano, con DNI: 53691350N, ha obtenido y estudiado bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral titulada: “EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA, Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO EN MINERALES ESENCIALES, DE CONDIMENTOS Y VERDURAS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA”, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo revisado su Tesis y estando conforme para ser juzgada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en Granada a 17 de febrero del 2022

Fdo. Miguel Navarro Alarcón
Director Tesis Doctoral

Fdo. Marina Villalón Mir
Codirector Tesis Doctoral

Agradecimientos

A la hora de escribir estos agradecimientos, siempre existe el temor de olvidar-me de alguna persona que haya sido de vital importancia para que yo haya llegado a este momento; espero, con el corazón en la mano, que no suceda.

A mi Director de Tesis, Miguel Navarro Alarcón. Gracias por aguantar las innumerables dudas que te he ido planteando a lo largo de estos tres años. Tu soberbia calidad científica me ha hecho aprender muchísimas cosas y, sobre todo, pulir algunas que ya daba por aprendidas correctamente. Es un auténtico lujo haber trabajado contigo.

A mi Codirectora de Tesis, Marina Villalón Mir, quiero dedicarle unas palabras especiales. Gracias por ser como eres, por tu sublime e inmensa calidad científica e investigadora que ha hecho posible que hoy esté escribiendo estas palabras; sin ti, esto no hubiera sido posible ni en el mejor de los sueños. Gracias por dedicarme lo más valioso que tienes (tu tiempo, aunque fuera en vacaciones o fines de semana, y tu energía) y por guiarme a través de este desierto que ahora llega a su fin. Nuestras innumerables charlas en la pandemia del SARS-CoV-2 darían para escribir un libro (u otra tesis). Durante estos tres años has sido como una segunda madre para mí, gracias de corazón.

A Ana M^a Negrillo Galindo, mi profesora de Botánica, que fue la primera persona que hizo germinar en mí la semilla de querer ser un auténtico hombre de ciencia, de seguir profundizando en el conocimiento y en el saber, siempre llegando a lo máximo posible (nunca olvidaré los interminables apuntes de la asignatura que hacía con el ordenador y que me corregías luego).

A la gran familia que conforma la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. Habéis dejado tanta huella en mí que, tras finalizar mis estudios de Farmacia, se me ocurrió la “feliz” idea de continuar con la Diplomatura de Nutrición Humana y Dietética y, posteriormente, con la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. En teoría, aquí debería haber acabado toda mi formación universitaria; sin embargo, parece que todavía os echaba de menos y mi formación necesitaba todavía el último tirón. Quiero hacer una mención especial a la antigua Decana, Ana Isabel del Moral García, y a la antigua Vicedecana de Ordenación Académica y Garantía de Calidad, Eva M^a Talavera Rodríguez, que tantas veces me han atendido y guiado; no sabéis cuántos gratos recuerdos guardo de cada visita que os hacía con mis innumerables dudas. Gracias por atenderme siempre con tanto cariño.

A todos los integrantes del Dpto. de Nutrición y Bromatología, en especial a mis antiguos profesores con los que tuve la gran suerte de aprender tanto: Manuel Olalla Herrera, Rafael Jesús Giménez Martínez, M^a Luisa Lorenzo Tovar, Rosa M^a García Estepa (D.E.P.), Reyes Artacho Martín-Lagos (gracias por atenderme con tanta diligencia cuando eras coordinadora del Programa de Doctorado), Belén García-Villanova Ruiz (por enseñarme tanto con tus clases), Rosa M^a Blanca Herrera (por inculcarme el amor por la Legislación Alimentaria), Carmen Cabrera Vique (por atenderme siempre con tantísimo cariño, D.E.P.) y Herminia López García de la Serrana (por atenderme siempre con una sonrisa). Gracias al resto de profesores del departamento (Cristina Samaniego Sánchez, Eduardo Jesús Guerra Hernández, Fátima Olea Serrano, M^a Dolores Ruiz López, Ana M^a Rivas Velasco, José Ángel Rufián Henares, José Javier Quesada Granados, Javier Montilla Gómez) por hacerme sentir un miembro más de vuestra comunidad y por tratarme con tanto cariño.

A Nuria García-Agua Soler, mi amiga, compañera en la Junta de Gobierno del Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Málaga y “compañera de batallas” en nuestras clases en la Universidad de Málaga. Gracias por confiar en mi para impartir docencia y por insistirme tanto en que tenía que hacer la tesis. Gracias por ser una amiga que lo da todo sin pedir nada a cambio (excepto innumerables bibliografías que me solicita continuamente sobre Nutrición y Dietética), gracias por todos los consejos que me has dado y por todos los ánimos cuando venían momentos complicados.

A Antonio García Ruiz, del Dpto. de Farmacología y Pediatría de la Universidad de Málaga, por soportarme y enfadarse conmigo alguna que otra vez. Al igual que con Nuria, siempre que me veía me insistía en que ya estaba tardando en comenzar el doctorado. Siempre recordaré la frase que me decías “*José M^a, cuando impartas docencia procura ser conciso, breve y, sobre todo, enseñar*”.

A todos mis compañeros de la Junta de Gobierno del ICOFMA, que me apoyaron desde el primer momento a iniciar este camino (especialmente a Francisco Javier Florido Alba y Ángel Jesús Martín Reyes).

Dedicatoria

A mis padres, José e Isabel, por hacer de mi lo que soy, con todos mis aciertos y errores. Sin vosotros, aunque no estuvierais muy de acuerdo en que pasara tres años de mi vida inmerso en este proyecto, no soy absolutamente nada. Gracias por haberme traído al mundo, por cuidar de mí, por la excelente educación recibida y por hacerme ser como soy.

A mi tío Francisco José, por preocuparse continuamente de mí y de mi vida.

A mi abuelo Francisco y a mi abuela Isabel, que siempre estuvieron muy orgullosos de mí y que ahora lo estarían todavía más. Os echo de menos.

“Cuando lo creas todo perdido, no olvides que aún te queda el futuro, tu cerebro, tu voluntad y dos manos para cambiar tu destino”

Wernher Magnus Maximilian Freiherr von Braun

CAPÍTULO I

CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE HIERBAS AROMÁTICAS DE USO CULINARIO SEGÚN SISTEMAS DE COMERCIALIZACIÓN

1. Introducción.....	8
1.1. Plantas aromáticas en la industria alimentaria y en el sector de la restauración	8
1.1.1. Evolución histórica.....	8
1.1.2. Empleo como condimentos alimenticios y agentes conservadores en restauración e industria alimentaria.....	10
1.2. Aceites esenciales de plantas aromáticas y su función antimicrobiana.....	22
1.3. Plantas aromáticas como vehículos de peligros microbianos.....	25
1.3.1. Principales microorganismos presentes en las plantas aromáticas de uso culinario e industrial.....	25
1.3.2. Tecnologías utilizadas para la descontaminación de plantas aromáticas	47
1.4. Plantas aromáticas y sus sistemas de comercialización	51
1.4.1. Plantas aromáticas según el tratamiento de conservación aplicado	51
1.4.2. Plantas aromáticas según el sistema de comercialización utilizado	52
2. Objetivos	54
3. Materiales y métodos	55
3.1. Muestras analizadas.....	55
3.1.1. Hierbas y especias deshidratadas	55
3.1.2. Hierbas y especias frescas	56
3.2. Métodos de análisis microbiológico.....	58
3.2.1. Preparación de las muestras	58
3.2.2. Enriquecimiento y medios de cultivo	60
3.2.3. Incubación y conservación de cultivos.....	60
3.2.4. Recuento de microorganismos	61
3.3. Material utilizado	63
3.4. Tratamiento estadístico.....	64
4. Resultados y discusión	64
4.1. Análisis microbiológico de hierbas y condimentos deshidratados	64
4.2. Análisis microbiológico de hierbas y condimentos frescos	77
5. Conclusiones	90
6. Bibliografía	92

CAPÍTULO II

CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE VERDURAS TÍPICAS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA DE COMERCIALIZACIÓN

1. Introducción.....	108
1.1. Gamas alimentarias. Descripción y clasificación.....	108
1.2. Verduras de I Gama.....	112
1.2.1. Papel de las frutas, verduras y hortalizas crudas como responsables de enfermedades de transmisión alimentaria	112
1.3. Verduras de IV Gama.....	115
1.3.1. Definición y características	115
1.3.2. Ventajas e inconvenientes de la IV Gama en restauración.....	120
1.3.3. Métodos de desinfección	123
1.3.3.1. Métodos químicos	123
1.3.3.2. Métodos físicos	132
1.3.3.3. Métodos biológicos	140
1.3.3.4. Métodos combinados	141
1.3.3.5. Métodos basados en la ingeniería genética	142
1.3.4. Sistemas de envasado y comercialización de la IV Gama alimentaria.....	143
2. Objetivos	146
3. Materiales y métodos	147
3.1. Muestras analizadas.....	147
3.2. Métodos de análisis microbiológico.....	148
3.2.1. Preparación de las muestras	148
3.2.2. Enriquecimiento y medios de cultivo	148
3.2.3. Incubación y conservación de cultivos.....	148
3.2.4. Recuento de microorganismos	148
3.3. Material utilizado	148
3.4. Tratamiento estadístico.....	148
4. Resultados y discusión	149
4.1. Presencia y evolución microbiana en vegetales de I Gama. Importancia del peciolo sobre el crecimiento microbiano	149
4.1.1. Calidad higiénica de verduras de I Gama con peciolo	150
4.1.2. Calidad higiénica de verduras de I Gama sin peciolo	159
4.1.3. Influencia del peciolo sobre el crecimiento microbiano en verduras de I Gama..	164

4.2. Presencia y evolución microbiana en vegetales de IV Gama. Importancia del peciolo sobre el crecimiento microbiano.....	178
4.2.1. Calidad higiénica de verduras de IV Gama con peciolo	181
4.2.2. Calidad higiénica de verduras de IV Gama sin peciolo	196
4.2.3. Influencia del peciolo sobre el crecimiento microbiano en verduras de IV Gama	203
5. Conclusiones	208
6. Bibliografía	210

CAPÍTULO III

INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE DIFERENTES MINERALES EN HIERBAS AROMÁTICAS DESHIDRATADAS EN EL CRECIMIENTO DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y OTROS PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

1. Introducción.....	231
1.1. Hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas.....	233
2. Objetivos	238
3. Materiales y métodos	239
3.1. Muestreo de hierbas aromáticas deshidratadas.....	239
3.2. Análisis de los minerales objeto de estudio en muestras de hierbas aromáticas deshidratadas	240
3.3. Métodos de análisis microbiológico.....	241
3.4. Tratamiento estadístico.....	242
4. Resultados y discusión	242
4.1. Concentraciones medias de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas.....	242
4.1.1. Concentraciones medias de hierro en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización.....	248
4.1.2. Concentraciones medias de cinc y cobre en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización.....	248
4.1.3. Concentraciones medias de calcio y magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización	249
4.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio y el crecimiento microbiano de microorganismos patógenos en hierbas aromáticas deshidratadas.....	250
4.3. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio y el crecimiento microbiano de microorganismos patógenos en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización	253
5. Conclusiones	265
6. Bibliografía	267

CAPÍTULO IV

INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE DIFERENTES MINERALES, EN HIERBAS AROMÁTICAS FRESCAS Y VERDURAS FRESCAS, EN EL CRECIMIENTO DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y OTROS PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

1. Introducción.....	275
2. Objetivos	277
3. Materiales y métodos	278
3.1. Muestreo de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas	278
3.2. Análisis de los minerales objeto de estudio en muestras de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas	279
3.3. Métodos de análisis microbiológico.....	279
3.4. Tratamiento estadístico.....	279
4. Resultados y discusión	280
4.1. Concentraciones de los minerales objeto de estudio en hierbas aromáticas frescas.....	280
4.1.1. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según el tipo de hierba aromática fresca.....	280
4.1.2. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según el tipo de hierba aromática fresca	283
4.2. Concentraciones de los minerales objeto de estudio en verduras frescas.....	285
4.2.1. Concentraciones de hierro, cinc y cobre en verduras frescas	285
4.2.1.1. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según el tipo de verdura fresca	285
4.2.1.2. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según la presencia o no de peciolo en las verduras frescas	288
4.2.1.3. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según la forma de comercialización de las verduras frescas (I o IV Gama).....	289
4.2.2. Concentraciones de calcio y magnesio en verduras frescas	292
4.2.2.1. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según el tipo de verdura fresca	292
4.2.2.2. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según la presencia o no de peciolo en las verduras frescas	294
4.2.2.3. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según la forma de comercialización de las verduras frescas (I o IV Gama)	296

4.3. Crecimiento microbiológico en hierbas aromáticas frescas y verduras frescas	299
4.3.1. Crecimiento microbiológico en función del tipo de hierba aromática fresca.....	299
4.3.2. Crecimiento microbiológico en función del tipo de verdura fresca	304
4.3.2.1. Crecimiento microbiológico en función de la presencia o no de peciolo en las verduras frescas	311
4.3.2.2. Crecimiento microbiológico según la forma de comercialización de las verduras frescas (I o IV Gama)	315
4.4. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de minerales objeto de estudio de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios.....	319
4.4.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios.....	319
4.4.1.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre de hierbas aromáticas frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios	320
4.4.1.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre de verduras frescas con el crecimiento de patógenos alimentarios	321
4.4.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de calcio y magnesio de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios.....	322
4.4.2.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de calcio y magnesio de hierbas aromáticas frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios	322
4.4.2.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de calcio y magnesio de verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios.....	323
4.4.3. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de los minerales objeto de estudio determinados en hierbas aromáticas frescas y verduras frescas.....	324
4.4.3.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de los minerales objeto de estudio determinados en hierbas aromáticas frescas.....	324
4.4.3.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de los minerales de objeto de estudio determinados en verduras frescas	325
5. Conclusiones	340
6. Bibliografía	342

CAPITULO I

CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE HIERBAS AROMÁTICAS DE USO CULINARIO SEGÚN SISTEMAS DE COMERCIALIZACIÓN

1. Introducción

1.1. Plantas aromáticas en la industria alimentaria y en el sector de la restauración

1.1.1. Evolución histórica

Ya en el Paleolítico el ser humano (*Homo sapiens*, *Homo habilis*, *Homo erectus*, *Homo neanderthalensis* y *Homo floresiensis*) utilizaba los ajos, rábanos, hinojo y otras especias para dar sabor a los frutos y plantas silvestres comestibles y en el Neolítico las especias se empleaban para enmascarar el mal olor de la carne.

5.000 años a.C., en China, ya se conocían y utilizaban las especias para conservar alimentos, proporcionar un mejor sabor, olor y color, fermentar algunas bebidas y para usos medicinales. Compraban las especias en Indonesia, las intercambiaban con India y Sri Lanka (antigua Ceilán) y comerciaban con los árabes (Alonso, 2008).

En esta línea, 3.500 años a.C., los egipcios ya conocían y comerciaban con especias, que utilizaban para condimentos, preparación de cosméticos, embalsamamiento y como medicamentos (Alonso, 2008). Así, por ejemplo, el incienso y la mirra eran utilizados en sus ceremonias religiosas.

Desde el S. XIII a.C., los fenicios fundaron colonias por toda la cuenca mediterránea. Comerciaron por todo el mediterráneo uniendo Oriente con Occidente. Entre los años 1.200 y 800 a.C., la capital (Tiro) se convirtió en el centro de distribución de especias más importantes, cuyos clientes más importantes eran los griegos y los romanos (Alonso, 2008).

Igual sucedía en la Grecia clásica y en la Roma antigua, donde autores como Hipócrates o Dioscórides, entre otros, recogen en sus escritos gran cantidad de fórmulas médicas basadas en especias tan conocidas como el anís, el coriandro, el tomillo o la pimienta, entre otras.

Los árabes controlaron el tráfico de especias durante 5.000 años, obteniendo el máximo apogeo cuando el poder de Egipto pasó a Babilonia y Asia. Ocultaban la fuente de sus suministros; así, por ejemplo, tenían que ir recoger la canela a un país muy lejano, en el “*valle de las serpientes*” (Alonso, 2008).

Este consumo de hierbas aromáticas y especias continuó durante la Edad Media a través de la llamada “*Ruta de la seda*”, donde viajeros como Marco Polo, en el siglo XIII, trae de Asia a Europa especias, pasta y seda.

En el S. XIV las especias comenzaron a popularizarse entre la población al ser distribuidas por los monjes que las cultivaban en sus abadías. Carlomagno, en su “*Capitulare de Villis*”, habla de “*las plantas útiles de obligado cultivo en las marcas del Imperio*”. La pimienta, la canela o el clavo se utilizaban para conferir sabor y aroma a la carne con el fin de disimular su habitual podredumbre. Otras especias muy cultivadas por los religiosos eran la salvia, la menta, el ajo y el hinojo (Botanical-online, 2021).

Posteriormente, durante los siglos XV y XVI, el comercio de las especias tuvo un gran impulso a partir del descubrimiento de América. Cabe recordar que la intención de Cristóbal Colón con su viaje no era más que encontrar una ruta alternativa con la India para acortar su duración, con el fin de tener un mejor acceso al comercio de especias. Se comercia con la pimienta de Jamaica, el pimiento de Chile, el pimentón, etc. Así, por ejemplo, el descubrimiento de la vainilla en México fue todo un gran descubrimiento, convirtiéndose rápidamente en la especia de moda (Alonso, 2008). Y Vasco de Gama, a través de su viaje por el Cabo de Buena Esperanza, consigue llegar a un acuerdo comercial con el gobierno de la India para comerciar con nuez moscada, clavo, canela, jengibre y pimienta (Alonso, 2008).

El gran interés por las especias propició una gran expansión colonial de las potencias europeas hacia Oriente y durante todo el siglo XVII y XVIII países como Portugal y Holanda se hicieron, gracias a su poderío naval, con el control de estos condimentos que, en un principio y dado su elevado precio, solo podían ser consumidas por las clases sociales más altas y adineradas.

Es a partir del siglo XIX cuando las especias se comienzan a vender envasadas de forma similar a la actual, iniciándose la confección de productos elaborados con la mezcla de varias de ellas combinadas con otros ingredientes (Botanical-online, 2021) y el comercio de las especias deja de ser un monopolio de un solo país/países, para convertirse en un comercio bilateral entre productores y consumidores. En la actualidad, los principales países consumidores de especias son EEUU, Francia y Japón, y los principales exportadores Singapur, China y Madagascar (Botanical-online, 2021).

1.1.2. Empleo como condimentos alimenticios y agentes conservadores
en restauración e industria alimentaria

Las plantas aromáticas se utilizan desde los albores de la humanidad para realzar y conferir sabor a los alimentos. Según el *Real Decreto 2242/1984, de 26 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias*, se designa con el nombre de **especia** o **condimento aromático** a “*las plantas o partes de las mismas, frescas o desecadas, enteras, troceadas o molidas, que por su color, aroma o sabor característicos se destinan a la preparación de alimentos y bebidas, con el fin de incorporarles estas características haciéndoles más apetecibles y sabrosos y, en consecuencia, consiguiendo un mejor aprovechamiento de los mismos. Tienen la consideración de condimentos naturales la sal y el vinagre, que son objeto de reglamentaciones específicas*” (Real Decreto 2242/1984, de 26 de septiembre).

Cada especie responderá a la denominación característica y composición propia. Las principales, distinguiéndose conforme a la parte vegetal que las constituyen, se clasifican en:

- **Cortezas:** canela.
- **Flores o partes florales:** alcaparra, azafrán y clavo.
- **Frutos:** anís, apio, badiana, cardamomo, cilantro, comino, enebro, hinojo, pimentón, pimienta de Cayena, pimienta inglesa, pimienta negra y vainilla.
- **Hojas y sumidades:** ajedrea, artemisa, estragón, té de roca, laurel, menta, orégano, perejil, poleo, romero, salvia, tomillo y espliego.
- **Rizomas y raíces:** cálamo, cedoaria, galanga y jengibre.
- **Semillas:** macis, mostaza, nuez moscada y pimienta blanca.

Aunque los términos de planta aromática y especia suelen emplearse indistintamente, hay diferencias entre ambos ya que son dos tipos de condimentos elaborados a partir de diferentes secciones de plantas y procesados de manera diferente (Hogebach, s.f.):

- **Planta o hierba aromática:** procede exclusivamente de las hojas de las plantas herbáceas que no poseen tallos leñosos. Se recomienda utilizarlas frescas, ya que así sus propiedades organolépticas se mantienen prácticamente intactas; en el caso de utilizarlas desecadas, muchas pierden su aroma y cambian su sabor. Ejemplos son el tomillo, el orégano, la albahaca, el perejil, la menta, el cilantro, la hierbabuena, el laurel, etc.

- **Especia:** comprende todas las partes aromáticas, tales como yemas, frutos, bayas, raíces o corteza, generalmente secas, de plantas que crecen en regiones tropicales. Generalmente, las especias se someten a tratamientos de desecación a temperaturas elevadas, por lo que desarrollan un sabor más intenso.

La combinación de ambas permite conferir sabor y aroma a los alimentos.

Las hierbas aromáticas en los sistemas alimentarios son de carácter universal, ya que se han utilizado ampliamente en la cocina; además, gracias a la industria alimentaria, se ha podido preservar y mejorar la calidad de los alimentos con el fin de extender la vida útil de los mismos (Duncan *et al.*, 2017). Como se detallará más adelante, esta acción conservadora se debe a la presencia en estas plantas de compuestos químicos con propiedades antioxidantes tales como **aceites esenciales** (alcanfor, 1,8-cineol, α -pineno, borneol, β -pineno, limoneno y p-cimeno), **lactonas sesquiterpénicas** (carnosol, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, 7-metoxirosmanol y rosmadial), **ácidos triterpénicos** (ácido ursólico y betulínico), **alcoholes triterpénicos**, **ácidos fenólicos** (ácido cafeico, clorogénico y rosmarínico), **flavonoides** (luteolina, apigenina, genkwanina, diosmetina, hispidulina, 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona y cirsimaritina) y **heterósidos**, entre otros.

Las hierbas aromáticas deshidratadas se utilizan tanto en el hogar, agregándose a gran cantidad de recetas, como en la industria alimentaria, ya que intensifican el color, sabor y el aroma (Melo *et al.*, 2019). Además, son una excelente fuente de fitoquímicos, responsables de sus diferentes propiedades biológicas, como son la actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, anestésica, neuroprotectora, hepatoprotectora y antitumoral, lo que proporciona a las hierbas aromáticas un gran potencial terapéutico y preventivo de enfermedades, además de su gran utilidad para mejorar la funcionalidad de alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos o pesticidas (Dima *et al.*, 2015; Damjanović-Vratnica, 2016; Pohl *et al.*, 2016; Potortì *et al.*, 2020).

Las plantas aromáticas proporcionan proteínas, fibra, componentes volátiles (aceites esenciales), vitaminas (A, B y C), minerales (calcio, fósforo, sodio, potasio, hierro, cinc, magnesio, manganeso y azufre) y fitoquímicos (sustancias bioactivas presentes en pequeñas cantidades que actúan como antioxidantes, bactericidas o antivirales) (Costa *et al.*, 2015; Pohl *et al.*, 2016). Se han utilizado como medicina natural para aliviar el estrés, nerviosismo, insomnio, fatiga y ansiedad (Moghaddam *et al.*, 2020).

Su función conservadora se debe a los aceites esenciales que presentan en su composición (Ríos *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, el aceite esencial de clavo mostró la mayor capacidad antimicrobiana frente a diferentes patógenos alimentarios para la conservación de pescado, seguido del aceite esencial de romero y el de lavanda. También se observó actividad antimicrobiana frente a *Salmonella enteritidis* del vapor de carvacrol en trozos de pollo crudo (Gómez-Estaca *et al.*, 2010). Sin embargo, factores como la localización geográfica, temporada de cosecha, condiciones del suelo, variaciones de temperatura, intensidad de la luz, concentraciones de dióxido de carbono atmosférico y especies pueden influir en la calidad y composición de las hierbas aromáticas y sus aceites esenciales (Napoli *et al.*, 2020).

Al igual que cualquier producto de origen agrícola, las hierbas aromáticas son vulnerables a la contaminación microbiana durante toda la cadena alimentaria, desde la cosecha hasta el uso por parte de los consumidores, por lo que es importante determinar el crecimiento de patógenos alimentarios en las diferentes hierbas aromáticas, y evaluar cómo influyen los diferentes componentes químicos de éstas en su crecimiento.

Existen problemas asociados con la producción de hierbas aromáticas; en particular, el secado al fuego y al sol se consideran los más críticos en la producción de especias, ya que éstas están expuestas a gases de combustión y contaminantes como insectos, pájaros y roedores. Además, altas cargas microbianas (de hasta 10^8 UFC/g) se pueden encontrar en las materias primas dependiendo de las partes de la hierba utilizadas, de su origen y las condiciones climáticas, de la cosecha, procesamiento, almacenamiento y transporte (Schweiggert *et al.*, 2007). Las poblaciones microbianas se componen, principalmente, de bacterias, mohos y levaduras mesofílicas y formadoras de esporas, entre ellas géneros patógenos que estropean los alimentos tales como *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria* y *Staphylococcus* (Schweiggert *et al.*, 2007).

Otro problema asociado a las especias y hierbas aromáticas es su adulteración y/o falsificación ya que, por lo general, son productos caros que se distribuyen con una gran demanda en todos los países. Los altos precios que pueden alcanzar algunas de ellas en estado puro (por ejemplo, el azafrán puede llegar a venderse a 10.000 €/kg) hace que sean blanco de potenciales adulteraciones. Por este motivo, la *Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria* y la *Red de Fraude Alimentario* de la Unión Europea realizan pruebas de laboratorio en colaboración con las autoridades nacionales, con el fin de obtener información sobre la prevalencia del fraude en determinadas cadenas de suministro. Para ello, emplean métodos analíticos basados en información genética (ADN), que es específica para una especie determinada, o compuestos químicos, que son típicos del material utilizado para adulterar la hierba o especia. Por ejemplo, las hojas de olivo contienen un compuesto específico, denominado oleuropeína, que, si se detecta en el orégano, indica la adulteración de éste con hojas de olivo.

El uso de plantas aromáticas en la cocina está cada vez más extendido en nuestro país, tanto en la frecuencia como en la variedad de especies utilizadas. Es un reflejo del incremento de nuestra cultura gastronómica y del mayor interés por la cocina que muestran capas más amplias de la población (Mendiola *et al.*, 2009).

Las plantas aromáticas se pueden utilizar como condimento alimenticio y se pueden combinar entre sí (picadas, molidas o sin modificar) para generar diferentes condimentos o mezcla (Gaullin *et al.*, 2007). Algunos ejemplos son:

- **Bouquet garni:** consta de tres ramas de perejil, una de tomillo y media de laurel, contenidas en una hoja de puerro enrollada.
- **Finas hierbas:** perejil, cebollino y estragón.
- **Hierbas de Provenza:** nuez moscada, clavo, lavanda, romero, laurel y tomillo.
- **Mezcla Afrodita:** cilantro, cúrcuma, clavo, haba tonca y rábano rústico.

Plantas ampliamente utilizadas en la cocina mediterránea son el tomillo, orégano, albahaca, clavo, cilantro, perejil, comino, romero, laurel, hinojo o estragón, ya que comunican a los alimentos características organolépticas más apetitosas al olfato y al paladar predisponiendo el ánimo del consumidor y estimulando su apetito. Además, al provocar una mayor secreción de las glándulas salivares, gástricas y hepáticas, facilitan el proceso de la digestión (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017).

Las plantas aromáticas objeto de nuestro estudio son las siguientes:

- **Tomillo (*Thymus vulgaris*, L.):** pertenece a la familia de las labiadas (*Lamiaceae*). Es una planta ampliamente extendida por el hemisferio norte, especialmente en toda la región mediterránea, Europa meridional, norte de África y Asia Menor. Se encuentra en los bordes de los caminos secos y matorrales. Su utilización es muy frecuente en la región mediterránea, donde algunas especies forman un tipo de vegetación arbustiva no más de 50 centímetros de altura (Ghasemi *et al.*, 2013).

Es una mata perenne cultivada como hierba aromática de hasta 30 centímetros de altura, con tallos leñosos y grisáceos. Sus hojas son lanceoladas u ovadas, enteras, pecioladas, con el envés cubierto de vellosidad blanquecina y con el contorno girado hacia dentro. Sus flores son bilabiadas purpúreas, rosadas o blancas, con la corola de labio superior escotada y el inferior dividido en tres lóbulos.

Las hojas y sumidades florales deben recogerse en primavera y ser secadas a la sombra.

Sus principales componentes activos son (Fonnegra *et al.*, 2007; Botanical-online, 2021):

- **Aceite esencial (0,8-2,5 %):** rico en timol (las de origen español apenas lo contienen) y carvacrol (80 %), p-cimeno, γ -terpineno, linalol, α -terpineol, anetol y borneol (hojas).

- **Flavonoides:** cirsilineol, timonina, narnigenina, erodictol, apigenina, luteolina, quercetina y rutina.

- **Vitamina C y β -carotenos.**

- **Aminoácidos:** cistina, valina, glicina e isoleucina.

- **Ácidos orgánicos:** ácido nicótico, cafeico, oleanólico, ursólico y rosmarínico.

- **Minerales:** calcio, cobalto, magnesio, aluminio (hojas) y hierro (planta).

- **Taninos.**

Es considerado un antibiótico natural y una de las mejores hierbas desinfectantes debido a su enorme riqueza en timol y carvacrol.

Protege frente a las intoxicaciones alimentarias. Es un ingrediente que condimenta la mayoría de platos calientes (estofados, guisos, etc.). Estos platos, cuando se conservan durante horas, son más susceptibles de contener gérmenes y microbios:



Figura 1. *Thymus vulgaris*, L.

- **Romero** (*Salvia rosmarinus*, L.; *Rosmarinus officinalis*, L.): pertenece a la familia de las labiadas (*Lamiaceae*). Es originario de la zona mediterránea, sobre todo en el sur de Europa, norte de África y suroeste de Asia.

Es un arbusto perennifolio, aromático, de hasta 2 metros de altura, con ramas marrones y erectas. Las hojas son lineares y coriáceas. Es una especie termófila que requiere un clima templado o templado-cálido y que vive en cualquier tipo de suelo, si bien prefiere los calcáreos.

Su recolección, cuando se destina a herboristería, se hace en septiembre y, cuando se destina a la obtención de aceite esencial, en primavera.

Numerosos estudios han informado el uso de extractos de romero y aceites esenciales, para uso comercial, como un bioconservador de alimentos naturales (Giacometti *et al.*, 2018).

La *Directiva 2010/67/UE de la Comisión, de 20 de octubre de 2010 que modifica la Directiva 2008/84/CE, por la que se establecen criterios específicos de pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes* aprobó la utilización de extractos de romero como un nuevo aditivo alimentario (E392) (Directiva 2010/67-/UE, de 20 de octubre).

Sus principales componentes activos son (Botanical-online, 2021):

- **Aceite esencial (debe contener, al menos, un 1,2 %):** alcanfor, 1,8-cineol, α -pineno, borneol, β -pineno, limoneno y p-cimeno.
- **Lactonas sesquiterpénicas:** carnosol, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, 7-metoxirosmanol y rosmadial.
- **Ácidos triterpénicos:** ácido ursólico y betulínico.
- **Alcoholes triterpénicos:** α y β -amirina, betulina.
- **Ácidos fenólicos:** ácido cafeico, clorogénico y rosmarínico.
- **Flavonoides:** luteolina, apigenina, genkwanina, diosmetina, hispidulina, 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavona y cirsimaritina.
- **Heterósidos:**



Figura 2. *Rosmarinus officinalis*, L.

- **Orégano (*Origanium vulgare*, L.):** pertenece a la familia de las labiadas (*Lamiaceae*). Es originario de Europa y Asia, encontrándose en herbazales secos y colindante a los bosques.

Es una planta herbácea, perenne de hasta 1 metro de altura, con tallos ramificados de sección cuadrangular, con dos caras pelosas y las otras sin apenas pelos (Benítez *et al.*, 2014). Las hojas son ovales, pecioladas, dentadas o enteras. Tallos y hojas están recubiertos por diminutos pelos glandulares, ricos en aceite esencial que, cuando se frota, desprenden un característico olor. Las flores son bilabiadas, de color rosado, violáceas o blancas de hasta 7 milímetros.

Las hojas se recolectan en primavera y verano, y se pueden utilizar frescas o secas. Es conveniente recoger las flores en verano, especialmente en agosto, que es su punto de máxima floración y aroma. Se deben secar a la sombra y conservar en un recipiente hermético, seco, de cristal, fuera del alcance de la luz.

Sus principales componentes activos son (Botanical-online, 2021):

- **Aceite esencial:** 0,15-1 % en la planta fresca y 2-6 % en la planta seca. Es muy rico en compuestos fenólicos como el carvacrol y timol (50 % o superior), cineol, borneol, β -bisolobeno, limoneno, α -pineno, β -pineno, mirceno, p-cimeno, canfeno, α -terpineno y β -cariofileno (hojas y flores). Los múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano, han comprobado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativas (por ejemplo, *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*, entre otras) y Gram positivas (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y especies del género *Bacillus* (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

- **Flavonoides:** apigenina, luteolina, narnigenina, pinocembrina, quercetina, kaempferol.

- **Ácidos:** ferúlico, rosmarínico, cafeico, o-cumárico, ursólico, oleanólico, p-hidroxibenzoico y vainillínico (en plantas, hojas y flor); palmítico, esteárico, oleico, ursólico, cafeico, cáprico (semillas).

- **Taninos.**

- **Minerales:** muy rico en potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, hierro (planta).

- **Vitaminas:** niacina, betacarotenos (planta):



Figura 3. *Origanum vulgare*, L.

- **Clavo** (*Syzygium aromaticum*, L): pertenece a la familia *Mirtaceae*. Es originario de las principales islas del archipiélago de las Molucas (Indonesia), en el Sudeste Asiático. Actualmente, su cultivo se ha extendido a Indonesia, Madagascar, Zanzíbar, India y Sri-Lanka.

Es un árbol perenne de hasta 20 metros de altura si bien, cuando está cultivado, no suele superar los 10 metros. Su tallo es erecto, de corteza gris. Las hojas pueden ser de hasta 12 centímetros de longitud, puntiagudas, ovaladas, oval-lanceoladas o lanceoladas, simples, muy aromáticas, verdes lustrosas y coriáceas. Están provistas de numerosas glándulas que le confieren un tacto pegajoso. Sus flores se encuentran dispuestas en inflorescencias en forma de panículas al final de las ramas jóvenes.

La mayoría de las partes del árbol son aromáticas, pero sólo se recogen los botones florales antes de que la flor se abra; cuando las flores se desarrollan por completo pierden el aroma, al igual que los frutos, que tampoco son aromáticos.

La especia son los botones florales (flores inmaduras antes de abrirse). Para que el clavo sea adecuado, se recoge cuando el árbol tiene un mínimo de 6 años de edad.

Se debe recoger cuando la yema floral todavía no se ha abierto. Al principio, las yemas florales tienen un color rosado pero, a medida que van creciendo, adquieren una tonalidad rojo fuerte; este es el momento adecuado para recogerlo (Pandey *et al.*, 2011). La recolección se lleva a cabo entre septiembre y febrero.

Los tallos, las hojas y los botones que se encuentran sin abrir son las partes de esta especie que se utilizan principalmente para la extracción de aceite esencial (Srivastava *et al.*, 2005).

Sus principales componentes activos son (Botanical-online, 2021):

- **Aceite esencial:** rico en eugenol (hasta un 90 %), cariofileno (hasta un 15 %), furfural, vainillina, salicilato de metilo, pirocatecol, metil-cetona, pineno y aldehídos valeriánicos.

Los componentes activos de las especias que tienen actividad contra los microorganismos son, en su mayoría, metabolitos secundarios tales como alcaloides y glucósidos, entre otros (Pandey *et al.*, 2011). Otros autores atribuyen la actividad antimicrobiana del aceite esencial de clavo a los compuestos fenólicos, del tal manera que a mayor cantidad de compuestos fenólicos en el aceite esencial la actividad antimicrobiana será más alta y eficaz (Rahnama *et al.*, 2012). Este efecto es explicado por otros autores, afirmando que estos compuestos pueden desnaturalizar a las proteínas y, al mismo tiempo, tener una reacción en cadena con los fosfolípidos de la membrana celular, cambiando así su permeabilidad y produciendo el decrecimiento y la muerte (Nonsee *et al.*, 2011). El aceite esencial y los extractos de clavo poseen compuestos con una vasta y efectiva actividad antimicrobiana contra gran variedad de organismos, tales como bacterias y mohos y levaduras, la cual puede ser aprovechada dentro de los distintos campos de la industria alimentaria como aditivos naturales alternativos a los antimicrobianos sintéticos naturales; de esta forma, es posible extender la vida útil de los alimentos procesados (Aguilar *et al.*, 2017).

- **Cromonas:** eugenina, isoeugenitol, isoeugenitina y eugenitina.
- **Taninos.**
- **Mucílagos.**
- **Sitosterol y estigmaterol.**
- **Resinas, celulosa y ácido oleanólico:**



Figura 4. *Syzygium aromaticum*, L.

- **Albahaca (*Ocimum basilicum*, L.):** pertenece a la familia de las labiadas (*Lamiaceae*). Es una planta de jardín originaria de la India, cultivada en huertos y macetas.

Es una hierba anual de hasta 1 metro de altura, con tallos rectos y múltiples. Las hojas son ovaladas o lanceoladas y muy aromáticas. Las flores están agrupadas en espigas de verticilos poco densos, formados por 6 flores cada uno.

Es una planta comestible que se cultiva (las hojas y las sumidades florales se recogen en verano). Se secan a la sombra y se guardan en recipientes de vidrio bien cerrados. Se puede congelar para poder utilizarla fresca durante todo el año.

Sus principales componentes activos son (Botanical-online, 2021):

- **Aceite esencial:** es muy rica en aceites esenciales (0,2-1 %) y de ahí su aroma tan intenso y característico. Contiene estragol (55 %), eugenol, linalol, acetato de linalilo, metilcinamato, cineol, borneol, ocimeno, geraniol, anetol, β -cariofileno, α -terpineol, pineno, alcanfor y carvacrol.

- **Flavonoides.**
- **Taninos.**
- **Saponinas.**
- **Fibra.**
- **Minerales:** potasio y calcio.
- **Ácidos:** cafeico y rosmarínico.

- **Vitaminas:** vitamina E, tiamina y vitamina A (β -carotenos).

En estudios antimicrobianos se ha demostrado que el extracto acuoso de las hojas es activo contra bacterias Gram positivas, Gram negativas e inactiva contra *Candida albicans*; el extracto etanólico no inhibe *Streptococcus pyogenes* ni *S. aureus* (Alvarado *et al.*, 2003):



Figura 5. *Ocimum basilicum*, L.

Las plantas y especias se utilizan en el ámbito de la restauración con el objetivo de inducir cambios en el aroma, sabor y/o color de las comidas; sin embargo, también se utilizan tradicionalmente para aumentar la vida útil de los alimentos por sus propiedades antioxidantes, antifúngicas o antimicrobianas (Madhavi *et al.*, 2019). Prueba de ello son los marinados, adobados escabechados y otras técnicas culinarias muy antiguas donde las hierbas aromáticas son un aporte importante de la receta culinaria, no solo por sus propiedades saborizantes y aromáticas sino también por sus propiedades conservadoras ayudando a aumentar la vida útil del alimento condimentado.

Como ya se ha expuesto, el empleo en la cocina de las plantas aromáticas como conservadores se debe a la existencia en la composición de los aceites esenciales de sustancias con actividad antimicrobiana; por ejemplo, el carvacrol en el orégano, el eugenol en el clavo y el timol en el tomillo y el orégano. No obstante, la actividad antimicrobiana de estos componentes se ve comprometida por factores como la estructura de estas moléculas, composición y grupos funcionales, ya que la mayoría de estos constituyentes son de origen fenólico; por ello, la luz, las radiaciones ultravioleta, las altas temperaturas y el oxígeno, entre otros factores, pueden desencadenar reacciones de oxidación que conllevarían una destrucción de todos estos compuestos fenólicos y la pérdida de sus propiedades antisépticas y aromáticas (Draughon, 2004). Los ácidos fenólicos y los aldehídos fenólicos, tales como el aldehído cinámico, el ácido vainillínico o el gálico, entre otros, tienen propiedades antioxidantes, lo que permite adicionarlos a alimentos frescos como carnes y pescados para preservarlos durante más tiempo y en las condiciones más adecuadas (Lung *et al.*, 2011).

1.2. Aceites esenciales de plantas aromáticas y su función antimicrobiana

Las **Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs)** son definidas como “*enfermedades de carácter infeccioso o tóxico que son causadas por el consumo intencional, accidental o incidentales de alimentos o agua contaminadas en cantidades suficientes con agentes químicos o microbiológicos*” (Orberá, 2004). Por ello, el *Reglamento (CE) n.º 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos y por el que se modifican el Reglamento (CEE) n.º 1601/91 del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 2232/96 y (CE) n.º 110/2008 y la Directiva 2000/13/CE* expone que las plantas aromáticas de uso culinario, como productos agrícolas que son, se cultiven, recolecten y traten de forma que se garantice que estén libre de microorganismos patógenos a unos niveles que resulten peligrosos para la salud de los consumidores [(Reglamento (CE) n.º 1334/2008, de 16 de diciembre)].

Como hemos descrito anteriormente, los aceites esenciales de plantas aromáticas han demostrado tener cierta capacidad antimicrobiana y antioxidante, lo que permite aumentar la vida útil del producto y garantizar su calidad microbiológica, minimizando o eliminando la presencia de microorganismos y reduciendo la oxidación lipídica. Estos aceites se han considerado como una alternativa para reducir o sustituir el uso de aditivos conservadores sintéticos que están asociados con diversos efectos adversos para la salud humana (Ribeiro-Santos *et al.*, 2018). La actividad antioxidante de las plantas aromáticas se debe a su contenido en terpenoides, flavonoides, saponinas y polifenoles entre otros compuestos (Embuscado, 2015).

En la actualidad, existe una creciente presión por parte de los consumidores para reemplazar los agentes antimicrobianos sintetizados químicamente por alternativas naturales para garantizar la seguridad alimentaria (Xu *et al.*, 2007).

La aparente eficacia antimicrobiana de los antimicrobianos de origen vegetal depende de factores tales como (Tajkarimi *et al.*, 2010):

- **Método de extracción de aceites esenciales del material vegetal.**
- **Volumen del inóculo.**
- **Fase de crecimiento.**
- **Medio de cultivo utilizado.**
- **Propiedades intrínsecas o extrínsecas de los alimentos:** pH, grasa, proteínas, contenido de agua, antioxidantes, conservantes, tiempo/temperatura de incubación, procedimiento de envasado y estructura física de los alimentos.

Los aceites esenciales y sus componentes presentan una característica fundamental, la hidrofobicidad, que les permite dividirse con los lípidos de la membrana celular bacteriana y las mitocondrias, perturbando las estructuras celulares para hacerlas más permeables. La fuga extensa de moléculas e iones críticos de las células bacterianas conducirá a la muerte (Solórzano-Santos *et al.*, 2012). Por todo esto, la mayoría de los aceites esenciales exhiben una capacidad inhibitoria considerable contra los microorganismos patógenos. Algunos aceites esenciales podrían actuar como biopreservantes al reducir o eliminar las bacterias patógenas y aumentar la calidad general de los productos alimenticios (Solórzano-Santos *et al.*, 2012).

Toda sustancia que presente un poder inhibitorio en el crecimiento microbiano presentará una actividad antimicrobiana, incluyendo las acciones bacteriostáticas, bactericidas y fungistáticas (Hirasa, 2002).

Los términos utilizados en la búsqueda de la actividad antibacteriana son:

- **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano.

- **Concentración mínima bactericida (CMB):** concentración mínima de antimicrobiano capaz de matar un 99,9 % de la población bacteriana inicial. Refleja la posible actividad bactericida del antimicrobiano.

- **Concentración bacteriostática:** concentración mínima a la cual la bacteria no crece en caldo, pero se cultiva cuando se coloca el caldo en agar (Smith-Palmer *et al.*, 1998).

- **Concentración bactericida:** concentración mínima a la cual la bacteria no crece en caldo, pero no se cultiva cuando se coloca el caldo en agar (Smith-Palmer *et al.*, 1998).

Los compuestos volátiles de un aceite esencial se forman y acumulan en distintas partes de la planta, siendo el fenol una de las moléculas más frecuentes en estos aceites y presentando acción bacteriostática a concentraciones de 1:500 a 1:800, y bactericida y fungicida a concentraciones de 1:50 a 1:100 (Cano *et al.*, 2007).

Algunos ejemplos, tal como hemos citado anteriormente, son (Hirasa, 2002):

- **Tomillo:** se utiliza como antiséptico, siendo su principio activo un aceite esencial rico en monoterpenos y esteroides terpénicos, entre otros.

- **Romero:** es una planta con un aceite esencial rico en monoterpenos, flavonoides, taninos y ácidos fenólicos (ácido rosmarínico), de ahí su capacidad antiséptica.

- **Orégano:** es una planta antiséptica, su aceite esencial es efectivo contra hongos imperfectos (*Deuteromycetes*) y bacterias Gram positivas y Gram negativas (éstas últimas son, por lo general, más resistentes ya que cuentan con una membrana externa, la cual es una estructura impermeable).

- **Clavo:** su aceite esencial es altamente eficaz frente a *S. aureus* y *E. coli*.

- **Albahaca:** su aceite esencial es rico en estragol, eugenol, linalol, cineol y otros componentes volátiles.

Según un estudio realizado con 21 aceites esenciales de plantas aromáticas, se ha demostrado que algunos tienen actividad anti-quorum sensing (anti-QS), entendiendo por “*quorum sensing*” la capacidad que tienen las bacterias de coordinarse y comunicarse mediante la secreción de sustancias químicas de señalización denominadas inductores (Tortora *et al.*, 2007). De los 21 aceites esenciales, cuatro mostraron diferentes niveles de actividad anti-QS. El aceite del clavo demostró la actividad anti-QS más prometedora, seguida por la actividad de los aceites de canela, lavanda y menta (Khan *et al.*, 2009).

1.3. Plantas aromáticas como vehículo de peligros microbianos

1.3.1. Principales microorganismos presentes en las plantas aromáticas de uso culinario e industrial

Las especias son sustancias vegetales que se usan en pequeñas cantidades para proporcionar sabor fuerte, picante o excitante a las comidas. Proceden de raíces aromáticas secas, cortezas, brotes, semillas, bayas y demás frutos.

Como hemos expuesto anteriormente, la legislación española define las **especias** o **condimentos aromáticos** como “*plantas o partes de las mismas, frescas o desecadas, enteras, troceadas o molidas, que por su color, aroma o sabor característicos se destinan a la preparación de alimentos y bebidas, con el fin de incorporarles estas características, haciéndoles más apetecibles y sabrosos y, en consecuencia, consiguiendo un mejor aprovechamiento de los mismos*”. Además, también contempla los **condimentos preparados** o **sazonadores**, que los define como “*el producto obtenido por la simple mezcla de varias especias o condimentos entre sí, y/o con otras sustancias alimenticias, autorizadas específicamente por esta Reglamentación*” (Real Decreto 2242/1984, de 26 de septiembre).

La mayoría de hierbas y especias de uso culinario todavía se cultivan siguiendo métodos tradicionales, por lo que están expuestas a una mayor probabilidad de contaminación microbiana. Se han presentado varios brotes de enfermedades asociadas con el consumo de especias y condimentos, la mayoría causados por *Salmonella* spp. y *Bacillus cereus*, y que han generado alarma acerca de la inocuidad de las especias y hierbas aromáticas desecadas.

Por ello, la *Asociación Europea para las Especies (European Spice Association)* y el *Reglamento (CE) n.º 1334/2008 del Parlamento Europeo y el Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos* han elaborado un documento destinado a garantizar que las plantas aromáticas de uso culinario, como productos agrícolas que son, se cultiven, recolecten y traten de forma que se garantice que estén exentas de microorganismos patógenos a unos niveles que resulten peligrosos para la salud de los consumidores [(Reglamento (CE) n.º 1334/2008, de 16 de diciembre; European Spice Association, 2011)].

Una de las causas comunes de enfermedades y muertes producidas en los países desarrollados provienen de intoxicaciones alimentarias (Sapkota *et al.*, 2012). Las enfermedades de transmisión alimentaria están causadas por una gama amplia de patógenos en las que merece especial atención las causadas por *L. monocytogenes*, que es una bacteria Gram positiva que se encuentra comúnmente en medios como el suelo, el agua, las plantas, las aguas residuales y los alimentos (Farber *et al.*, 1991), siendo el agente causal de la listeriosis. Se trata de una infección transmitida por alimentos, una enfermedad difícil de contraer pero letal si es adquirida y no se trata a tiempo (Gandhi *et al.*, 2007). En la industria alimentaria, con el tiempo, se ha ido teniendo noción de la capacidad que ha desarrollado *L. monocytogenes* para crecer a temperaturas de refrigeración, de tolerar la presencia de sales, de permanecer viable a un pH bajo y, más preocupante aún, frente a la adición de algunos conservantes químicos. El nuevo auge de productos alimenticios mínimamente procesados con aditivos sintéticos, y el interés creciente del consumidor en ellos, ha llevado a la industria a buscar preservarlos con alternativas precursoras de conservantes naturales (Nieto *et al.*, 2010) y la demanda en los últimos años va en aumento dado que los consumidores tienen un mayor acceso a estos productos, convirtiendo la industria de las hierbas y también de las especias en multimillonaria. Desde tiempo atrás, se viene utilizando ampliamente los extractos de hierbas aromáticas como agentes inhibidores del crecimiento de patógenos; es por ello, que se utilizan los extractos de plantas (hierbas aromáticas) como agentes antimicrobianos en la conservación de alimentos como alternativa a los conservadores químicos sintéticos (Hara-Kudo *et al.*, 2004; Nasar-Abbas *et al.*, 2004).

Los patógenos que son psicrotróficos (como *Aeromonas hydrophilla*, *L. monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*) y las bacterias causantes de la descomposición (como *Pseudomonas fluorescens* y especies de *Enterobacteriaceae*) son las principales preocupaciones microbianas (Beuchat, 2002).

La contaminación de hierbas aromáticas y especias con bacterias patógenas se atribuye, en parte, a las condiciones de crecimiento y al medio ambiente en que éstas se encuentran, las prácticas de saneamiento e higiene entre los trabajadores de la cosecha y postcosecha, y la falta de buenas prácticas agrícolas en general y hasta de industrialización en algunos países en desarrollo. Las cargas bacterianas en las especias no tratadas son altas, comprendidas entre 10^4 y 10^7 UFC/g.

En las plantas hay microorganismos relacionados con enfermedades de transmisión alimentaria que se pueden encontrar de forma esporádica o habitual:

- **De forma esporádica:** bacterias patógenas como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Shigella* spp., *S. aureus* y *E. coli*. Algunos autores han evaluado algunos aceites esenciales de origen vegetal (cinamaldehído y carvacrol) en hierbas frescas (albahaca, cilantro, eneldo, perejil y estragón) por su actividad microbiana sobre *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 (Patel *et al.*, 2018).

- **De forma habitual:** *Bacillus subtilis*, *B. cereus* y *Clostridium perfringens* (10^3 UFC/g). Si bien su concentración no es susceptible de generar patologías, hay que tener en cuenta la facilidad de estas especies de producir esporas (las de *Bacillus* se encuentran habitualmente en los rizomas de la planta). Las esporas resisten tratamientos térmicos (por ejemplo, la cocción) llegando a germinar posteriormente y alcanzando valores de hasta 10^6 UFC/g de alimento durante el segundo almacenamiento. Es precisamente a estas concentraciones cuando ya pueden resultar peligrosas; de hecho, se estima que una concentración de 10^4 esporas o células por gramo de alimento puede suponer un riesgo para la salud en el caso de *B. cereus*. Para *C. perfringens*, la ingestión de grandes cantidades de células vegetativas (valores superiores a 10^8 UFC/g de alimento) se asocia con la producción de toxinas en el tracto digestivo.

La Agencia Británica de Protección para la Salud (*Health Protection Agency*, HPA) ha identificado contaminación por *Salmonella* en varias hierbas frescas (Elviss *et al.*, 2009). Más del 13 % de estos productos procedentes de países ajenos a la UE examinados en las inspecciones fronterizas en Londres durante 2005 estaban contaminados por *Salmonella* spp. Estos hallazgos indicaban que las hierbas frescas podían ser una potencial fuente de contaminación microbiana en el Reino Unido, especialmente cuando eran utilizadas como alimentos listos para su consumo. Un nuevo estudio realizado por esta Agencia, sobre muestras de diferentes hierbas aromáticas frescas listas para su consumo, demuestra la presencia en el 4 % de ellas de *Salmonella* y *E. coli* en niveles superiores a los permitidos, de modo que incumplen los criterios microbiológicos establecidos para este tipo de alimentos y, por lo tanto, no son aptas para el consumo. Estos datos muestran la necesidad de aplicar buenas prácticas higiénicas desde el cultivo, procesado y venta hasta su uso, con el objeto de prevenir las contaminaciones cruzadas y el crecimiento bacteriano.

La presencia o ausencia de los dos microorganismos fueron establecidas de acuerdo con los *Métodos Microbiológicos Estándar* (*UK Standards for Microbiology Investigations*, UK SMIs), en los que intervinieron 30 laboratorios oficiales de control de alimentos del Reino Unido. Según los resultados del estudio, y aunque la mayoría de las muestras fueron consideradas (desde el punto de vista microbiológico) satisfactorias o admisibles, *Salmonella* spp. fue detectada en 18 de las 3.760 muestras de hierbas frescas listas para su consumo (0,5 %), de venta a granel, en manojos, empaquetadas o en tuestos procedentes de diferentes tipos de establecimientos (supermercados, mercados, verdulerías o tiendas de delicatessen) recogidas del 1 de mayo al 31 de octubre de 2007 (Elviss *et al.*, 2009). En cuanto a *E. coli*, esta enterobacteria es indicadora de contaminación fecal, muy común en el medio ambiente (agua o tierra), por lo que hortalizas y verduras (incluidas hierbas frescas) pueden contaminarse muy fácilmente. Por todo ello, los niveles de esta bacteria en verduras listas para su consumo en crudo deben mantenerse al mínimo. El 1,45 % de las muestras contenían *E. coli* en cantidades mayores a 1.000 UFC/g, excediendo los criterios higiénicos establecidos por la normativa europea. De todas las muestras analizadas, un 6,7 % contenían *E. coli* y, de ellas, un 3,6 % lo hacían en cantidades iguales o mayores a 100 UFC/g.

El estudio también demuestra cómo almacenar las hierbas frescas a una temperatura por debajo de 8 °C inhibe el crecimiento bacteriano (Elviss *et al.*, 2009). El 85 % de las hierbas frescas envasadas incluían en su etiqueta la recomendación “*lavar antes de su uso*”, aunque el lavado y descontaminación eficaz de verduras listas para su consumo es complicado de conseguir. El lavado con agua potable puede reducir la carga microbiana y los diferentes agentes desinfectantes disponibles en el mercado tienen un efecto variable, aunque en ningún caso aseguran la total eliminación de patógenos en el producto. La reducción del riesgo de toxiinfección alimentaria asociada al consumo de alimentos frescos como las hierbas no puede en ningún caso recaer sobre el consumidor final sino que debe ser la consecuencia de un programa de control de todos los puntos de potencial contaminación, desde el campo de cultivo, la recolección, el procesado y la distribución del producto.

Por otro lado, la *Food and Drug Administration* (FDA), entre los años 1973 y 2010, ha reportado 14 brotes de enfermedad atribuidos al consumo de especias contaminadas con patógenos. Los países que han reportado estos brotes fueron Canadá, Dinamarca, Francia, Alemania, Nueva Zelanda, Noruega, Serbia, Reino Unido y EE.UU. A consecuencia de estos brotes, 1.946 personas enfermaron, 128 fueron hospitalizadas y dos murieron. La población más afectada fueron los niños, ya que la mayoría de las especias contaminadas se encontraron en alimentos listos para el consumo. Las principales especias involucradas en estos brotes fueron: pimienta negra, pimienta blanca, paprika, cúrcuma, curry, semillas de anís, semillas de hinojo y mezcla de especias para sazonar. En el año 2017, una actualización de este reporte, demostró que la prevalencia de *Salmonella* en 9 de los 11 tipos de especias al por menor en los EEUU fue significativamente menor que la de los envíos de especias en la importación. Las conclusiones del estudio se basaron en más de 7.000 muestras de venta al por menor de 11 tipos de especias diferentes que se recogieron entre noviembre de 2013 y septiembre de 2014 y entre octubre de 2014 y marzo de 2015 (Food and Drug Administration, 2017).

La FDA ha presentado un análisis detallado de los contaminantes más comunes encontrados en las especias:

- **Materia extraña:** las especias presentan cierta suciedad natural derivada del proceso de cultivo y producción. La FDA establece límites máximos permisibles, que son valores de referencia, es decir, si se sobrepasan estos valores se puede considerar el producto como adulterado (Food and Drug Administration, 2018):

Tabla 1. Manual de niveles de defectos. Niveles de acción de los defectos alimentarios. Niveles de defectos naturales o inevitables en los alimentos que no presentan riesgos para la salud de los seres humanos (FDA)

PRODUCTO	DEFECTO	ORIGEN DEL DEFECTO	NIVEL MÁXIMO PERMISIBLE
Todo tipo de especias (molidas)	Restos de insectos	Infestación de insectos durante pre o post cosecha y proceso	30 fragmentos de insectos en 10 gramos
	Restos de roedor	Postcosecha y/o contaminación del proceso con pelo de animal o excretas	1 pelo de roedor en 10 gramos
Todo tipo de especias (enteras)	Moho	Contaminación pre y postcosecha	5 % de las piezas por peso se ven mohosas

Fuente: Food and Drug Administration (FDA). Food Defect Levels Handbook, 2018

- **Microorganismos:** erróneamente se cree que por las características de las especias, sobre todo por su carencia de humedad, difícilmente las bacterias pueden estar presentes y/o sobrevivir. Sin embargo, muchas bacterias patógenas tienen la capacidad de prevalecer viables en ambientes secos, y activarse en contacto con la humedad o con un medio más propicio. Se ha detectado una gran cantidad de microorganismos en especias; algunos ejemplos se detallan a continuación (Food and Drug Administration, 2018):

- **Salmonella spp.:** semillas de alfalfa, pimienta inglesa, semillas de anís, albahaca, hoja de laurel, pimienta negra, pimienta, cardamomo, canela, cilantro, comino, orégano, perejil, salvia, tomillo, etc.
- **Bacillus spp.:** pimienta inglesa, albahaca, hoja de laurel, pimienta negra, pimienta, canela, comino, clavo, cilantro, eneldo, orégano, romero, tomillo, etc.
- **C. perfringens:** semillas de anís, hoja de laurel, comino negro, pimienta negra, pimienta, cilantro, comino, ajo, orégano, perejil, etc.
- **Cronobacter spp.:** anís, romero.
- **Shigella:** hoja de laurel.
- **S. aureus:** pimienta negra, pimienta, cardamomo, canela, ajo, etc.

De estos géneros de bacterias, es de *Salmonella* de la que más serotipos se han identificado. La inocuidad de los productos que contienen hierbas y especias aromáticas desecadas depende de mantener buenas prácticas de higiene a todo lo largo de la cadena alimentaria, durante su producción primaria, elaboración, envasado, venta al detalle y en el punto de consumo.

Los microorganismos objeto de nuestro estudio son los siguientes:

- ***Listeria monocytogenes***: el género *Listeria* pertenece a la subrama de *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix* (Doyle *et al.*, 2001).

A principios de 1891, *Listeria* pudo ser reconocida en muestras de tejido de pacientes alemanes; se aisló del hígado de conejos en 1911 en Suecia. Los síntomas de la enfermedad fueron reconocidos en ovejas en Alemania en 1925 (Gray *et al.*, 1966; McCarthy, 1990). En 1926, investigadores (Murray *et al.*, 1926) describieron por primera vez *L. monocytogenes* tras una investigación sobre el agente causante de una enfermedad epizoótica en conejos y cobayas (aisló la bacteria de la sangre de animales infectados que mostraban síntomas de mononucleosis, por lo que llamó al organismo *Bacterium monocytogenes*). En 1927, Pirie denominó al mismo organismo *Listerella hepatolytica* basándose en las marcas del hígado de roedores infectados en Sudáfrica y en honor al cirujano Lord Lister (Seeliger, 1961). Una vez que habían aislado el mismo organismo, el nombre se cambió por el de *Listerella monocytogenes*. Finalmente, en 1940, Pirie propuso el nombre de *Listeria* (Pirie, 1940).

En el género *Listeria* sólo son consideradas virulentas las especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, con respecto a la dosis letal del 50 % en ratones y a la capacidad para crecer en bazo y en hígado de ratón. Solamente una especie, *L. monocytogenes*, representa una preocupación de salud pública. El aumento del análisis de alimentos desde 1986 ha conducido al estudio de numerosas cepas aisladas en todo el mundo y al descubrimiento de métodos que ahorran tiempo basados en pruebas bioquímicas que han sido comercializadas (Doyle *et al.*, 2001).

Morfológicamente, *Listeria* son pequeños bacilos Gram positivos que miden aproximadamente 0,4-0,5 µm de diámetro por 0,5-2,0 µm de longitud. Los miembros de esta especie no forman esporas, son aerobios, microaerófilos y anaerobios facultativos, con características tanto psicrótrofas como mesófilas. Son móviles por medio de flagelos peritricos cuando se cultivan a 20-25 °C, pero muestran poco o ningún movimiento cuando se cultivan a 37 °C. Son catalasa positiva (la mayoría de las cepas) y oxidasa negativa; pueden catabolizar la glucosa tanto de forma aeróbica como anaeróbicamente por la vía de Embden-Meyerhoff (Weinsetel, 2006).

Las cepas de *L. monocytogenes* pueden diferenciarse mediante la tipificación serológica. Las cepas difieren en los determinantes antigénicos que se expresan en su superficie celular; se han designado más de 14 serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4bX, 4c, 4d, 5, 6a, 6b) (Graves *et al.*, 1999). Aunque *L. monocytogenes* se encuentra ampliamente en la naturaleza, sólo tres serotipos (1/2a, 1/2b y 4b) son responsables de aproximadamente el 96 % de las infecciones humanas documentadas en los EE.UU (Tappero *et al.*, 1995).

Crece a temperaturas comprendidas entre -0,4 y 50 °C, con una temperatura óptima comprendida entre 30 y 37 °C. Su pH óptimo oscila entre 6 y 8 y tiene cierta tolerancia a los ambientes salinos (puede crecer lentamente en un caldo nutritivo que contenga hasta un 10 % de NaCl) (Weinsetel, 2006).

La amplia distribución de este microorganismo se debe a:

- **A pesar de no formar esporas, es capaz de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en muchos medios diferentes.**
- **Es un organismo psicrotrofo.**

Por consiguiente, el alimento se puede contaminar en cualquier eslabón de la cadena alimentaria, y el almacenaje en frío no inhibe el crecimiento de este microorganismo.

Existen multitud de factores que han contribuido al desarrollo de *L. monocytogenes* como patógeno transmitido por los alimentos (Weinsetel, 2006):

- **Aumento del uso de la refrigeración para conservar alimentos durante largos periodos de tiempo:** si bien la mayoría de los organismos pueden ser inhibidos por temperaturas de refrigeración, este tipo de almacenamiento proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento y la supervivencia de *L. monocytogenes*.
- **Cambios en la población:** aumento del número de personas mayores y de individuos inmunodeprimidos, todos ellos con gran susceptibilidad para contraer la listeriosis.
- **Aumento del consumo de alimentos listos para el consumo (ready-to-eat, RTE):** el aumento del consumo de este tipo de productos, que no requieren un paso adicional de cocción, está aumentando.
- **Cambios sociales:** por ejemplo, los hogares con un solo cabeza de familia. Esto provoca que haya menos tiempo para preparar los alimentos.

Durante la última década, la listeriosis ha aparecido como una de las principales enfermedades de origen alimentario. Sin embargo, no es una enfermedad nueva, como lo son el SIDA o la legionelosis; el primer caso humano descrito se presentó en un soldado de la Primera Guerra Mundial que padecía meningitis. Desde aquella época hasta 1950 fueron denunciados unos cuantos casos humanos; en la actualidad, son denunciados cientos de casos todos los años (Doyle *et al.*, 2001). En este sentido, en la década de los 80, varios brotes alimentarios se relacionaron positivamente con el consumo de queso y verduras crudas contaminadas con *L. monocytogenes*. Si bien estos brotes suponen la primera evidencia documentada de transmisión alimentaria de la listeriosis, la historia de esta enfermedad se remonta a cuando se aisló por primera vez este patógeno (Weinsetel, 2006). Así, por ejemplo, se sospecha que un brote en Alemania entre 1949 y 1957 fue causado por *L. monocytogenes* en la leche cruda, pero las dificultades para aislar el organismo de los alimentos y las fuentes ambientales impidieron la identificación concluyente del patógeno en la leche (Ryser, 1999). El primer brote documentado de listeriosis se produjo en Canadá en 1981 (Wesley *et al.*, 1991). El alimento implicado en el brote era una ensalada de col producida localmente y elaborada con coles inadecuadamente desinfectadas (en este brote 41 personas enfermaron y 18 murieron).

El mayor brote de listeriosis en EE.UU se produjo en 1985 en California, donde queso fresco de estilo mexicano se elaboró con una mezcla de leche pasteurizada y sin pasteurizar. Se detectaron 142 casos en un periodo de 8 meses, con una tasa de letalidad de aproximadamente el 30 % (Linnan *et al.*, 1988). En 1998 se produjo un brote en varios Estados relacionado con perritos calientes contaminados. El brote causó la enfermedad en 108 personas residentes en 24 Estados y causó 14 muertes y 4 mortinatos (Graves *et al.*, 2005). En 2000 y 2002, se produjeron 2 brotes multiestatales relacionados con carne de pavo de charcutería contaminada. El primer brote afectó a 10 Estados con 29 casos, 4 muertes y 3 abortos espontáneos o mortinatos; el segundo brote afectó a 8 Estados con 46 casos, 7 muertes y 3 abortos espontáneos o mortinatos (Centers for Disease Control and Prevention, 2000; Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

En Canadá, en 2002, 2 casos de meningitis por *L. monocytogenes* condujeron a la retirada de queso potencialmente contaminado; se identificaron un total de 47 casos de listeriosis humana, incluidos 2 casos de bacteriemia en el embarazo asociada a un aborto espontáneo (Pagotto *et al.*, 2006).

En Europa también se han producido varios brotes importantes de listeriosis: en Francia, en 1992, la lengua de cerdo en gelatina fue el alimento implicado en un brote en el que 279 personas enfermaron y 85 murieron; en Italia, en 1997, más de 1.500 personas enfermaron tras consumir ensalada de maíz contaminada. En el Reino Unido, en 2003, un brote de listeriosis se relacionó con el consumo de sándwiches preenvasados comprados en la tienda de un hospital. Las muestras de sándwiches tomadas del proveedor local de sándwiches dieron positivo para *L. monocytogenes*, al igual que muestras tomadas del local (tablas de cortar, fregadero y esponja de limpieza) (Dawson *et al.*, 2006). En 2018, 16 Estados Miembros proporcionaron datos de investigaciones de *L. monocytogenes* en 1.257 unidades de frutas y verduras listas para el consumo. La incidencia global fue del 1,8 % (0,6 % en 1.773 unidades analizadas en 2017). Alemania presentó, en comparación con 2017, un mayor número de muestras analizadas de frutas y hortalizas listas para el consumo más variadas (European Food Safety Authority, 2019). En cuanto a las ensaladas listas para el consumo, 12 Estados Miembros comunicaron datos sobre 2.583 unidades analizadas. En general, el 1,5 % de las unidades analizadas se notificaron como positivas. Un Estado miembro (Alemania) representaba el 75 % de las muestras analizadas.

En cuanto a las "salsas y aderezos", sólo 5 Estados miembros comunicaron información sobre 220 unidades analizadas y no se detectó *L. monocytogenes* en estas muestras. Para hierbas y especias se analizaron 121 muestras y ninguna resultó positiva (European Food Safety Authority, 2019).

En España, la listeriosis se incluye entre las enfermedades de declaración obligatoria en España a partir de la *Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional* (Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo). Es una de las enfermedades que se notifican a la *Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica* (RENAVE), que se coordina desde el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social y que está gestionada por el *Centro Nacional de Epidemiología* (CNE) del *Instituto de Salud Carlos III* (ISCIII). Por ello, desde el año 2015 se dispone de información de esta enfermedad declarada por las comunidades autónomas, que notifican de forma individualizada los casos probables y confirmados de listeriosis al CNE a través de la RENAVE.

En el periodo 2015 a 2018 quince comunidades y ciudades autónomas notificaron a la RENAVE 1.369 casos confirmados, por lo que se están registrando en torno a 300-400 casos anuales. En Andalucía se han notificado de media 65 casos anuales. En 2018, se notificaron 432 casos. Su presentación habitual es en forma de casos esporádicos o de pequeños brotes intrafamiliares. En concreto, hay ocho brotes notificados al CNE desde 2015, con dos o tres casos por brote, y suelen ser agrupamientos por transmisión vertical, de madre a recién nacido (seis brotes) o pequeños brotes familiares por alimentos (dos brotes). La edad media de los casos notificados a la RENAVE durante estos años está alrededor de los 65-70 años y se han producido 124 defunciones, lo que supone una letalidad de alrededor del 9 %. En general la letalidad aumenta con la edad. El viernes 16 de agosto de 2019, el *Servicio de Vigilancia y Salud Laboral* de la Comunidad Autónoma de Andalucía notificó al *Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias* (CCAES) del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social un brote de toxiinfección alimentaria por *L. monocytogenes* en esa Comunidad Autónoma, asociado al consumo de carne mechada industrial de la marca “*La Mechá*” elaborada por la empresa Magrudis S.L, situada en el municipio de Sevilla. En España la última notificación de alerta conocida ha tenido lugar el 12 de diciembre de 2021. Dicha notificación ha sido trasladada por las autoridades sanitarias de Rumanía por la presencia de *L. monocytogenes* en snacks de cerdo “*Urechi Snacks*” elaborados por la empresa Marcel.

La listeriosis es una enfermedad de origen alimentario atípica de interés principal para la salud pública a causa de la gravedad y el carácter no entérico de la enfermedad (meningitis, septicemia, aborto), la proporción elevada de muerte de casos (en torno al 20-30 % de los casos), un tiempo de incubación frecuentemente largo (se ha informado de que las personas con listeriosis desarrollan síntomas entre 1 y 70 días después de consumir alimentos contaminados con este microorganismo), y una predilección por individuos que tienen enfermedades subyacentes que conducen al deterioro de la inmunidad mediada por células T. *L. monocytogenes* es un microorganismo muy diferente del resto de patógenos transmitidos por alimentos, ya que es omnipresente, resistente a condiciones ambientales diversas (pH bajo y las concentraciones elevadas de NaCl) y es microaeróbica y psicrotrófica (Doyle *et al.*, 2001).

Las distintas formas mediante las cuales el microorganismo es capaz de entrar en las plantas de tratamiento de alimentos, su capacidad para sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en el ambiente (tierra, plantas y agua), y su capacidad para crecer a temperaturas muy bajas (de 2 a 4 °C) y sobrevivir en el interior o en la superficie del alimento durante períodos prolongados en condiciones adversas, han supuesto que *L. monocytogenes* constituya una preocupación principal en la industria agroalimentaria durante la última década (Doyle *et al.*, 2001).

Se encuentra en una gran variedad de alimentos tanto frescos como tratados. Durante el almacenaje, es capaz de sobrevivir y crecer en muchas materias primas alimenticias. Una investigación del Servicio de Laboratorio de Salud Pública, Londres, Inglaterra, indicó que el 6 % de 18.000 muestras de alimentos estaba contaminado con *L. monocytogenes* y que el 5 % de las muestras positivas contenía más de 1.000 UFC/g. En otra investigación, el 11 % de las muestras de alimentos de los frigoríficos de enfermos que padecían listeriosis en los EEUU fue positivo a *L. monocytogenes*, y el 10 % de las muestras positivas contenían más de 100 UFC/g (Doyle *et al.*, 2001).

En el caso de las hortalizas frescas, este microorganismo se halla presente con frecuencia en hortalizas frescas (rábanos, pepinos, col, patatas), pero generalmente en cifras bajas. A diferencia de las hortalizas para ensalada de acidez baja, los tomates y las zanahorias no son un sustrato adecuado para el crecimiento de *L. monocytogenes*. Los orígenes de la contaminación incluyen la tierra, el agua, el estiércol de los animales, la vegetación en putrefacción, y los efluentes de aguas residuales de las plantas en tratamiento (Doyle *et al.*, 2001).

Existen agentes vegetales que han demostrado poseer actividad antimicrobiana, tales como la **albahaca** (Elgayyar *et al.*, 2001; Bagamboula *et al.*, 2004), **comino negro** (De *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2003), **canela** (Bara *et al.*, 1995; De *et al.*, 1999; Suhr *et al.*, 2003), **clavo** (Bara *et al.*, 1995; Arora *et al.*, 1999; De *et al.*, 1999), **ajo** (Arora *et al.*, 1999; De *et al.*, 1999), **mostaza** (Meena *et al.*, 1994; Suhr *et al.*, 2003), **orégano** (Bara *et al.*, 1995; Baratta *et al.*, 1998; Elgayyar *et al.*, 2001; Özkan *et al.*, 2003; Baydar *et al.*, 2004), **romero** (Bara *et al.*, 1995; Baratta *et al.*, 1998) y **tomillo** (Özkan *et al.*, 2003; Suhr *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004). Un gran número de estos estudios se realizan con aceites esenciales o extractos de los productos vegetales.

La actividad de muchos productos vegetales contra los organismos patógenos ha sido ampliamente en medios microbiológicos. Sin embargo, sólo un pequeño número de esos antimicrobianos han sido probados en los alimentos. La presencia de lípidos, agentes tensioactivos y proteínas en los sistemas alimentarios ha demostrado que reduce la actividad antibacteriana de algunos extractos vegetales (Cutter, 2000; Del Campo *et al.*, 2000). Si hay que utilizar cantidades o concentraciones elevadas de extractos vegetales para contrarrestar la acción de esas sustancias, se producirán cambios perjudiciales en el sabor y otros atributos (sensoriales) de los productos alimentarios (Badei *et al.*, 2002).

La investigación para demostrar la eficacia y la posible aplicación de los extractos de plantas en alimentos sigue aumentando. Algunos autores (Larson *et al.*, 1996) demostraron que los extractos de lúpulo podían inhibir *L. monocytogenes* en medios de cultivo y en determinados alimentos, concluyendo que estos extractos funcionarían mejor en alimentos mínimamente procesados y con bajo contenido en grasa.

Se examinó la actividad de la canela en polvo contra *L. monocytogenes* en la carne y queso. Cuando los alimentos se mantuvieron a 30 °C, el 6 % de canela redujo el organismo en 1-2 logs en comparación con los controles no tratados (Menon *et al.*, 2002). Otros autores (Yin *et al.*, 2003) demostraron que dos compuestos organosulfurados derivados del ajo redujeron significativamente los aerobios totales e inhibieron el crecimiento de *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Campylobacter jejuni* en la carne picada. En otro estudio, las poblaciones de *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* se redujeron en 1,08, 1,24 y 1,33 log UFC/g, respectivamente, en carne picada cruda tratada con 1 % de pycnogenol (extracto de corteza de pino), 1 % ActiVin (extracto de semilla de uva), o 1 % de oleorresina (de romero) después de 9 días de almacenamiento refrigerado (Ahn *et al.*, 2004).

El extracto de clavo (eugenol) redujo *L. monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* en 1,4 y 2,5 log, respectivamente, en la carne de pechuga de pollo sin piel refrigerada después de 4 días a 5 °C (Hao *et al.*, 1998).

El extracto de pimienta redujo *L. monocytogenes* y *A. hydrophila* en 1,3 y 1,2 respectivamente, en rodajas de carne de vacuno cocida refrigerada después de 4 días (Hao *et al.*, 1998).

Algunos autores (Tsigarida *et al.*, 2000) demostraron que el aceite esencial de orégano al 0,8 % redujo la población bacteriana inicial incluyendo las bacterias del ácido láctico y *L. monocytogenes*, en 2 a 3 log UFC/g en filetes de carne de vacuno naturalmente contaminados almacenados a 5 °C, independientemente del ambiente gaseoso utilizado para envasar la carne.

Aunque se ha demostrado que algunos aceites esenciales poseen una buena actividad antimicrobiana, las altas concentraciones necesarias para obtener la inhibición en ciertos alimentos (Bagamboula *et al.*, 2004) podrían reducir su aceptabilidad sensorial. Para superar este obstáculo, algunos investigadores han encapsulado los compuestos en micelas de tensioactivos. El aumento de la solubilidad de un aceite esencial gracias al tensioactivo, podría mejorar la interacción entre el compuesto activo y el microorganismo. Un estudio realizado por algunos autores (Gaysinsky *et al.*, 2005) demostró que las micelas de concentraciones muy bajas de eugenol y carvacrol (0,15 % y 0,025 %, respectivamente) encapsuladas con un 1 % de tensioactivo fueron suficientes para inhibir el crecimiento de cuatro cepas de *E. coli* y tres cepas de *L. monocytogenes* en un sistema acuoso. Por lo tanto, el uso de un tensioactivo como el Lauril Sulfato Sódico (SLS) podría mejorar la actividad antimicrobiana de ciertos extractos vegetales en los alimentos.

También se ha estudiado el uso potencial de películas comestibles en combinación con extractos naturales de plantas antimicrobianas. Algunos investigadores (Theivendran *et al.*, 2006) evaluaron el efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* de una película de proteína de soja que contenía un 1 % de extracto de té verde (GT) o un 1 % de extracto de semillas de uva (GS) y nisina (10.000 UI) recubierta de salchichas de pavo. Los autores obtuvieron reducciones superiores a 2 log en las muestras recubiertas con nisina combinada con GT o GS después de 28 días a 4 y 10 °C.

2) *Clostridium perfringens*: es un bacilo corto, Gram positivo, que forma esporas, con extremos terminales redondeados, encapsulado e inmóvil. Es anaerobio, aunque algunos investigadores lo consideran microaerófilo, por su capacidad para iniciar el crecimiento sin condiciones rigurosas de anaerobiosis. Su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 40 y 45 °C. Las esporas se forman en condiciones ambientales adversas y en el aparato digestivo de humanos y animales. Sobrevive en el suelo y sedimentos, siendo muy resistentes al calor.

C. perfringens produce 4 toxinas (α , β , ϵ , y ι) que permiten clasificar las cepas de este microorganismo en cinco tipos (A, B, C, D y E) (Morris *et al.*, 2009):

Tabla 2. Clasificación de cepas de *C. perfringens*

TOXINOTIPO	TOXINAS			
	Alfa (α)	Beta (β)	Épsilon (ϵ)	Iota (ι)
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+		-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

Fuente: Toxinas de *Clostridium perfringens* (Morris *et al.*, 2009)

La virulencia de *C. perfringens* se atribuye a su habilidad de producir un arsenal de toxinas potentes. Estas toxinas le permiten obtener los 13 aminoácidos esenciales que es incapaz de producir. Cuatro de estas toxinas (alfa, beta, épsilon e iota) se usan para clasificar cepas de *C. perfringens* en cinco tipos A, B, C D, y E (Morris *et al.*, 2009); sin embargo, la virulencia de *C. perfringens* no sólo se debe a estas cinco toxinas, sino también a un repertorio compuesto, de al menos otras 15 toxinas proteicas que no se utilizan para su clasificación.

Las cepas A y C son las que tienen capacidad de producir una enfermedad infecciosa en el ser humano. La cepa A es la responsable de la casi totalidad de los cuadros clínicos en el hombre, mientras que la cepa C produce ocasionalmente enteritis necrosante. La enterotoxina es producida por múltiples cepas del tipo A y excepcionalmente por alguna de los tipos C y D.

Los niños y las personas mayores constituyen los grupos más vulnerables de población.

La enfermedad generalmente comienza de forma súbita y dura menos de 24 horas presentando diarreas acuosas y cólicos abdominales dentro de 6 a 24 horas (generalmente en 8-12 horas). *C. perfringens* puede dar lugar a dos tipos de enfermedad:

- **Gastroenteritis:** normalmente leve y autolimitada.
- **Enteritis necrotizante (más severa):** puede provocar septicemia (Centers for Disease Control and Prevention, 2017)

En la mayoría de los casos, la causa de la intoxicación por *C. perfringens* es el abuso de la temperatura de conservación de los alimentos después de cocinar y la multiplicación de este microorganismo durante el enfriamiento y almacenaje. *C. perfringens* se asocia comúnmente a platos a base de carnes cocinadas, productos cárnicos cocidos, salsas de carnes, estofados, albóndigas, producidos en grandes cantidades y refrigerados en condiciones no adecuadas (Food and Drug Administration, 2000; European Food Safety Authority, 2005).

Las carnes rojas y de aves son los alimentos más frecuentemente implicados en los brotes de intoxicación por *C. perfringens*. El pescado y los productos pesqueros están raramente implicados (European Food Safety Authority, 2005). En los brotes producidos en España durante 2003, la carne fue el alimento implicado con mayor frecuencia (9 brotes, 60 %) (Cevallos *et al.*, 2005).

C. perfringens se multiplica rápidamente en la carne o en platos a base de almidón y a temperaturas entre 30-50 °C; mantener los platos elaborados en estas temperaturas durante mucho tiempo permite la proliferación bacteriana hasta niveles críticos (European Food Safety Authority, 2005; Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

La mayoría de los brotes se han asociado a comidas en restaurantes e instituciones, son infrecuentes los brotes en el hogar y pueden ocurrir durante todo el año con un ligero aumento en verano. En 2003, se produjeron 15 brotes por *C. perfringens* en España. *C. perfringens* es una de las causas más comunes de enfermedades transmitidas por alimentos en los EE.UU, estimándose unos 10.000 casos por año (Food and Drug Administration, 2000; Cevallos *et al.*, 2005).

- ***Bacillus cereus***: es una bacteria perteneciente al género *Bacillus*. Vista al microscopio, es un bastón alargado, Gram positivo que es móvil por medio de flagelos peritricos. Las células son de 1,0-1,2 µm en el diámetro x 3,0-5,0 µm de largo. Una endospora simple puede formarse en posición central o paracentral sin hinchar el esporangio. El organismo esporula libremente en muchos medios bajo condiciones bien aireadas, aunque las células vegetativas pueden crecer anaeróbicamente. *B. cereus* es capaz de utilizar glucosa, fructuosa y trehalosa pero no las pentosas ni muchos azúcares alcoholes. La mayoría de las cepas hidroliza activamente el almidón, la caseína y la gelatina (Portuondo, 2012).

El crecimiento y la multiplicación de las células vegetativas ocurren típicamente dentro del rango de temperaturas de 10-48 °C, mientras que el óptimo se encuentra entre 28-35 °C. Sin embargo, se han identificado variantes psicrotroficas de *B. cereus* en leche cruda y pasteurizada capaces de crecer e iniciar la descomposición a temperaturas tan bajas como 5 °C. El pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 4,3 y 9,3. El rango mínimo de actividad del agua para el crecimiento vegetativo es de 0,912-0,950. Su tiempo de generación en medio artificial a 30 °C es de 18-27 minutos. Cuando carecen de nutrientes esporulan, lo cual le permite sobrevivir largos períodos de carencia nutricional. Las esporas resisten una serie de factores ambientales como altas temperaturas ($D_{100}^{\circ}\text{C}$ en leche descremada hasta 3 minutos, $D_{121}^{\circ}\text{C}$ en aceite vegetal hasta 30 minutos, $D_{95}^{\circ}\text{C}$ en agua destilada de 1,5-36 minutos), radiaciones y reactivos químicos (Portuondo, 2012).

Existen muchas razones que pueden explicar los problemas causados por *B. cereus*. Éste es un microorganismo ubicuo en el medio ambiente y que puede contaminar fácilmente cualquier sistema de producción y procesamiento de alimentos. Debido a la formación de endosporas, esta bacteria puede sobrevivir a la pasteurización y el calentamiento incluso a la irradiación con rayos gamma, usada para reducir los patógenos en los alimentos (Kotiranta *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que este microorganismo produce siete tipos de toxinas:

- **Cereulida (toxina emética):** la cual ha sido ampliamente caracterizada en los últimos años (Agata *et al.*, 1995).

- **Enterotoxinas:** hemolisina BL/HBL, enterotoxina no hemolítica (NHE) y enterotoxina T (EntT) (Anderson *et al.*, 2001), las cuales lo hacen responsable de dos síndromes:

- * **Síndrome emético:** el síndrome emético está caracterizado por náuseas agudas y vómitos similares a los producidos por intoxicación con *S. aureus*. Estos síntomas se desarrollan notablemente entre 1-5 horas después del consumo del alimento contaminado conteniendo la toxina preformada. La toxina, denominada *cereulida*, provoca emesis al estimular la vía vago aferente a través de su unión con el receptor de la serotonina. La producción de la toxina ocurre durante la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo (Agata *et al.*, 1995; Kotiranta *et al.*, 2000), y se acumula en el alimento a medida que transcurre el tiempo. La estructura de la toxina explica su resistencia a los métodos de tratamiento de los alimentos y el que esté preformada al ingerirse da lugar a la rapidez con que aparecen los síntomas.

* **Síndrome diarreico:** la forma diarregénica de la intoxicación con *B. cereus* se desencadena por la acción de al menos dos tipos de enterotoxinas de tres componentes (HBL y NHE) producidas durante la fase exponencial del crecimiento vegetativo de la bacteria, en el intestino delgado del huésped (Beecher *et al.*, 1995). Se considera que ninguna de las tres proteínas que forma cada enterotoxina (una de unión y dos factores líticos) es capaz de atravesar intacta la barrera del estómago. Esto significa que las enterotoxinas preformadas o extracelulares en el alimento no juegan ningún papel en la patogénesis de *B. cereus*. Incluso, se considera generalmente que las células vegetativas no sobreviven en el pH tan bajo del estómago pero las esporas sí. Por lo que se cree que la ruta del síndrome diarreico es la germinación de la espora, el crecimiento y la producción simultánea de la enterotoxina.

La diarrea causada por *B. cereus* es del tipo secretor, similar a la producida por *Vibrio cholerae*. Esta diarrea secretora se caracteriza por una perturbación del movimiento del agua y los electrolitos a través del epitelio del intestino delgado, más frecuentemente relacionado con las enterotoxinas.

Los síntomas en los organismos susceptibles ocurren en aproximadamente 12 horas luego de la ingestión de la cepa productora de enterotoxinas junto con el alimento e incluye dolor intestinal, diarrea, cólicos similares a la intoxicación con toxinas de *C. perfringens*.

Los alimentos crudos de origen vegetal son la fuente principal de *B. cereus*. La amplia distribución del organismo, la habilidad de las esporas de sobrevivir en los alimentos deshidratados y su resistencia térmica significa, que la mayoría de los alimentos que se consumen podrían contener *B. cereus* lo cual requerirá de medidas de control para prevenir el crecimiento, especialmente después de la cocción que elimina la flora competidora.

Las cepas que producen la toxina emética crecen bien en platos con arroz y otros alimentos farináceos, mientras que las cepas que producen la toxina diarregénica crece en una amplia variedad de alimentos que van desde vegetales hasta salsas y guisados. Numerosas hierbas desecadas, especias para condimentar y alimentos deshidratados han mostrado presencia de esta bacteria. Se ha encontrado que las cepas de *B. cereus* que producen la enterotoxina no producen la toxina emética, así como también que no todas las cepas de *B. cereus* pueden producir la toxina emética, solo las capaces de vivir en el arroz.

- **Microorganismos mesófilos:** son aquéllos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20 °C y 45 °C con una zona óptima entre 30 °C y 40 °C (Passalacqua *et al.*, 2014).

El recuento de microorganismos mesófilos se basa en la certeza de que un microorganismo viable presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio de cultivo nutritivo sólido, se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30 °C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por mililitro de alimento.

El recuento de microorganismos mesófilos sirve para realizar una estimación de número total de bacterias que hay en un alimento, sin identificar los diferentes tipos de gérmenes.

Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos o de sus toxinas; tampoco un recuento total elevado significa, inevitablemente, presencia de microbiota patógena. Excepto en productos que se elaboran mediante fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de alimentos (Passalacqua *et al.*, 2014).

Sus hábitats de supervivencia son el agua, los seres vivos y el suelo; por ello, es común encontrarlos en cultivos de plantas aromáticas.

- **Microorganismos psicrófilos:** son aquellos microorganismos que pueden crecer a bajas temperaturas siendo su temperatura óptima de crecimiento de 12-15 °C, sus mínimas alrededor de 5 °C y las máximas oscilan sobre unos 20 °C. Su sistema enzimático y membranas celulares les permiten vivir a bajas temperaturas (Ramírez, 2006).

Pueden ser:

• **Psicrófilos obligados:** cuya temperatura óptima es de 15 °C o menos, y pueden crecer a 0 °C. Crecen en los hielos de zonas polares (por ejemplo, las algas).

- **Psicrófilos facultativos:** cuya temperatura óptima está comprendida entre 25 y 30 °C, pudiendo crecer a 0 °C. Tienen una distribución amplia (algunos géneros de hongos, algas y protozoos los contienen). Los alimentos albergan a menudo microorganismos psicrófilos facultativos que producen su deterioro (por ejemplo, carne en el congelador).

Cuanto más baja es la temperatura más lento es el desarrollo microbiano. Existe un límite mínimo por debajo del cual la reproducción es imposible. A temperaturas de -30 °C el crecimiento celular se detiene pero siguen lentamente algunas reacciones enzimáticas. Probablemente sean los -140 °C el límite por debajo del cual no haya reacciones químicas (estas temperaturas se logran en nitrógeno líquido).

La congelación impide el crecimiento pero no asegura la muerte de los microorganismos por lo que no puede ser usado para esterilización. La congelación afecta las células, especialmente por el daño físico de los cristales que se forman. Cuando las células se congelan rápidamente se forman pequeños cristales y se mantiene mayor viabilidad celular, más aún cuando se utilizan ciertas sustancias que disminuyen el efecto congelante (glicerol).

- **Mohos y levaduras:** los hongos poseen pared celular y esporas de diversos tipos, formando un grupo coherente filogenéticamente hablando (Madigan *et al.*, 2003). Se reconocen tres grandes grupos:

- **Mohos u hongos filamentosos.**
- **Levaduras.**
- **Setas.**

Los géneros clave de este grupo son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Saccharomyces* y *Candida*.

La contaminación fúngica de un alimento es de vital importancia ya que, además de su acción deteriorante (pudre y malogra materias primas y productos manufacturados), algunas especies pueden sintetizar gran variedad de micotoxinas para provocar infecciones e, incluso, para provocar reacciones alérgicas en personas hipersensibles a los antígenos fúngicos. Por estos motivos, para conocer la calidad microbiológica de un producto, es pertinente realizar un recuento de hongos y levaduras.

En general, los hongos son quimioorganotrofos y tienen pocos requerimientos nutricionales. Muchas especies pueden crecer en ambientes extremos con bajo pH o altas temperaturas de hasta 62 °C y esto, junto con la ubicuidad de las esporas fúngicas, hace que sean los contaminantes más frecuentes de alimentos, medios de cultivo microbianos, etc. (Madigan *et al.*, 2003).

Poseen pared celular con quitina, un polisacárido (N-acetil-D-glucosamina) que confiere rigidez y es responsable de su morfología y, en ocasiones, celulosa. Algunos hongos presentan cápsula, formada por polisacáridos, con propiedades inmunógenas y antifagocitarias.

Los mohos son hongos filamentosos ampliamente distribuidos en la naturaleza y que se encuentran frecuentemente sobre pan viejo, queso o frutas. Cada filamento crece fundamentalmente en el extremo por un mecanismo de extensión celular y se denomina *hifa* (Madigan *et al.*, 2003); el conjunto de hifas recibe el nombre de *talo* (estructura o cuerpo vegetativo). Las hifas son tubos largos que están formadas por la pared celular de quitina (componente mayoritario) y el citoplasma con sus inclusiones y núcleos con la información genética. Las hifas pueden estar separadas en células por paredes transversales (septos) en los hongos superiores (Eumicetos), o carecer de paredes en los hongos inferiores (Ficomictos). El conjunto de hifas se denomina *micelio*. En el micelio se distinguen dos partes: una que penetra en el medio de cultivo y se extiende por su superficie (micelio vegetativo), y otra que se proyecta y contiene las esporas (micelio reproductor o aéreo).

Los hongos, según el tipo de sustrato nutritivo que empleen, pueden ser:

- **Hongos saprófitos:** utilizan materia orgánica muerta.
- **Hongos parásitos:** utilizan organismos vivos, plantas o animales.

La taxonomía fundamental de los mohos transmitidos por los alimentos es la siguiente (Jay *et al.*, 2005):

- **División Zygomycota:** Géneros *Mucor*, *Rhizopus* y *Thamnidium*.
- **División Ascomycota:** Géneros *Byssochlamys*, *Emericella*, *Eupenicillium* y *Eurotium*.
- **División Deuteromycota:** Géneros *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* (*Pullularia*), *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Helmintosporium*, *Monilia/Sclerotinium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* y *Trichothecium*.

Las levaduras son hongos unicelulares (la mayoría pertenecen a la División *Ascomycota*). Normalmente son ovales, esféricas o casi cilíndricas y la división es, casi siempre, asimétrica o por gemación. Prosperan típicamente en hábitats con azúcares, tales como frutos, flores y cortezas de los árboles. Muchas de ellas viven de forma simbiote con animales (especialmente insectos) y algunas son patógenas para ellos (incluido el hombre) (Madigan *et al.*, 2003). Las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las especies *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera comercial), *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. Estas especies son consideradas como aptas para el consumo humano o *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

La taxonomía fundamental de las levaduras transmitidas por los alimentos es la siguiente (Jay *et al.*, 2005):

- **División *Ascomycotina*:** Géneros *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*.

- **División *Deuteromycotina*:** Géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*.

Las levaduras son importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentación de diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

A grandes rasgos, existen dos tipos de fermentación:

- **Fermentación alcohólica:** es un proceso biológico de fermentación en ausencia de oxígeno (O₂), originado por la actividad de algunos microorganismos como la levadura y bacterias, que procesan los azúcares (carbohidratos como la glucosa, la sacarosa y la fructosa, entre otros). Los productos finales que se obtienen de este proceso son etanol, dióxido de carbono, NAD⁺ y 2 ATP.

Produce muy poca energía neta (2 ATP por cada piruvato obtenido de la glicólisis); como resultado se obtiene también etanol (principal producto utilizado en las empresas productoras de vinos, cervezas y vinagre) y dióxido de carbono (CO₂).

La producción industrial de alcohol se realizó totalmente por el proceso fermentativo hasta 1930, utilizando melazas de diversos tipos como materia prima. El encarecimiento de estas materias primas y el desarrollo rápido de la producción de etanol por síntesis química hacen en la actualidad poco económico el proceso fermentativo (Carbonero, 1975).

• **Fermentación láctica:** ocurre en algunos protozoos y en tejidos animales. Su principal uso se da en la obtención de quesos, yogur, salsa de soja, y otros productos derivados de la leche.

Las fermentaciones lácticas industriales utilizan fundamentalmente bacterias lácticas homofermentativas, tales como *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. leichmanii* y *Streptococcus lactis* (Carbonero, 1975).

En los tejidos en animales se produce ácido láctico (o lactato) a partir del piruvato. En células musculares, cuando el suministro y las reservas de oxígeno (mioglobina) se agotan durante ejercicio físico extenuante, el piruvato deja de ingresar a las mitocondrias (ingresan en presencia de O₂ para obtener energía) y comienza la fermentación láctica (anaerobia). Las grandes cantidades de lactato son las responsables de la fatiga y dolor muscular.

La inocuidad de las hierbas y especias aromáticas desecadas puede verse afectada por mohos productores de micotoxinas, por ejemplo, aquéllos que producen aflatoxinas (como *Aspergillus flavus* o *Aspergillus parasiticus*) u ocratoxina A (como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, o *Penicillium verrucosum*). Los valores normales rondan los 10³ UFC/g (Codex Alimentarius, 2014).

La complejidad de la cadena de proveedores para las especias y las hierbas aromáticas desecadas hace que sea muy difícil identificar los puntos en donde se presenta la contaminación en la cadena alimentaria; sin embargo, existen evidencias de que la contaminación puede ocurrir a lo largo de toda ésta si no se siguen las prácticas apropiadas (Codex Alimentarius, 2014).

1.3.2. Tecnologías utilizadas para la descontaminación de plantas aromáticas

El control de la contaminación microbiana en hierbas y especias radica en la aplicación de buenas prácticas de higiene en el área de producción/cosecha, procesamiento y personal. Además de las buenas prácticas de higiene, muchos proveedores de especias y hierbas aplican procesos de control basados en tratamientos de vapor o calor seco para minimizar el riesgo de patógenos (Sagoo *et al.*, 2009). La contaminación microbiana de estos productos puede ser controlada por tratamientos tales como los tratamientos térmicos, de irradiación y de fumigación:

- **Tratamientos térmicos:** el tratamiento térmico de alimentos a temperaturas altas es uno de los procesos más efectivos para la conservación de alimentos y es el más ampliamente utilizado para atender la creciente demanda de alimentos a nivel mundial. Utiliza altas temperaturas por periodos de tiempo cortos, para asegurar la inocuidad del alimento. Sin embargo, en el caso de las especias, se debe ser especialmente cuidadoso con estos tratamientos pues pueden causar alteraciones físicas y pérdida importante de compuestos volátiles con actividad antioxidante y antimicrobiana, como son los aceites esenciales (muy sensibles al calor al presentar la mayoría de ellos una estructura fenólica).

Los principales mecanismos de transferencia del calor son:

- **Conducción:** la velocidad de transmisión de calor mediante el mecanismo de conducción obedece a la *Ley de Fourier*, que establece que el caudal de calor por unidad de área es directamente proporcional al gradiente de temperatura a través de una pared plana de un sólido cuyas caras se encuentran a distinta temperatura, por la conductividad térmica del material (Aguado *et al.*, 2002).

- **Convección:** la convección se presenta en alimentos fluidos, no pastosos, que no presentan cambios importantes en viscosidad durante el tratamiento, y en general está ligada a velocidades de calentamiento rápido y tiempos reducidos para elevar la temperatura del producto (Rao *et al.*, 1988).

- **Radiación:** el mecanismo de transmisión del calor por radiación, se basa en la propiedad que tienen los cuerpos de emitir ondas electromagnéticas desde su superficie en un amplio intervalo de longitudes de onda (Aguado *et al.*, 2002).

Los microorganismos tienen una temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento. Las temperaturas por debajo de la mínima usualmente tienen una acción bacteriostática, es decir, detienen el crecimiento microbiano pero no provocan la muerte celular. Las temperaturas por encima de la máxima usualmente tienen una acción bactericida, es decir, provocan la muerte del microorganismo por desnaturalización de enzimas y otras proteínas. La sensibilidad de los microorganismos a las altas temperaturas varía con la especie y con el estado en que se encuentren. Las esporas bacterianas son las estructuras vivas más termorresistentes, ya que resisten tratamientos térmicos más drásticos que las formas vegetativas.

En la siguiente figura se muestra el ciclo vital de un microorganismo (Aguado *et al.*, 2002):

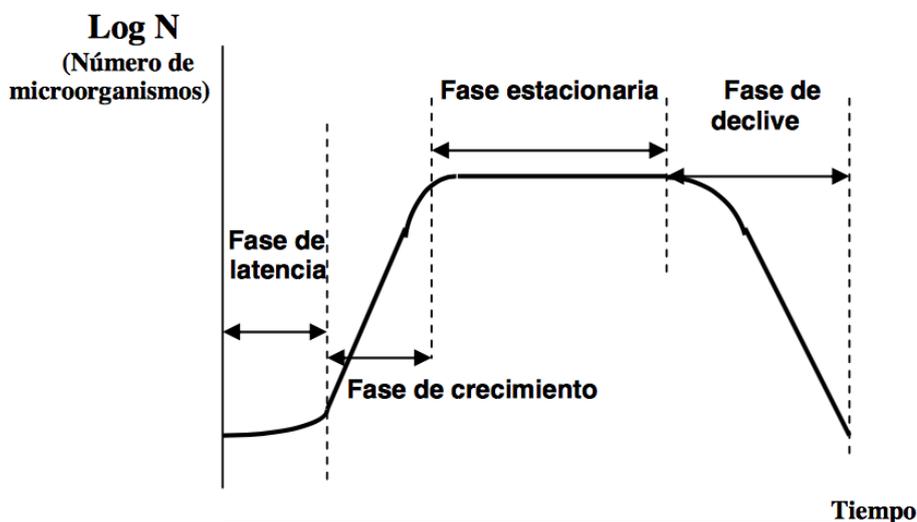


Figura 6. Ciclo vital de un microorganismo. Fuente: Ingeniería de la industria alimentaria (Aguado *et al.*, 2002)

- **Tratamientos por irradiación:** el mecanismo de transmisión de calor por radiación se basa en la propiedad que tienen los cuerpos de emitir ondas electromagnéticas desde su superficie en un amplio intervalo de longitudes de onda. Todos los sólidos, líquidos y gases por encima de 0 K emiten radiación electromagnética que se propaga linealmente en todas direcciones a la velocidad de la luz (Aguado *et al.*, 2002).

No alteran las propiedades organolépticas de la planta.

La irradiación inactiva los organismos que descomponen los alimentos, en particular los microorganismos, los mohos y las levaduras. Es muy eficaz para prolongar el tiempo de conservación de las frutas frescas y las hortalizas porque controla los cambios biológicos normales asociados a la maduración, la germinación y, por último, el envejecimiento. La radiación destruye los organismos causantes de enfermedades, inclusive los gusanos parásitos y los insectos que deterioran los alimentos almacenados. Al igual que otras formas de tratamiento de alimentos, la irradiación produce en estos algunos cambios químicos útiles. Por ejemplo, ablanda las legumbres (habas y judías), y con ello acorta el tiempo de cocción. También aumenta el contenido de jugo de las uvas y acelera la desecación de las ciruelas (Organización Mundial de la Salud, 1989).

Sin embargo, no es un tratamiento exento de problemas y limitaciones ya que, por ejemplo, tiende a ablandar algunos alimentos (como las frutas); además, algunos alimentos adquieren un sabor desagradable. En algunos alimentos, este problema puede soslayarse empleando cantidades inferiores de radiación (Organización Mundial de la Salud, 1989).

Cada alimento tiene una dosis de radiación (cantidad de energía absorbida por él) concreta para conseguir el efecto deseado. La unidad de dosis absorbida se denomina *gray* (Gy) y se define como “*la energía media comunicada por la radiación ionizante a la materia por unidad de masa*” (equivale a 1 J/kg). Actualmente, la dosis de radiación recomendada por la Comisión FAO/OMS del Codex Alimentarios para la irradiación de alimentos no excede de 10.000 Gy (10 kGy) (Organización Mundial de la Salud, 1989).

Las radiaciones ionizantes que pueden ser usadas para irradiar alimentos son:

- **Irradiación con rayos gamma:** se utiliza para irradiar grandes cantidades de productos a granel (patatas, maíz, cebollas, etc.), los cuales se colocan en una cinta transportadora o en cestos que circulan en torno al material radiactivo. Es la más utilizada en productos de origen alimentario. No compromete los niveles de compuestos antioxidantes ni los radicales libres de las plantas. El rango de utilización oscila entre 10 y 50 kGy, penetrando en la planta para reducir la carga microbiana a valores aptos para el consumo humano.

- **Irradiación con rayos X, UV y electrones acelerados:** no son tan eficaces como la radiación gamma, ya que o no penetran en todas las partes de la planta (por tanto, no desinfectan) o pueden llegar a inactivar compuestos bioactivos (por tanto, disminuye las propiedades organolépticas).

Las ventajas de este proceso son la fácil instalación y alta eficiencia, ya que los electrones pueden ser dirigidos directamente al producto alimenticio; sin embargo, los rayos gamma se dirigen en todas las direcciones. Como inconveniente, cabe citar el bajo poder de penetración, por lo que no se puede utilizar para la irradiación de alimentos de cierto espesor.

Todo producto alimenticio que hay sido irradiado debe, por ley (en España), incluir en la etiqueta la palabra “*irradiado*” o “*tratado con radiación ionizante*”.

La irradiación se puede utilizar en productos lácteos, sobre todo en quesos, en cítricos, frutas y verduras, vinos y alimentos para personas inmunodeprimidos, entre otros. Aumenta la vida útil del producto y garantizar las condiciones higiénico-sanitarias del mismo.

- **Tratamientos por fumigación:** su utilización ha ido disminuyendo progresivamente debido al auge de la irradiación:

• **Óxido de etileno:** es el principal fungicida y tiene un gran poder antimicrobiano. Su límite de utilización es de 20 mg/kg.

• **Dióxido de cloro:** no suele utilizarse a pesar de ser muy eficaz, ya que produce residuos no deseados.

1.4. Plantas aromáticas y sus sistemas de comercialización

1.4.1. Plantas aromáticas según el tratamiento de conservación aplicado

- **Plantas o hierbas aromáticas frescas:** son productos perecederos que necesitan refrigeración para poder ser conservados adecuadamente; sin embargo, si son sometidas a un tratamiento de secado pueden utilizarse durante mucho más tiempo. A la hora de mantener estas hierbas aromáticas frescas en refrigeración, se van a utilizar recipientes de plástico, siendo el envase preferido por excelencia las tarrinas de tereftalato de polietileno (PET).

Las hierbas frescas no soportan bien tiempos de cocinados prolongados ni altas temperaturas, por lo que se deberán utilizar una vez finalizada la cocción del alimento o cuando requieran poco tiempo de cocinado. Por ejemplo, la albahaca fresca se añade a las pizzas para darle un toque especial una vez sacada del horno; además, son muy adecuadas para realzar el sabor y olor de salsas en frío o ensaladas.

- **Plantas o hierbas aromáticas deshidratadas:** se busca seguir manteniendo el color verde y todas las cualidades de estas plantas. Para ello, se recolectan en el momento apropiado (generalmente antes de su floración) y se someten inmediatamente a un proceso de desecación (es necesario una buena aireación y calefacción u horneado a bajas temperaturas).

1.4.2. Plantas aromáticas según el sistema de comercialización utilizado

- **Plantas aromáticas vendidas a granel:** las hierbas aromáticas que se encuentran en los puntos de venta a granel, como herbolarios o tiendas callejeras a la intemperie, han sido sometidas, por lo general y de forma previa, a un proceso de desecación. No suele haber plantas aromáticas frescas vendidas a granel, ya que su vida útil es muy corta (4-5 días).

Por sus características y constituyentes deberían ser almacenadas en recipientes de vidrio cerrados herméticamente en oscuridad; sin embargo, la mayoría de las veces se encuentran en cestas y otros recipientes abiertos al exterior. Esto es muy perjudicial para las plantas, ya que la luz induce en ellas un color más pálido y puede destruir algunas de sus cualidades específicas. Igualmente, al no contar con ningún tipo de recubrimiento pierden gran parte de su aroma (Loewenfeld *et al.*, 1980).

- **Plantas aromáticas envasadas:** las plantas aromáticas desecadas, puestas a disposición del consumidor final en superficies comerciales de alimentación, vienen envasadas y selladas herméticamente, con el fin de evitar la manipulación por parte de los usuarios y consumidores que acuden a estos centros de alimentación. Son comercializadas dentro de pequeños frascos de aproximadamente 10-20 gramos de peso neto en función del tipo de planta. En general, se utilizan tres tipos de materiales diferentes para la elaboración de estos frascos:

• **Tarrinas de Tereftalato de Polietileno (Polyethylene Terephthalate, PET):** la principal característica del PET es que presenta propiedades de barrera altas al vapor de agua, lo que va a permitir mantener durante más tiempo un grado de frescura adecuado de las plantas (al evitar una deshidratación excesiva de las mismas durante el almacenamiento en los lugares de venta como supermercados e hipermercados). Este envase se utiliza de forma muy frecuente para comercializar plantas frescas, donde es importante mantener el grado de humedad óptimo con el fin de evitar una deshidratación excesiva del producto. Además, es un material muy flexible (es moldeable en formas de finas láminas y envases flexibles) y posee excelentes propiedades de deformación bajo presión.

Sin embargo, como inconveniente presenta una baja resistencia térmica (no es capaz de resistir temperaturas superiores a los 70-80 °C). De todas formas, esto no llega realmente a ser un problema al no ser necesario calentar estos productos:

Tabla 3. Propiedades de barrera del PET frente a gases alterantes de la calidad alimentaria

PROPIEDADES	UNIDAD	VALOR
Permeabilidad al agua	g/m ² 24 h 1 atm	0,07
Permeabilidad al O ₂	cm ³ /m ² /bar	113,12
Permeabilidad al CO ₂	cm ³ /m ² /bar	0,002
Permeabilidad al N ₂	cm ³ /m ² /bar	0,02

Fuente: Manual del Envasado de Alimentos y Bebidas (Coles *et al.*, 2004)

El tereftalato de polietileno alcanza su punto de fusión a una temperatura de 260 °C y no se retrae por debajo de los 180 °C, por lo que se puede someter a tratamientos térmicos como la esterilización por vapor, que se encuentra entre uno de los métodos de descontaminación más frecuente en la industria de plantas aromáticas (Coles *et al.*, 2004).

- **Bolsas de papel de celofán:** el celofán es un polímero natural derivado de la celulosa con aspecto de película fina, transparente, flexible y resistente a esfuerzos de tracción, pero muy fácil de cortar; por ello, tiene unas características de permeabilidad similares al papel, si bien su principal inconveniente es que ofrece pocas propiedades de barrera ya que es más permeable al oxígeno y al vapor de agua que el envase de PET. También es permeable a los microorganismos tales como bacterias, mohos y levaduras.

- **Frascos de vidrio:** generalmente se suelen utilizar frascos de vidrio transparentes. El vidrio es incoloro y está formado por sosa, cal y silicatos, aunque se puede reducir el gasto de materia prima si se reciclan los envases ya utilizados (Rees *et al.*, 1994).

Algunas de las ventajas de los envases de vidrio son:

- * **Impermeabilidad.**

- * **Procesabilidad mediante tratamiento térmico:** el vidrio es resistente al calor, ya que se puede someter a tratamientos térmicos (por ejemplo, esterilización) una vez envasado el producto. Esto supone un beneficio para el fabricante.

- * **Integridad química:** el vidrio es químicamente resistente al alimento; por tanto, no se produce transferencia de compuestos, olores o sabores indeseables.

* **Protección contra la luz ultravioleta:** el vidrio transparente no ofrece ningún tipo de protección; por el contrario, el vidrio ámbar confiere una protección total y el vidrio verde una protección parcial. No obstante, la protección a la luz se puede conseguir con vidrio de 4 mm de grosor.

* **Higiene:** es un material muy higiénico ya que se puede lavar y secar fácilmente antes del llenado.

2. Objetivos

Las hierbas y especias comestibles frescas y desecadas poseen componentes (aromáticos o sápidos) que se utilizan para mejorar aroma o color cuando se añade a la alimentación, tanto de forma entera, quebrada o molida. La producción, elaboración y envasado de las especias y hierbas aromáticas es muy compleja y las técnicas agrícolas para cultivarlas varían ampliamente desde el uso de prácticas totalmente artesanales hasta aquellas altamente mecanizadas. Por otro lado, la elaboración y envasado o reenvasado también puede efectuarse en distintos lugares a lo largo de amplios periodos, ya que las especias y hierbas aromáticas especialmente las deshidratadas se preparan para muchos propósitos distintos.

Esto hace que la inocuidad de los productos que contienen especias y hierbas aromáticas, tanto frescas como deshidratadas, dependa de mantener buenas prácticas de higiene a lo largo de toda la cadena alimentaria, durante su producción primaria, elaboración, envasado, venta al detalle y en el punto de consumo. En los últimos años ha aumentado el número de alertas alimentarias, tanto a nivel nacional como internacional por la presencia en el mercado de alimentos contaminados donde las especias jugaban un papel fundamental en la cadena de transmisión de peligros biológicos.

Por ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- **Estudiar la calidad higiénico-sanitaria de diferentes hierbas y condimentos de uso culinario en la Dieta Mediterránea según el sistema de comercialización utilizado, tanto deshidratadas como frescas.**

- **Estudiar la relación entre la calidad higiénico-sanitaria de estas hierbas y condimentos y el tipo de material de envasado utilizado en su comercialización:** prestando una atención especial sobre el material más adecuado a la hora de minimizar los peligros microbianos, dadas las diferentes características de permeabilidad que presentan los envases alimentarios frente a gases causantes de alteración microbiana como el oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras analizadas

3.1.1. Hierbas y especias deshidratadas

Se analizaron muestras deshidratadas y muestras frescas. Las muestras deshidratadas fueron (n = 75):

- **Tomillo.**
- **Romero.**
- **Clavo.**
- **Orégano.**
- **Albahaca.**

Se han elegido estas especias por ser las de mayor consumo dentro de la Dieta Mediterránea y estar presentes en multitud de platos y elaboraciones culinarias de la cocina popular española.

Estas muestras se comercializan bajo varios formatos de cara al público consumidor: a granel, envasadas en tarros de vidrio y envasadas en tarro de PET (tereftalato de polietileno). En nuestro caso, el muestreo fue el siguiente:

- **Comercializadas a granel (n = 25).**
- **Envasadas en frascos de vidrio (n = 25).**
- **Envasadas en frascos de PET (n = 25).**

En los tres sistemas de comercialización siempre se analizaron las mismas especias (tomillo, romero, clavo, orégano y albahaca).

Todas las muestras fueron recogidas en diferentes establecimientos comerciales de Granada y colocadas asépticamente en bolsas estériles, antes de su análisis microbiológico el mismo día de la recogida. De estas muestras, el 78 % fueron de origen europeo y el 22 % restante era de origen desconocido pero vendidas en establecimientos españoles.

Las muestras a granel se recogieron de herbolarios, donde las hierbas secas se muestran al público en cestas o cajas sin ningún sistema de embalaje y en ocasiones en puestos junto a la carretera o la calle. Esta forma de comercialización conlleva una gran manipulación y un posible peligro de contaminación, tanto ambiental como por los propios consumidores, que se acercan a las cestas para olerlas y, a veces, incluso para tocarlas con sus manos.

Las muestras envasadas en vidrio y en PET fueron adquiridas en supermercados, empaquetadas y selladas herméticamente por la industria alimentaria con el fin de evitar manipulaciones por parte de los usuarios y consumidores que se acercan a estos alimentos. Hemos elegido especias en envases de vidrio y especias en envases de PET por presentar ambos materiales de envasado altas propiedades de barrera frente a gases y vapores en general. Con esto, pretendemos ver la diferencia en términos de la calidad microbiana de los alimentos entre hierbas sin ningún tipo de envase que se vendan a granel y hierbas que han sido previamente envasadas por la industria alimentaria, para garantizar su calidad higiénica. El envase es garantía de esa calidad, ya que actúa como barrera que impide el paso de microorganismos del medio ambiente, así como ciertos gases (como el vapor de agua) que pueden favorecer el desarrollo microbiano.

3.1.2. Hierbas y especias frescas

Las muestras frescas fueron (n = 50):

- **Tomillo.**
- **Perejil.**
- **Cilantro.**
- **Hierbabuena.**
- **Albahaca.**

Se han elegido estas especias por ser muy populares dentro de la cocina tradicional española y por ser las únicas hierbas frescas que actualmente se comercializan envasadas en España. Las muestras fueron adquiridas en diferentes centros comerciales de Granada.

Estas muestras se comercializan bajo varios formatos de cara al público consumidor: envasadas en tarro de PET (tereftalato de polietileno) y envasadas en bolsas de papel celofán. En nuestro caso, el muestreo fue el siguiente:

- **Invasadas en frascos de PET (n = 25).**
- **Invasadas en papel celofán (n= 25).**

El 100 % de las muestras analizadas, según el etiquetado alimentario, procedían de explotaciones españolas y, de ellas, un 33 % se catalogaban como productos de proximidad. Estas hierbas se venden refrigeradas ya que al ser frescas tienen una vida útil muy corta y la única forma de conservarlas mejor es en refrigeración en los lugares de venta.

Todas las muestras, una vez compradas, fueron colocadas asépticamente en bolsas estériles, antes de su análisis microbiológico el mismo día de la recogida.

En la Figura 7 se muestran ejemplos de hierbas frescas analizadas:



Figura 7. Ejemplos de muestras de hierbas frescas analizadas

3.2. Métodos de análisis microbiológico

Se han comprobado los recuentos microbianos de *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus* como microorganismos que indican una falta de calidad higiénica en las hierbas. Estas bacterias pueden aparecer en los alimentos debido a la contaminación cruzada y la falta de higiene durante el almacenamiento y la manipulación. Asimismo, se han estudiado los microorganismos mesófilos y psicrófilos porque es común encontrarlos en plantas aromáticas cultivadas. Por último, también se han estudiado mohos y levaduras, ya que estos organismos microscópicos se alimentan y realizan sus funciones vitales en base a la descomposición de materia orgánica (el principal problema con ellos es la producción de micotoxinas).

3.2.1. Preparación de las muestras

De forma general, la preparación de las muestras se lleva a cabo homogeneizando 10 g de la muestra triturada utilizando unas tijeras previamente desinfectadas, y en condiciones asépticas, en 90 ml de diluyente estéril, ya que este volumen es, con frecuencia, el mayor que puede ser manipulado con comodidad en la mayoría de los laboratorios (Camacho, 2014).

Las diluciones seriadas se han llevado a cabo para la siembra en placas de Petri (no en el caso de *C. perfringens*, pues la siembra se realizaba directamente a partir del medio de enriquecimiento en presencia de la muestra a analizar). Esta técnica consiste en realizar diluciones sucesivas de la muestra en condiciones de esterilidad, con objeto de sembrar cantidades conocidas de las mismas en las placas Petri. Al utilizar varias diluciones, alguna de ellas será tal que originará en una placa colonias separadas, y por tanto puras; además, serán susceptibles de ser contadas para la utilización en las técnicas de recuento (Camacho, 2014).

En nuestro caso, para el recuento microbiano se han utilizado 1,5 g de cada una de las plantas aromáticas con las que vamos a trabajar diluidos en 9 ml de solución acuosa de peptona tamponada estéril; a partir de estas diluciones se hicieron posteriores diluciones decimales del mismo modo. Estas cantidades de hierbas se tomaron como referencia en base a tamaños de porciones factibles cuando se realiza la planificación de un menú. El agua de peptona sirvió como medio de dilución y preenriquecimiento para la mayoría de nuestros microorganismos (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, *Bacillus*, mohos y levaduras); para *L. monocytogenes* se utilizó el caldo Fraser. Desde el sistema de diluciones decimales, se tomaron las diluciones apropiadas (1 ml) que se sembraron por triplicado en los medios selectivos de crecimiento de cada microorganismo utilizando métodos de recubrimiento directo:

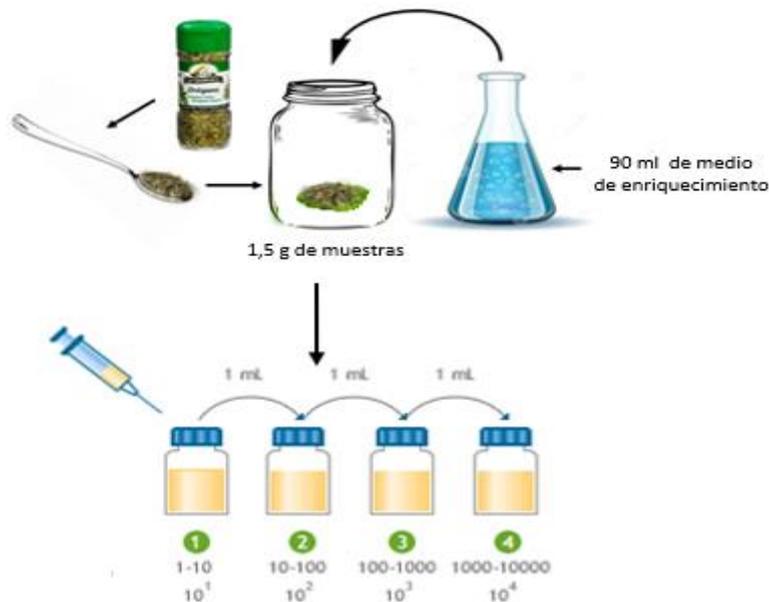


Figura 8. Esquema de la preparación escalonada de diluciones decimales para su posterior recuento microbiano

3.2.2. Enriquecimiento y medios de cultivo

Se han empleado los siguientes medios:

- **Medio de enriquecimiento:** se ha utilizado el agua de peptona como medio de enriquecimiento para cinco de los microorganismos analizados (*B. cereus*, *C. perfringens*, microorganismos aerobios mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras); para *L. monocytogenes*, se ha utilizado el caldo Fraser.

Tras la preparación de la muestra, tal y como se ha detallado, ésta se ha dejado en el medio de enriquecimiento durante un día.

- **Medios selectivos:**

- ***Bacillus cereus* Selective Agar:** para *B. cereus*.
- **Iron Sulphite Agar:** para *C. perfringens*.
- **Plate Count Agar (PCA):** para microorganismos mesófilos.
- **King A Agar:** para microorganismos psicrófilos.
- **Sabouraud Chloramphenicol Agar:** para hongos y levaduras.
- **Agar Listeria PALCAM:** para *L. monocytogenes*.

3.2.3. Incubación y conservación de cultivos

La incubación es el proceso mediante el cual se consigue el crecimiento de las bacterias cuando, una vez sembradas en el medio adecuado, se introducen en la estufa de incubación o incubadora a la temperatura y atmosfera más adecuada para cada cultivo durante un tiempo determinado. Tanto la temperatura como el tiempo de incubación están en función no sólo del microorganismo, sino también de la observación o medición que se quiera realizar, e incluso del tipo de cultivo y del medio usado para el mismo (Camacho, 2014):

- ***L. monocytogenes*:** la temperatura en estufa ha sido de 37 °C.
- ***B. cereus* y microorganismos mesófilos:** la temperatura en estufa ha sido de 31 °C.
- ***C. perfringens*:** la temperatura en estufa ha sido de 40 °C.
- **Microorganismos psicrófilos y mohos y levaduras:** se han mantenido a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

La lectura se realizó para todos los microorganismos 24 horas después de su incubación, excepto en el caso de los hongos, para los que se realizó a los 4-5 días.

Los cultivos en placa fueron incubados en posición invertida para evitar que la humedad condensada cayera sobre las colonias en crecimiento y pudiera afectarles.

3.2.4. Recuento de microorganismos

En gran variedad de estudios microbiológicos es importante conocer con exactitud el número de microorganismos presentes en una muestra. Así, en el caso de la higiene alimentaria es esencial conocer la carga microbiana de aguas y alimentos, superficies de trabajo y medio ambiente, para determinar la calidad de los productos analizados (Camacho, 2014).

En el presente estudio el recuento se ha realizado de forma tradicional, recurriendo al uso de cuadrantes cuando ha sido necesario. Este método consiste en dividir la placa en cuatro partes iguales contando una de ellas y multiplicando la cifra obtenida por cuatro. En el caso de *C. perfringens*, el recuento se realizaba contando los puntos de los mismos.

Según las directrices de la *Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF)*, los resultados se expresarán en Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) o en mililitros (ml) en función del estado de agregación de la materia del alimento (sólido o líquido respectivamente) (Camacho, 2014).

Para expresar el resultado se ha realizado la media aritmética de los valores obtenidos para una misma dilución y se ha multiplicado por el factor de dilución correspondiente para cada caso. Este factor de dilución es la inversa de la dilución:

$$UFC = \frac{p^1 + p^2 + p^3}{3}$$

Siendo p^1 , p^2 y p^3 el número de microorganismos correspondientes a las placas o tubos 1, 2 y 3.

El recuento de los microorganismos objeto de estudio se ha llevado a cabo según se detalla a continuación:

- **Recuento de *L. monocytogenes* (Norma ISO 11290:2017):** para detectar *L. monocytogenes* las muestras estudiadas (1,5 g) se pesaron en bolsas Stomacher, se diluyeron y se homogeneizaron con 225 ml de Fraser (enriquecimiento primario en medio caldo Fraser: incubación durante 25 ± 1 h; enriquecimiento secundario en caldo Fraser: incubación durante 24 ± 2 h). Después de este tiempo, la siembra se realizó en placas de agar *Listeria* PALCAM 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 h (más otras 24 ± 2 h a 37 ± 1 °C) (International Organization for Standardization, ISO 11290:2017).

- **Recuento de *C. perfringens* (Norma ISO 7937:2005):** para el recuento de *C. perfringens*, se utilizó como diluyente agua peptonada. Tras la inoculación de la muestra en placas de agar sulfito de hierro, se dispuso para su incubación en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante $20 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. En las placas con menos de 150 colonias, se seleccionaron cinco de ellas para su confirmación mediante siembra en agar gelatina lactosa desgasificado y se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 24 h (International Organization for Standardization, ISO 7937:2005).

- **Recuento de *B. cereus* (Norma ISO 7932:2005):** para el recuento de *B. cereus* se contaron las colonias en medio de agar manitol yema de huevo polimixina (MYP). Tras la siembra, las placas se incubaron a 30 °C durante 18-24 h. El recuento se realizó en placas que contenían menos de 150 colonias típicas (grandes, rosadas, con un halo de precipitación). Para la confirmación, se tomaron al menos cinco colonias presuntas y se sembraron en placas de agar sangre de carnero. Tras la incubación a 30 °C durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, *B. cereus* produce una reacción de hemólisis positiva (International Organization for Standardization, ISO 7932:2005).

- **Recuento de microorganismos mesófilos aerobios y microorganismos psicrófilos (Norma ISO 4833:2003):** para el recuento de microorganismos mesófilos aerobios se utilizó el método de vertido en placa, en agar de recuento en placa (medio PCA), seguido de incubación a 30 ± 1 °C durante 72 h (International Organization for Standardization, ISO 4833:2003).

Para los microorganismos psicrófilos, se utilizó la inoculación en placas con medio King Agar A, seguida de incubación durante 24-48 h a temperatura ambiente (20 °C) (International Organization for Standardization, ISO 4833:2003).

- **Recuento de mohos y levaduras (Norma ISO 21527-2:2008):** se realizó por el método de vertido en placa utilizando agar Sabouraud con cloranfenicol (agar Sabouraud dextrosa, según las normas aprendidas para alimentos y bebidas en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Madrid, España), seguido de incubación a 25 ± 1 °C durante 3-5 días (International Organization for Standardization, ISO 21527-2:2008).

3.3. Material utilizado

- **Stomacher.**
- **Gradillas.**
- **Tubos de ensayo.**
- **Tubos de cultivo.**
- **Matraz Erlenmeyer 100 ml.**
- **Pipetas estériles de 1 ml.**
- **Pipetas estériles de 10 ml.**
- **Placas de Petri estériles (90 mm de diámetro).**
- **Asa de Drigalski.**
- **Estufa de cultivo.**
- **Mortero.**
- **Cucharilla.**
- **Frascos de vidrio para enriquecer (resistentes a autoclave).**
- **Botellas para medios (resistentes a autoclave).**
- **Autoclave (Selecta Autester 437-G, Barcelona, España).**
- **Mechero.**
- **Vasos de precipitado de 1 litro.**
- **Agitador magnético con calentador.**
- **Hisopos estériles.**
- **Discos de papel de filtro.**
- **Agitador vórtex.**
- **Micropipeta.**

3.4. Tratamiento estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS 22.0 para Windows (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, EE.UU.). Los datos se expresaron como el promedio y error estándar sobre la media. Se aplicó el ANOVA, prueba de comparación para detectar las diferencias entre las medias y regresión lineal. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

4. Resultados y discusión

4.1. Análisis microbiológico de hierbas y condimentos deshidratados

Las Figuras 9, 10, 11, 12, 13 y 14 muestran los valores de crecimiento microbiano para los seis grupos de microorganismos considerados según las distintas hierbas aromáticas estudiadas. Se observa, de forma general, que la albahaca es la hierba aromática que presenta niveles de crecimiento superiores para la mayoría de los microorganismos:

- **Crecimiento microbiano para *L. monocytogenes*:** el valor medio de crecimiento promedio en tomillo fue significativamente más alto que el determinado para las otras hierbas aromáticas, seguido de la albahaca, que también fue significativamente más alto ($p < 0,001$) que el nivel de crecimiento promedio obtenido en romero y orégano (ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas hierbas, $p > 0,05$). Finalmente, en el clavo, este microorganismo presentó crecimiento nulo, significativamente menor que en el resto de hierbas aromáticas ($p < 0,001$).

Las diferencias indicadas en los valores del recuento microbiano, expresado como UFC/g de *L. monocytogenes* y atendiendo al tipo de hierba aromática, pueden apreciarse en la Figura 9:

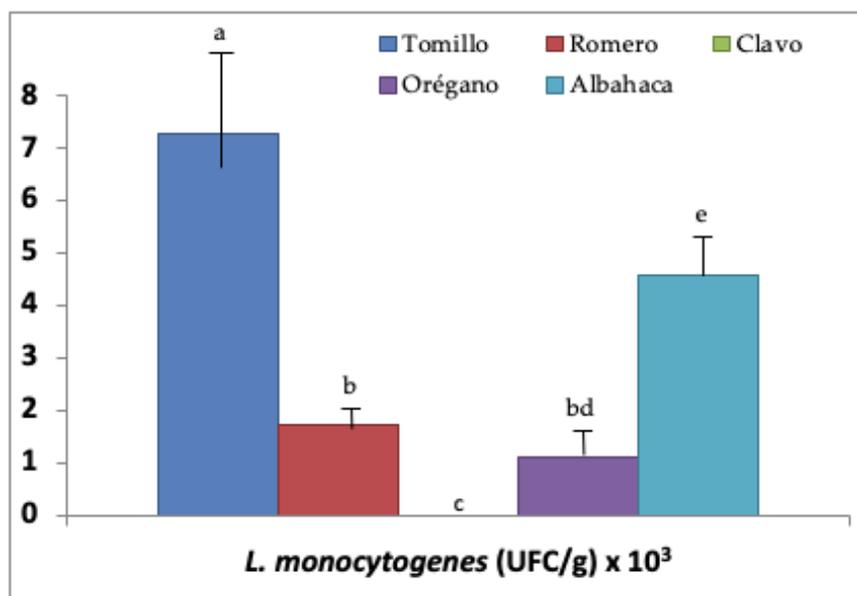


Figura 9. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *L. monocytogenes* en las hierbas aromáticas deshidratadas. ^{a,b,c,d,e} Recuentos microbianos medios; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,01$)

- **Crecimiento microbiano para *C. perfringens*:** su crecimiento promedio en albahaca fue significativamente mayor que en el resto de las hierbas aromáticas ($p < 0,01$), y en el clavo fue nulo y significativamente menor que en las otras hierbas ($p < 0,01$). Además, el crecimiento promedio en el romero fue significativamente menor que el del tomillo y el orégano ($p < 0,01$).

Las diferencias indicadas en los valores del recuento microbiano, expresado como UFC/g de *C. perfringens* y atendiendo al tipo de hierba aromática, pueden apreciarse en la Figura 10:

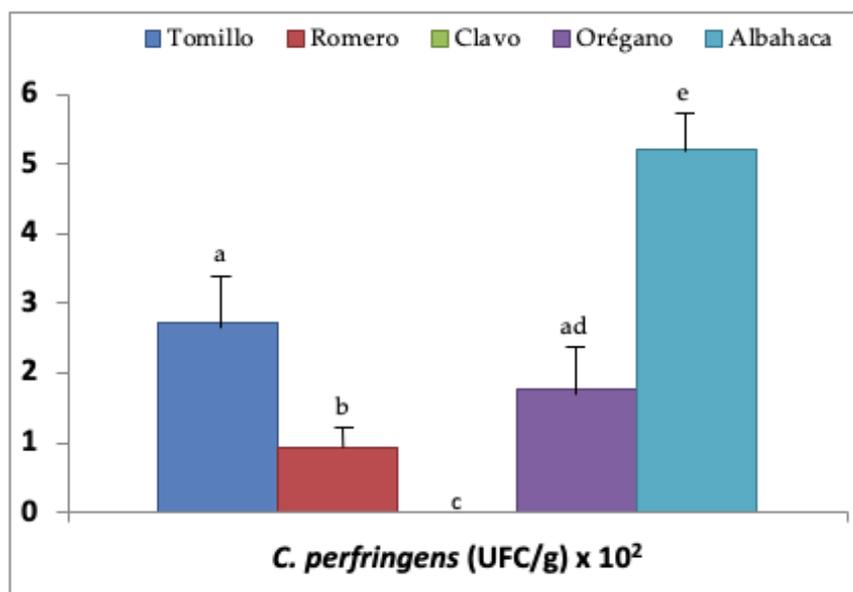


Figura 10. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *C. perfringens* en las hierbas aromáticas deshidratadas. ^{a,b,c,d,e} Recuentos microbianos medios; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,01$)

- **Crecimiento microbiano para *B. cereus*:** el valor de crecimiento medio de *B. cereus* en albahaca también fue significativamente más alto que el determinado para el romero, tomillo y clavo ($p < 0,001$). Además, tomillo y romero (sin diferencias entre los niveles medios de crecimiento de este microorganismo) mostraron significativamente mayores crecimientos ($p < 0,001$) que los clavos (donde el crecimiento es nulo). Por otro lado, el nivel medio de crecimiento de *B. cereus* en orégano fue significativamente mayor que en romero y tomillo ($p < 0,001$).

Las diferencias indicadas en los valores del recuento microbiano, expresado como UFC/g de *B. cereus* y atendiendo al tipo de hierba aromática, pueden apreciarse en la Figura 11:

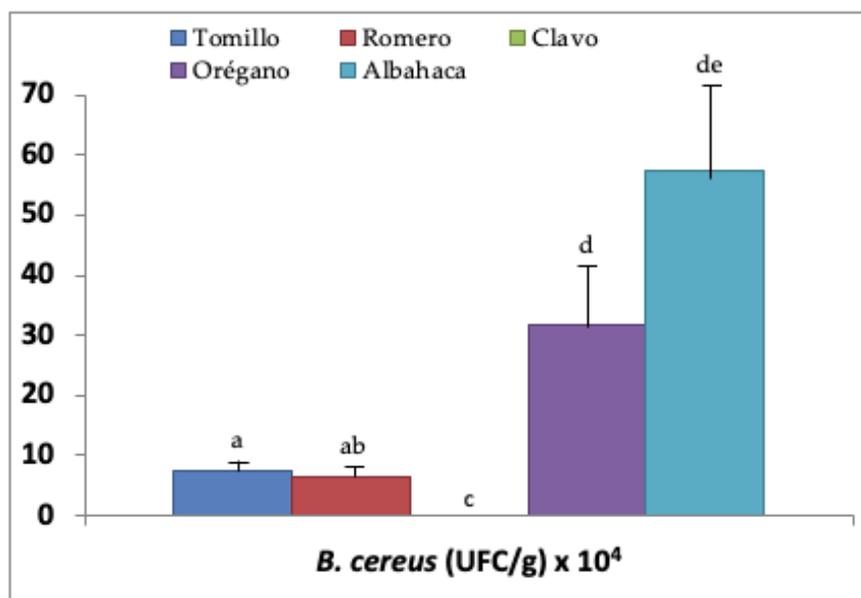


Figura 11. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *B. cereus* en las hierbas aromáticas deshidratadas. ^{a,b,c,d,e} Recuentos microbianos medios; distintos superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,001$)

- **Crecimiento de microorganismos mesófilos:** para los microorganismos mesófilos, la albahaca también tuvo la tasa de crecimiento más alta de todas las hierbas aromáticas ($p < 0,001$). Sin embargo, el orégano tuvo un crecimiento significativamente menor de microorganismos mesófilos en comparación a las otras hierbas aromáticas, a excepción del clavo.

Las diferencias indicadas en los valores del recuento microbiano, expresado como UFC/g de microorganismos mesófilos y atendiendo al tipo de hierba aromática, pueden apreciarse en la Figura 12:

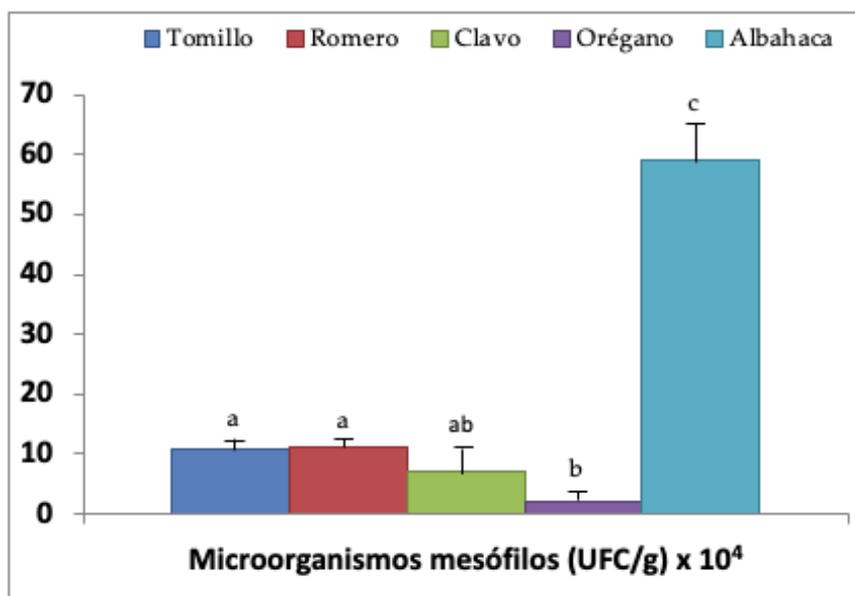


Figura 12. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos mesófilos en las hierbas aromáticas deshidratadas. ^{a,b,c} Recuentos microbianos medios; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,001$)

- **Crecimiento de microorganismos psicrófilos:** con respecto al crecimiento de microorganismos psicrófilos, la albahaca es la hierba aromática que más facilita su desarrollo en comparación con tomillo, romero, orégano y clavo ($p < 0,001$). Además, el crecimiento de microorganismos psicrófilos es significativamente mayor en presencia de tomillo que en clavo ($p < 0,05$).

Las diferencias indicadas en los valores del recuento microbiano, expresado como UFC/g de microorganismos psicrófilos y atendiendo al tipo de hierba aromática, pueden apreciarse en la Figura 13:

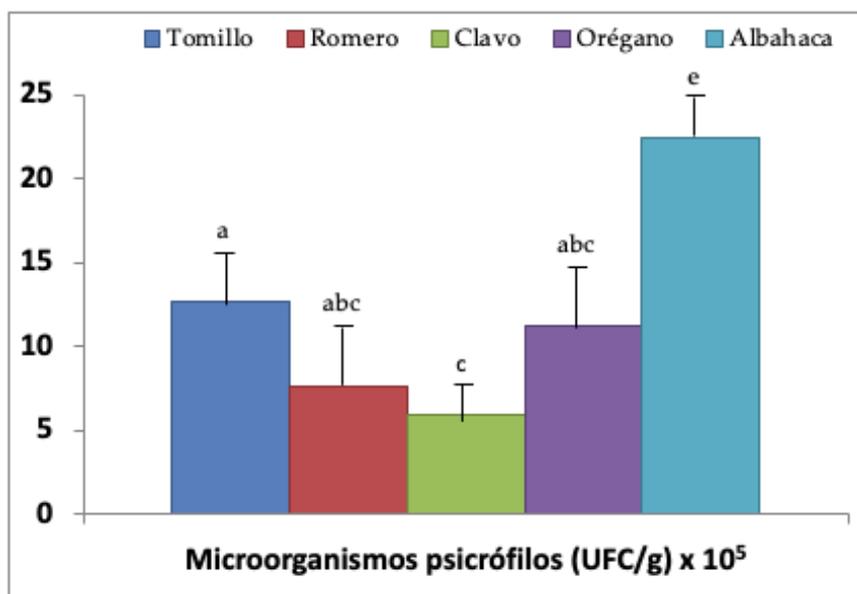


Figura 13. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos psicrófilos en las hierbas aromáticas deshidratadas. ^{a,b,c,e} Recuentos microbianos medios; distintos superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,001$)

- **Crecimiento microbiano para mohos y levaduras:** finalmente, con relación a los mohos y levaduras, la adición de albahaca al medio de cultivo conduce a una tasa de crecimiento estadística y significativamente mayor ($p < 0,001$) de estos microorganismos en comparación con todas las demás hierbas aromáticas; la única excepción es el romero, para el que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$).

Las diferencias indicadas en los valores del recuento microbiano, expresado como UFC/g de mohos y levaduras y atendiendo al tipo de hierba aromática, pueden apreciarse en la Figura 14:

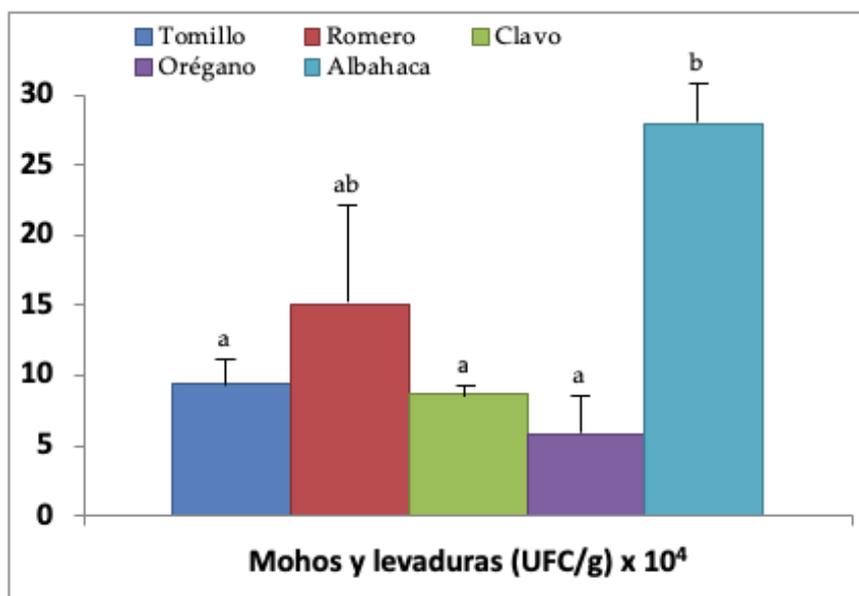


Figura 14. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para mohos y levaduras en las hierbas aromáticas deshidratadas. ^{a,b} Recuentos microbianos medios; distintos superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,001$)

En la Tabla 4 se recogen los recuentos medios medidos para los diferentes microorganismos en las hierbas estudiadas, según los sistemas de comercialización de estas especias:

Tabla 4. Valores de recuento microbiano (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) para los microorganismos objeto de estudio según el sistema de comercialización (a granel o en envase de vidrio o PET)

MICROORGANISMOS (UFC/g)	ENVASADO A GRANEL (Media ± EEM)	ENVASADO EN VIDRIO (Media ± EEM)	ENVASADO EN PET (Media ± EEM)
<i>L. monocytogenes</i>	5.119 ± 921 ^b	71 ± 17 ^a	601 ± 223 ^{ab}
<i>C. perfringens</i>	274 ± 38 ^a	142 ± 24 ^a	172 ± 36 ^a
<i>B. cereus</i>	286,851 ± 79,455 ^b	198,936 ± 77,352 ^a	55,286 ± 18,921 ^{ab}
Microorganismos mesófilos	184,792 ± 25,579 ^b	14,403 ± 4537 ^a	324,500 ± 104,357 ^{ab}
Microorganismos psicrófilos	2.488,507 ± 382,092 ^b	287,361 ± 62,082 ^a	1.245,643 ± 266,560 ^a
Mohos y levaduras	209,306 ± 24,368 ^c	73,833 ± 14,560 ^a	32,143 ± 13,416 ^b

^{a,b,c} Valores medios de los recuentos microbianos de los microorganismos estudiados; los distintos superíndices indican diferencias significativas entre los distintos sistemas de comercialización

^{a,b,c} Los valores medios de los recuentos microbianos fueron significativamente mayores en las hierbas aromáticas vendidas a granel frente a las envasadas en vidrio y PET para los microorganismos psicrófilos, y los mohos y levaduras, y frente a las envasadas en vidrio para *L. monocytogenes*, *B. cereus* y los microorganismos mesófilos ($p < 0,05$)

Como se puede apreciar, los valores de crecimiento microbiano se encuentran influenciados según el sistema de comercialización seguido. Específicamente, se observó que las hierbas aromáticas vendidas a granel se asociaron con un crecimiento microbiano significativamente mayor que las envasadas en PET y vidrio ($p < 0,05$). Además, las hierbas aromáticas vendidas a granel se asociaron con un crecimiento microbiano significativamente mayor que las hierbas envasadas en vidrio para *L. monocytogenes*, *B. cereus* y microorganismos mesófilos ($p < 0,05$), así como para mohos y levaduras.

Asimismo, las hierbas aromáticas vendidas en envases de vidrio se asociaron con un crecimiento microbiano significativamente mayor que los envasados en PET para mohos y levaduras ($p < 0,05$).

De todas las hierbas deshidratadas analizadas, el clavo es la hierba con mejor calidad higiénica, sin crecimiento microbiano detectable en *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus* (Figuras 9, 10 y 11 respectivamente). Algunos autores han señalado el efecto antimicrobiano de nanopartículas de óxido de cinc reforzadas con extractos de clavo y canela contra patógenos orales (Mohapatra *et al.*, 2020), por lo que podrían utilizarse como alternativa a los conservantes antimicrobianos comerciales disponibles. Otros autores (Volpe *et al.*, 2008) también probaron el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de clavo, en forma de películas compuestas cargadas con un 50 % de aceites esenciales en combinación con nanobarras de óxido de cinc, tanto en un modelo *in vitro* como en un modelo alimentario de mariscos pelados envasados durante el almacenamiento refrigerado (20 días), especialmente contra *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* previamente inoculada en el alimento.

Por el contrario, la albahaca es la hierba que presenta los recuentos microbianos más altos en *C. perfringens*, *B. cereus*, microorganismos mesófilos y mohos y levaduras, superando en el caso de *B. cereus* las dosis consideradas infecciosas.

Por otra parte, existen numerosos estudios que hablan del potente efecto antimicrobiano contra bacterias Gram positivas presentadas por aceites esenciales y extractos de clavo (Samapundo *et al.*, 2011; Dolea *et al.*, 2018). El eugenol, el mayor componente del aceite esencial de clavo, junto con carvacrol, actúan inhibiendo la producción de enzimas extracelulares, como amilasas y proteasas, que en su mayoría causan lisis celular de microorganismos como *L. monocytogenes* (Radaelli *et al.*, 2016). Quizás por eso en nuestro estudio, de todas las muestras analizadas, el que tenía el menor recuento microbiano fue el clavo, ya sea vendido a granel o envasado en PET o vidrio. Esto indicaría que esta especie podría usarse en el condimento de alimentos que van a ser consumidos crudos, sin dar lugar a una eventual enfermedad transmitida por alimentos, cosa que no ocurre con las otras hierbas estudiadas por nosotros, donde los recuentos microbianos en *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* y mohos y levaduras son muy altos.

Con relación a la calidad higiénica de las muestras analizadas, este estudio ha demostrado que las muestras vendidas a granel presentaban un alto grado de contaminación con respecto a *L. monocytogenes*, *B. cereus*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, presentando el tomillo, romero y albahaca los niveles más altos de contaminación microbiana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por ciertos autores (Sospedra *et al.*, 2010), que encontraron un alto grado de contaminación por patógenos alimentarios en muestras vendidas en puestos callejeros, posiblemente debido a una mayor contaminación ambiental, insalubres condiciones higiénicas y/o manipulación incorrecta en estos puestos.

Con respecto a *L. monocytogenes*, los valores medios de crecimiento microbiano fueron significativamente más altos en las hierbas vendidas a granel en comparación con las que se venden en envases de vidrio. *Listeria* es otra bacteria que indica una carencia de calidad higiénica en los establecimientos alimentarios, ya que es un patógeno ambiental que es capaz de formar biopelículas en las superficies a las que se adhiere. Este resultado coincide con el de otros autores (Silva *et al.*, 2012), quienes señalan que el riesgo de consumir alimentos contaminados con este microorganismo es de dos a tres veces mayor cuando se compra a vendedores ambulantes.

En los recuentos de crecimiento de *C. perfringens* que llevamos a cabo, la albahaca tuvo el mayor crecimiento microbiano, seguido de tomillo y romero (Figura 10). Sin embargo, para los aceites esenciales de las mismas hierbas, otros investigadores (European Food Safety Authority, 2005) informaron que, aunque todos sus aceites esenciales son bactericidas, la mínima concentración inhibitoria contra *C. perfringens* es diferente, siendo menor para el tomillo (1,25 mg/ml), seguido de albahaca (5 mg/ml), y más alto para romero (10 mg/ml).

Entre los principales factores que contribuyen a la contaminación de los alimentos por *B. cereus*, están equipos e instalaciones de alimentos no suficientemente limpios y desinfectados y malas condiciones de higiene en los lugares de procesamiento y preparación de alimentos (Suppakul *et al.*, 2003). Esta podría ser la razón por la que este microorganismo presenta altos niveles de crecimiento en general en las hierbas que se venden a granel, como se ha observado en este estudio (Tabla 4).

Respecto a los microorganismos aerobios mesófilos, encontramos que el orégano tiene la menor cantidad de recuentos microbianos, significativamente más bajos que los de tomillo, romero y albahaca. Sin embargo, otros investigadores (Sokovic *et al.*, 2006) reportan recuentos más altos de microorganismos mesófilos en hamburguesas de salmón y algas tratadas con aceites esenciales de orégano que cuando son tratados con aceites esenciales de tomillo.

Algunos investigadores (Silva *et al.*, 2012) compararon la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de 10 plantas aromáticas contra diferentes contaminantes de alimentos tales como *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus*, entre otras bacterias, y concluyeron que los aceites esenciales más activos son los de tomillo y orégano, mientras que el menos activo es el de albahaca, que ni siquiera tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. Es posible que en las muestras deshidratadas utilizadas en nuestro estudio, la concentración muy baja existente de aceites esenciales no esté directamente relacionado con el mayor o menor crecimiento microbiano, de ahí la discrepancia observada con los estudios mencionados anteriormente.

Por otro lado, la albahaca presenta los mayores recuentos de *C. perfringens* (Figura 10), *B. cereus* (Figura 11), microorganismos mesófilos (Figura 12), microorganismos psicrófilos (Figura 13) y mohos y levaduras (Figura 14), superando en el caso de *B. cereus* las dosis consideradas infecciosas. El poder antifúngico y la actividad antibacteriana de la albahaca ha sido destacada por varios autores (Miranda *et al.*, 2011; Dghaim *et al.*, 2015; Hanif *et al.*, 2017), aunque todos están de acuerdo que este efecto se debe al alto contenido en linalol del aceite esencial obtenido a partir de extractos de albahaca y no a la hierba en sí. En nuestro estudio, podemos ver como el empleo de esta hierba deshidratada, adquirida a granel como condimento de alimentos que no van a ser sometidos a ningún tratamiento térmico antes de su consumo (como es el caso de ensaladas de verduras y pasta aromatizadas con albahaca, alimentos listos para consumir y ciertos derivados cárnicos crudos curados), podría eventualmente conducir a una enfermedad de transmisión alimentaria, especialmente debido a la alta carga microbiana que esta hierba aromática presenta de *B. cereus*, *C. perfringens* y microorganismos esporulados capaces de sobrevivir al procesamiento. Esto, junto con una conservación inadecuada (Coles *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2019), como ocurre en la venta a granel, explicaría los altos recuentos microbianos encontrados en las muestras que analizamos (Tabla 4).

Por lo tanto, estos hallazgos muestran la importancia de las prácticas de higiene adecuadas y las medidas que deben tomarse en la recolección de hierbas aromáticas, como la albahaca, hasta que lleguen al consumidor final, como otras anteriormente indicadas hierbas tradicionales de gran consumo en el mundo oriental (Zhang *et al.*, 2014).

En este trabajo hemos comprobado que en las cantidades en las que se utilizan habitualmente para fines culinarios, el muy bajo nivel de aceites esenciales (datos no evaluados; esto se llevará a cabo en futuros estudios) no ejerce el efecto antimicrobiano esperado y reportado en varios estudios de investigación (European Food Safety Authority, 2005; Hinneburg *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2011; Dghaim *et al.*, 2015; Embusca-do, 2015; Lechowicz *et al.*, 2015; Food Safety Authority of Ireland, 2016; Radaelli *et al.*, 2016; Bassanetti *et al.*, 2017; Hanif *et al.*, 2017; Nawaz *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2018; Dolea *et al.*, 2018; Mohammadi *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2019; Weisany *et al.*, 2019; Cantú-Valdéz *et al.*, 2020; Mohapatra *et al.*, 2020). En estos estudios, los aceites esenciales extraídos de estas hierbas aromáticas son utilizados directamente, lo que lleva a la propuesta de que podrían ser una alternativa natural a los productos químicos inorgánicos conservantes. Por otro lado, si las condiciones de almacenamiento, venta, manipulación, procesamiento tecnológico, etc., no son adecuadas, estas hierbas aromáticas pueden actuar como vehículos para microorganismos patógenos (Suppakul *et al.*, 2003; Sospedra *et al.*, 2010) responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos, como hemos demostrado en este estudio, principalmente en el caso de la albahaca.

Como informaron varios autores (Papageorgiou *et al.*, 2003; Zengin *et al.*, 2008), tanto los sistemas de envasado en vidrio como en PET tienen excelentes propiedades de barrera contra gases como el oxígeno y el dióxido de carbono debido al denso empaque de sus moléculas, lo que dificulta la permeabilidad de los gases. Esto, junto con sus propiedades de barrera contra microorganismos del medio ambiente (Sekeroglu *et al.*, 2008), podría explicar por qué, en nuestro estudio, el promedio de los valores de crecimiento microbiano fue significativamente más alto en las hierbas aromáticas vendidas a granel que en las comercializadas en envases de vidrio y PET para microorganismos psicrófilos, mohos y levaduras, y en comparación con los que se venden en envases de vidrio para *L. monocytogenes*, *B. cereus* y microorganismos mesófilos.

Para algunos autores (Miranda *et al.*, 2011), la calidad de las nueces envasadas con albaricoques y pasas depende de la naturaleza del espacio de cabeza dentro del recipiente y de la permeabilidad al agua y al oxígeno a través del envase durante almacenamiento. Para estos autores, el vidrio es un excelente material a la hora de proteger la calidad de estos alimentos debido a su inercia e impermeabilidad químicas. Una de las razones por las que el PET ha desplazado al vidrio es por su ligereza, lo que permite reducir los costes de transporte.

En nuestro estudio, la comercialización de las hierbas analizadas en envases de vidrio y PET mejora la calidad higiénica con respecto a los vendidos a granel. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes microorganismos estudiados según el sistema de envasado (vidrio y PET), a excepción de microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos.

El PET es más impermeable al dióxido de carbono que al oxígeno, lo que permite que el nivel de oxígeno en el espacio de cabeza aumente durante los primeros meses de almacenamiento hasta que la concentración de oxígeno externo es igualada. Esto podría explicar por qué en nuestro estudio, en general, las muestras envasadas en PET tenían menos recuentos microbianos que las vendidas a granel, en términos de microorganismos psicrófilos y mohos y levaduras, ya que el PET puede crear pasivamente una atmósfera modificada beneficiosa dentro del envase, estableciendo un equilibrio entre la intensidad de la respiración del producto y la transmisión de oxígeno y dióxido de carbono a través de la película, lo que se traduce en una menor intensidad de crecimiento microbiano al desacelerarlo (Obiajunwa *et al.*, 2002).

4.2. Análisis microbiológico de hierbas y condimentos frescos

En este apartado se han analizado plantas aromáticas frescas envasadas en tarritas de tereftalato de polietileno (PET) y en bolsas de papel de celofán y vendidas igualmente en un centro comercial. Se han sustituido las especies botánicas de romero, clavo y orégano (al no encontrarlas frescas) por cilantro, hierbabuena y perejil, siendo dichas especies también muy utilizadas en el ámbito de la restauración casera y colectiva y dentro de la cocina popular española.

En las Tablas 5 y 6 se recogen los resultados de los análisis microbianos de las plantas aromáticas frescas según los sistemas de envasado (dónde no hay datos es que no hubo crecimiento):

Tabla 5. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) en hierbas aromáticas frescas envasadas en bolsas de papel celofán

PLANTA	<i>L. monocytogenes</i> Media ± EEM (n=4)	<i>C. perfringens</i> Media ± EEM (n=4)	<i>B. cereus</i> Media ± EEM (n=4)	Mesófilos Media ± EEM (n=4)	Psicrófilos Media ± EEM (n=4)	Mohos y levaduras Media ± EEM (n=4)
Tomillo	n.d.	2,77 x 10 ² ± 0,6 x 10 ¹	4,50 x 10 ⁵ ± 0,55 x 10 ⁵	6,77 x 10 ⁷ ± 0,65 x 10 ⁷	7,60 x 10 ⁷ ± 0,26 x 10 ⁷	4,61 x 10 ⁶ ± 0,35 x 10 ⁶
Perejil	n.d.	n.d.	5,30 x 10 ⁵ ± 0,44 x 10 ⁵	4,72 x 10 ⁷ ± 0,32 x 10 ⁷	4,15 x 10 ⁷ ± 0,85 x 10 ⁷	5,31 x 10 ⁶ ± 0,23 x 10 ⁶
Cilantro	1,45 x 10 ⁴ ± 7,07 x 10 ²	2,87 x 10 ² ± 0,42 x 10 ²	6,11 x 10 ⁵ ± 0,72 x 10 ⁵	5,67 x 10 ⁷ ± 0,40 x 10 ⁷	3,81 x 10 ⁷ ± 0,77 x 10 ⁷	5,64 x 10 ⁶ ± 0,25 x 10 ⁶
Albahaca	n.d.	2,63 x 10 ¹ ± 0,33 x 10 ¹	5,41 x 10 ⁵ ± 0,75 x 10 ⁵	5,87 x 10 ⁷ ± 0,63 x 10 ⁷	2,79 x 10 ⁷ ± 0,19 x 10 ⁷	7,82 x 10 ⁶ ± 0,30 x 10 ⁶
Hierbabuena	n.d.	n.d.	4,83 x 10 ⁵ ± 0,85 x 10 ⁵	7,74 x 10 ⁷ ± 1,19 x 10 ⁷	3,56 x 10 ⁷ ± 1,29 x 10 ⁷	7,53 x 10 ⁶ ± 1,54 x 10 ⁶

Tabla 6. Recuentos microbianos medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) en hierbas aromáticas frescas envasadas en tarrinas de PET

PLANTA	<i>L. monocytogenes</i> Media ± EEM (n=4)	<i>C. perfringens</i> Media ± EEM (n=4)	<i>B. cereus</i> Media ± EEM (n=4)	Mesófilos Media ± EEM (n=4)	Psicrófilos Media ± EEM (n=4)	Mohos y levaduras Media ± EEM (n=4)
Tomillo	6,63 x 10 ³ ± 0,38 x 10 ³	4,85 x 10 ² ± 0,6 x 10 ²	5,63 x 10 ⁴ ± 0,31 x 10 ⁴	5,61 x 10 ⁵ ± 0,55 x 10 ⁵	1,62 x 10 ⁶ ± 0,26 x 10 ⁶	3,35 x 10 ⁵ ± 0,54 x 10 ⁵
Perejil	4,98 x 10 ³ ± 0,91 x 10 ³	5,95 x 10 ² ± 0,70 x 10 ²	8,67 x 10 ⁴ ± 0,54 x 10 ⁴	5,77 x 10 ⁵ ± 0,30 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁶ ± 0,85 x 10 ⁶	4,51 x 10 ⁵ ± 1,54 x 10 ⁵
Cilantro	5,25 x 10 ³ ± 1,07 x 10 ³	5,44 x 10 ² ± 0,52 x 10 ²	8,71 x 10 ⁴ ± 0,82 x 10 ⁴	4,77 x 10 ⁵ ± 0,32 x 10 ⁵	8,00 x 10 ⁶ ± 0,77 x 10 ⁶	3,54 x 10 ⁵ ± 0,93 x 10 ⁵
Albahaca	5,99 x 10 ³ ± 0,87 x 10 ³	8,60 x 10 ² ± 1,33 x 10 ²	7,50 x 10 ⁴ ± 1,75 x 10 ⁴	6,87 x 10 ⁵ ± 1,74 x 10 ⁵	7,90 x 10 ⁶ ± 1,19 x 10 ⁶	6,38 x 10 ⁵ ± 1,54 x 10 ⁵
Hierbabuena	6,24 x 10 ³ ± 0,86 x 10 ³	8,85 x 10 ² ± 0,61 x 10 ²	5,94 x 10 ⁴ ± 0,89 x 10 ⁴	7,83 x 10 ⁵ ± 1,39 x 10 ⁵	6,63 x 10 ⁶ ± 1,29 x 10 ⁶	6,51 x 10 ⁵ ± 1,54 x 10 ⁵

Como podemos observar, en general, las hierbas aromáticas envasadas en papel celofán presentan mayores recuentos en microorganismos aerobios tales como microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, mohos y levaduras y *B. cereus* que en las plantas envasadas en tarrinas de PET; esto se debe a las diferentes propiedades de barrera que presentan estos materiales de envasado frente a agentes causantes de alteraciones alimentarias como el oxígeno el dióxido de carbono y el vapor de agua. El papel celofán es una película de celulosa regenerada, agua y un humectante adecuado (plastificante o suavizante), que es generalmente glicerol, el cual le confiere a este material de envasado unas excelentes propiedades de barrera frente al vapor de agua. Esto hace que sea muy utilizado a la hora de envasar estas hierbas frescas, ya que va a impedir durante más tiempo el proceso de deshidratación natural de las mismas. Sin embargo, su alta permeabilidad al oxígeno facilita el crecimiento de microorganismos aerobios (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos y *B. cereus*); de ahí que en todas las muestras analizadas, y especialmente en las envasadas en papel celofán, se supere en todos los casos los valores máximos permitidos por la legislación española (10⁵ UFC/g), existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con los valores obtenidos para estas muestras cuando son comercializadas en tarrinas de PET.

Asimismo, el alto recuento obtenido en las hierbas frescas envasadas en papel celofán para mohos y levaduras pudiera deberse a que este material de envasado, al presentar una alta barrera frente al vapor de agua, hace que éste condense dentro de las paredes internas de la bolsa aumentando la actividad de agua (a_w) en el interior del envase y facilitando así que las hierbas se marchiten y se vuelvan blandas con el paso del tiempo, pudiendo aparecer este tipo de microorganismos que son capaces de acelerar la putrefacción y, consecuentemente, inducir cambios químicos en las mismas. Si comparamos el crecimiento de mohos y levaduras en las hierbas frescas envasadas en tarrinas de PET, aunque es ligeramente menor, sigue siendo muy alto, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,065$) respecto a las envasadas en papel celofán.

El PET es más impermeable al dióxido de carbono que al oxígeno, y esto va a permitir que, como consecuencia del propio efecto reductor de los alimentos, los niveles de oxígeno en el interior de estos envases vayan disminuyendo durante el proceso de almacenamiento y aumentando los niveles de dióxido de carbono en el interior de los mismos (de Francisco *et al.*, 2015). Este hecho pudiera explicar el mayor grado de contaminación por microorganismos anaerobios, como *L. monocytogenes*, que presentan las hierbas envasadas en PET respecto a las envasadas en papel celofán y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$); lo mismo sucede con el crecimiento en otros patógenos anaerobios como *C. perfringens*. En general, las muestras envasadas en PET presentan recuentos mayores en este microorganismo que las envasadas en papel celofán, con valores de $p < 0,001$ y superándose en todos los casos los niveles considerados como higiénicamente seguros. A la vista de estos resultados, y al tratarse ambos microorganismos de patógenos especialmente peligrosos (sobre todo en poblaciones de riesgo tales como ancianos, embarazadas, inmunodeprimidos, etc.), no parece el PET el material de envasado más adecuado a la hora de garantizar la calidad higiénico-sanitaria de las hierbas frescas analizadas (Tabla 6), al permitir las condiciones idóneas para el crecimiento de microorganismos anaerobios responsables de enfermedades de transmisión alimentaria tales como *L. monocytogenes* y *C. perfringens*.

Estos resultados coinciden con los reportados por otros investigadores (Sospedra *et al.*, 2010) que, al analizar la calidad microbiológica de 53 muestras de especias y hierbas aromáticas frescas como el tomillo y el orégano (que se venden en los mercados españoles), encontraron que el 20 % de las especias estaban contaminadas con microorganismos aerobios mesófilos y el 26 % con enterobacteriáceas. En nuestro estudio hemos encontrado que, en general, las hierbas frescas presentan recuentos microbianos muy altos cuando se comercializan en envases de PET para *L. monocytogenes* y *C. perfringens* y cuando se utilizan envases de papel celofán se potencia el crecimiento de microorganismos aerobios (*B. cereus*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras) frente al crecimiento de microorganismos anaerobios por la alta permeabilidad al oxígeno que presenta el papel celofán frente al PET:

Tabla 7. Recuentos medios expresados en UFC/g y error estándar para los microorganismos objeto de estudio en hierbas aromáticas frescas según sistemas de comercialización

MICROORGANISMOS (UFC/g)	ENVASADO EN PAPEL CELOFÁN* Media ± EEM (n=3)	ENVASADO EN PET** Media ± EEM (n=3)
<i>L. monocytogenes</i>	1,49 x 10 ¹ ± 0, 6x 10 ¹ ^a	5,82 x 10 ³ ± 0,80 x 10 ³ ^{ab}
<i>C. perfringens</i>	1,66 x 10 ¹ ± 0,26 x 10 ¹ ^a	6,74 x 10 ² ± 0,74 x 10 ² ^{ab}
<i>B. cereus</i>	5,23 x 10 ⁵ ± 0,66 x 10 ⁵ ^c	7,28 x 10 ⁴ ± 0,86 x 10 ⁴ ^d
Microorganismos mesófilos	6,15 x 10 ⁷ ± 0,64 x 10 ⁷ ^c	6,17 x 10 ⁵ ± 0,86 x 10 ⁵ ^d
Microorganismos psicrófilos	4,38 x 10 ⁷ ± 0,66 x 10 ⁵ ^c	5,44 x 10 ⁶ ± 0,86 x 10 ⁶ ^d
Mohos y levaduras	6,16 x 10 ⁶ ± 0,51 x 10 ⁶ ^c	4,84 x 10 ⁵ ± 1,19 x 10 ⁵ ^d

^{a,b,c,d} Las medias con letras diferentes dentro de una columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

*Permeabilidad (cm³/m²/bar) al oxígeno (1000-2000) y vapor de agua (5-10) del material de envasado. ** Permeabilidad (cm³/m²/bar) al oxígeno (113-200) y dióxido de carbono (0,002-0,005) del material de envasado

Con excepción de *B. cereus*, los microorganismos mesófilos y los microorganismos psicrófilos no son responsables de enfermedades de transmisión alimentaria, por lo que el papel celofán podría ser un buen sistema de envasado a la hora de comercializar estas hierbas frescas; su mayor permeabilidad al oxígeno que al dióxido de carbono favorece un ambiente aerobio en el interior del envase que limitaría el crecimiento de bacterias anaerobias peligrosas para la salud como *L. monocytogenes* y *C. perfringens*. Además, el papel celofán genera un ambiente estanco donde la humedad queda retenida. Esto, combinado con las bajas temperaturas de refrigeración y su alta permeabilidad al oxígeno, favorecería un ambiente aerobio dentro del envase nada propicio para el crecimiento de patógenos anaerobios como *L. monocytogenes* y *C. perfringens*.

Ciertos autores (Settanni *et al.*, 2012) demuestran como *L. monocytogenes* puede sobrevivir en suelo modificado por abonos orgánicos durante todo el ciclo de cultivo de rúcula y albahaca. En este estudio se pone de manifiesto como la contaminación de suelos donde se cultiva rúcula y albahaca puede deberse al empleo de abonos orgánicos no debidamente tratados, lo que provoca una transferencia de este microorganismo desde los suelos de cultivo a las hojas de albahaca y rúcula. En nuestro caso (Figura 15), la hierba que presenta un mayor recuento microbiano en *L. monocytogenes* es el cilantro, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) con otras como el perejil y el tomillo. En cualquier caso, la presencia de *L. monocytogenes* en las muestras frescas analizadas por nosotros es muy alta, con niveles superiores a los que se consideran higiénicamente seguros, por lo que el empleo de estas hierbas en preparaciones culinarias que no requieran tratamiento térmico podría suponer un factor de riesgo, especialmente en poblaciones vulnerables:

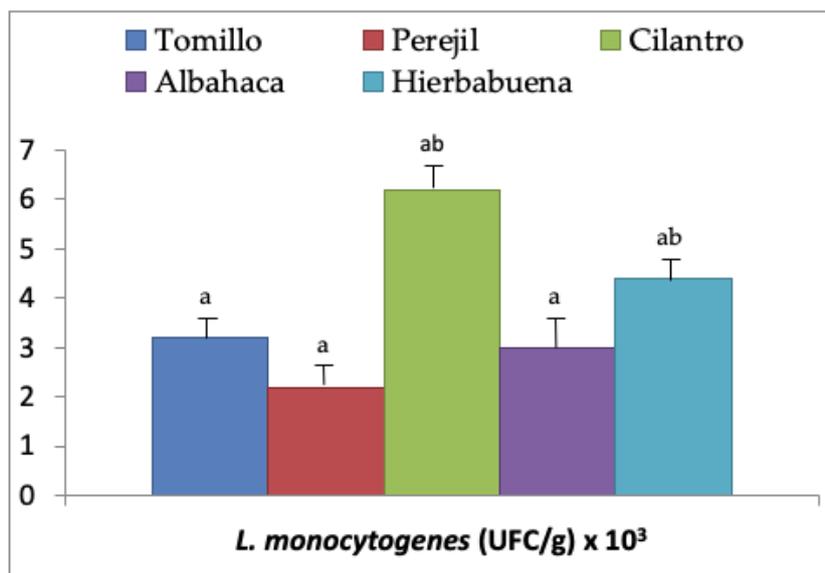


Figura 15. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *L. monocytogenes* en hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas* ($p < 0,001$)

Muchas de estas hierbas frescas se consumen crudas mezcladas en ensaladas (a menudo con otras verduras) o se cocinan en diversas preparaciones culinarias (Chartier, 2018). Así, por ejemplo, en Italia la albahaca se usa a menudo en pizzas y se añade inmediatamente después de finalizado el proceso de horneado para que no se marchite con el calor. Últimamente, el cultivo de esta planta aromática se ha extendido enormemente por muchos países de la cuenca mediterránea ya que, a sus propiedades aromáticas tan apreciadas en cocina, se unen sus propiedades medicinales. En nuestro estudio, todas las plantas aromáticas frescas presentan altos recuentos en *C. perfringens* y muy especialmente la albahaca y la hierbabuena, con valores que duplican las dosis consideradas como seguras (Figura 16). Tradicionalmente muchas hierbas y especias inhiben el crecimiento de microorganismos, especialmente bacterias Gram positivas:

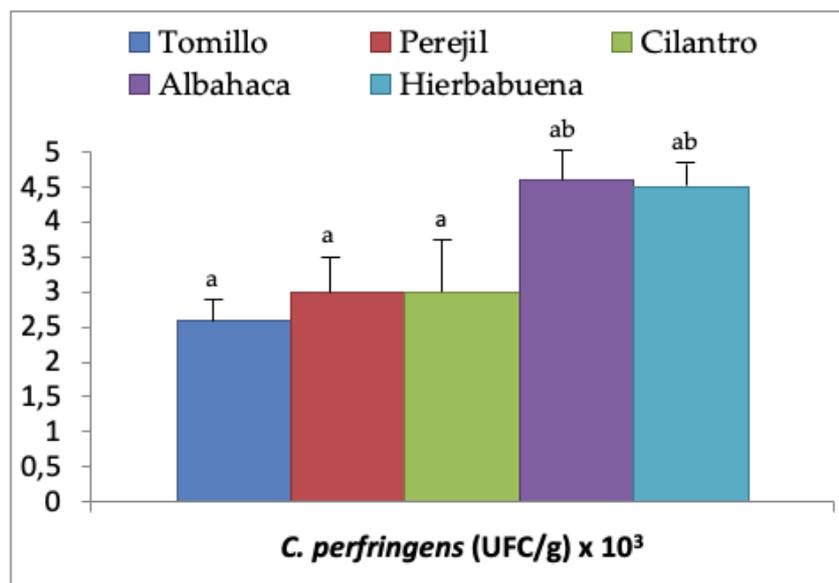


Figura 16. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *C. perfringens* en hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

Sin embargo, la actividad antimicrobiana varía en función de la especia y se debe realmente a los aceites esenciales que poseen en su composición (tipo derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente). Precisamente, una de las desventajas del uso de hierbas y especias como agentes conservadores es que se necesita una alta concentración de las mismas para obtener un efecto de preservación y, por lo tanto, producirían alteraciones no deseables en el sabor.

Estudios llevados a cabo por diversos autores (Roller *et al.*, 2002; Nychas *et al.*, 2003) muestran un espectro activo muy estrecho, es decir, sólo son activas estas hierbas y especias frente a determinados microorganismos y la cantidad de principio activo en la especia es tan pequeño que resulta tremendamente caro aislarlo y purificarlo para su preparación comercial. Otro inconveniente es que estas hierbas pueden presentar un alto grado de contaminación por bacterias ubicuas, como *C. perfringens*, *Clostridium botulinum* y *B. cereus*, al estar expuestas a una amplia variedad de contaminantes antes y después de su producción, por lo que se recomienda “mejorar las condiciones sanitarias en las fases de producción de las hierbas aromáticas y especias para prevenir riesgos de salud” (Nychas *et al.*, 2003) por microorganismos como *C. perfringens* y *B. cereus* productores de esporas, que son capaces de resistir condiciones ambientales muy adversas durante la etapa de almacenamiento.

En general, los resultados de este estudio muestran “una calidad microbiológica pobre” de las hierbas y especias frescas analizadas con altos recuentos en todas ellas de *C. perfringens* y *B. cereus*, especialmente en la albahaca y la hierbabuena. Es el tomillo fresco la especia que presenta una mejor calidad higiénico-sanitaria, resultados estos que concuerdan con los obtenidos por otros autores (Sospedra *et al.*, 2010) debido probablemente a la mayor presencia en ésta de aceites esenciales con propiedades antibacterianas (Figura 17):

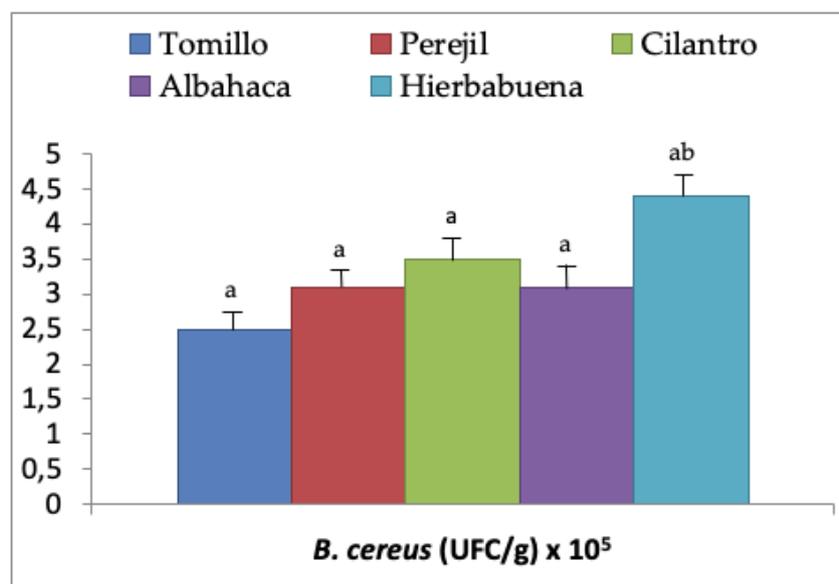


Figura 17. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *B. cereus* en hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

Diversos estudios (European Food Safety Authority, 2016) muestran que los alimentos de mayor riesgo de contaminación con *B. cereus* son los platos elaborados con carnes, pescados, vegetales, arroz, pasta (albóndigas, estofados, púdines, ensaladas, paellas, etc.) y las especias. En nuestro caso, todas las muestras analizadas tienen un alto grado de contaminación por *B. cereus*, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en los valores encontrados entre tomillo, perejil, cilantro y albahaca; por el contrario, sí existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre estas cuatro hierbas y la hierbabuena.

La Agencia Federal Belga de Seguridad de la Cadena Alimentaria (*Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire*, AFSCA) publicó en su informe anual del año 2014 que al menos 1.789 personas enfermaron y de ellas 64 fueron hospitalizadas, siendo *B. cereus* el agente más comúnmente identificado en cuanto al origen de los brotes alimentarios y los “*alimentos listos para consumo*”, siendo las especias los alimentos más implicados en estos casos de enfermedad de transmisión alimentaria (Denayer *et al.*, 2015).

En relación con el contenido en microorganismos mesófilos, todas las hierbas frescas analizadas presentan recuentos muy superiores a los límites considerados higiénicamente seguros, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la hierbabuena y el tomillo con relación al perejil, cilantro y albahaca (Figura 18):

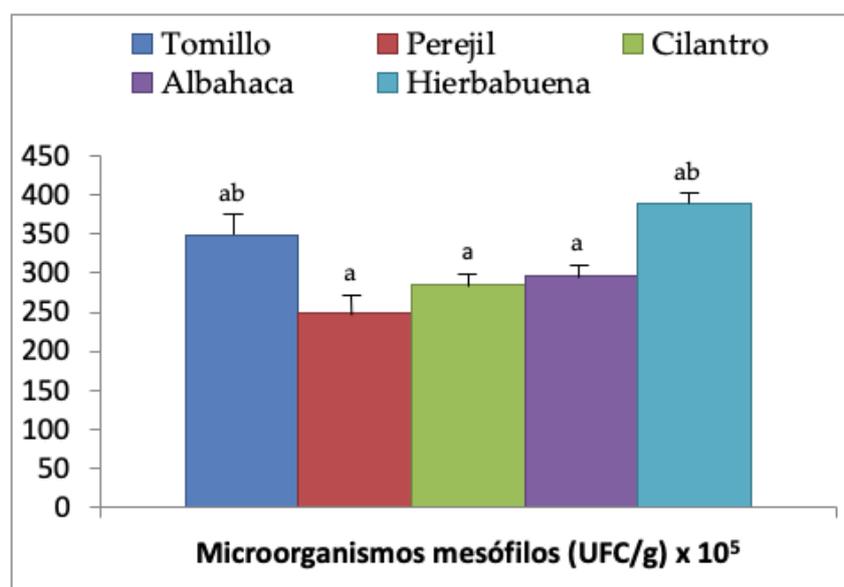


Figura 18. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos mesófilos en hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)*

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones normales, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos y refleja la calidad sanitaria de los productos analizados así como las condiciones higiénicas en las que fueron manipulados durante su elaboración. Si bien es cierto que un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica la ausencia de patógenos o sus toxinas, un recuento elevado puede significar una excesiva contaminación de la materia prima por deficiente manipulación durante el proceso de elaboración así como la inmediata alteración del producto. Todas las hierbas frescas analizadas en nuestro estudio presentan valores en microorganismos mesófilos muy superiores a los encontrados en las hierbas deshidratadas, con independencia del sistema de comercialización seguido. Un número elevado de bacterias aerobias mesófilas que crecen bien a temperatura corporal o próxima a ella, significa que pueden haberse dado condiciones favorables a la multiplicación de microorganismos patógenos para el hombre como *L. monocytogenes*, los cuales, en las hierbas frescas y especialmente en el cilantro y hierbabuena, alcanzan valores muy superiores a los considerados higiénicamente seguros.

En nuestro estudio la abundante presencia de microorganismos marcadores de calidad higiénica como mesófilos aerobios totales y *L. monocytogenes* nos estaría indicando las pésimas características higiénicas de los alimentos, que asimismo también perjudica la calidad de los mismos. Estos resultados están en concordancia con los encontrados por otros autores en alimentos tales como salsas de tomate y mahonesa (Perugachi *et al.*, 2012).

En relación con los microorganismos psicrófilos, el tomillo es la hierba que presenta mayores recuentos microbianos y con diferencias estadísticamente significativas respecto a perejil, albahaca y hierbabuena (Figura 19):

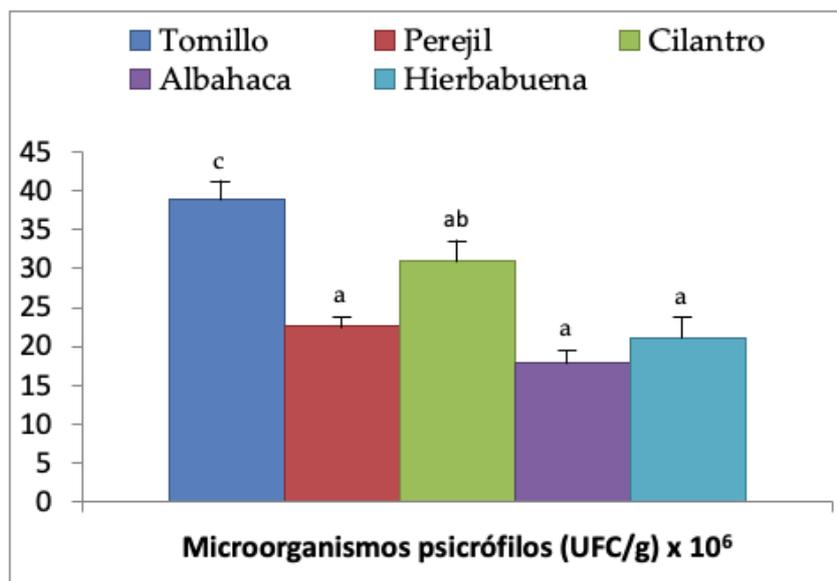


Figura 19. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos psicrófilos en hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas* ($p < 0,001$)

Estos microorganismos son capaces de crecer muy bien a temperaturas de refrigeración (en torno a los 5 °C), con un límite máximo de temperatura de crecimiento en torno a 15 °C y, de todos los microorganismos analizados en las hierbas frescas, son los que presentan mayores umbrales de crecimiento. Los microorganismos psicrófilos, junto con los mesófilos, y mohos y levaduras, son microorganismos deteriorantes de la calidad aunque no sean patógenos, y la elevada presencia de los mismos en los alimentos están asociados, en general, a prácticas higiénicas deficientes en los lugares de procesamiento industrial, comercialización y venta (Ramírez *et al.*, 2006). En nuestro estudio, todas las hierbas frescas presentan valores de cuatro a cinco veces superiores a los encontrados en las hierbas deshidratadas y con diferencias estadísticamente significativas entre un tipo y otro de hierbas ($p < 0,05$). Este mayor crecimiento microbiano de microorganismos psicrófilos en las hierbas frescas, con relación a las deshidratadas, estaría condicionado por el alto contenido en agua de las primeras, motivo éste que las convierte en una forma poco segura de utilizar estas hierbas como condimentos alimentarios, especialmente en poblaciones vulnerables a sufrir una enfermedad de transmisión alimentaria.

Según el estudio llevado a cabo por algunos autores en ensaladas frescas de IV Gama (Gekenidis *et al.*, 2017), no es posible descartar el riesgo para la salud del consumidor (en particular si se tiene en cuenta que estos productos “*frescos*” suelen consumirse directamente sin lavado previo), por el alto grado de contaminación en *B. cereus*, *L. monocytogenes* y mohos y levaduras que presentan. Los más vulnerables son los niños, las personas mayores, las mujeres embarazadas y las personas inmunodeprimidas. Los autores recomiendan almacenar las ensaladas preenvasadas a una temperatura máxima de 4 °C y consumirlas lo antes posible. Este trabajo concuerda con los resultados encontrados por nosotros en las hierbas frescas analizadas, que se comercializan todas ellas como productos de IV Gama, es decir hierbas aromáticas para consumo inmediato y previamente envasadas por la industria del sector. Nuestras muestras, especialmente la hierbabuena y el cilantro, se caracterizan por presentar, respectivamente, unos valores de *B. cereus* y *L. monocytogenes* muy superiores a los considerados higiénicamente seguros. Esto convertiría a estas especias en potenciales vehículos de enfermedades de transmisión alimentaria, especialmente si se utilizan para aderezar platos que no vayan a sufrir ningún tratamiento térmico posterior a la adición de las especias, como son ensaladas de vegetales, de pastas y de arroces en sus diversas versiones gastronómicas.

En el caso de los mohos y levaduras, la mayoría se desarrollan entre los 15 y 30 °C con un óptimo de crecimiento alrededor de 20-25 °C y, al ser microorganismos aerobios, la cantidad de oxígeno disponible es también un factor importante en su desarrollo. Por otro lado, el factor que más favorece el desarrollo de mohos y levaduras es la actividad de agua (a_w); la mayoría de ellos se desarrollan a una a_w comprendida entre 0,80 y 0,95. Las hierbas frescas son alimentos que se consideran altamente percederos por presentar valores de a_w superiores a 0,90. Este hecho puede condicionar que los recuentos encontrados en las muestras frescas analizadas por nosotros sean tan elevados, con valores superiores a los 25×10^5 UFC/g, y muy por encima de los encontrados en las hierbas deshidratadas, donde los valores máximos (hierbas deshidratadas a granel) no llegan a superar niveles de 21×10^4 UFC/g (Figura 20). Cabe citar a algunos tipos de hongos relacionados con la alteración higiénica de verduras y hortalizas frescas, como *Fusarium*, *Penicillium*, *Thamnidium* y *Cladosporium*, entre otros, que crecen muy bien en alimentos con alta actividad de agua y cuya presencia en los alimentos pueden resultar muy peligrosas al producir micotoxinas con actividad mutagénica demostrada (Jeddi *et al.*, 2014):

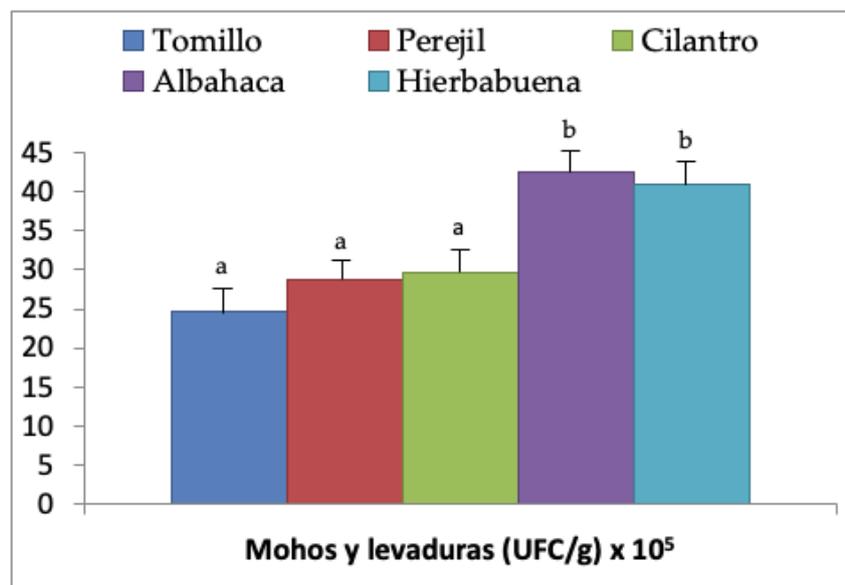


Figura 20. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para mohos y levaduras en hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)*

5. Conclusiones

1) En general, las hierbas y condimentos deshidratados comercializados a granel presentan un grado de contaminación muy elevado y, en la mayoría de los casos, exceden los límites máximos establecidos por la legislación española para *L. monocytogenes*, *B. cereus*, microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos, posiblemente debido a que en los herbolarios las muestras se exponen al público a granel y en cestos o cajas sin ningún sistema de envasado (y en ocasiones en tenderetes directamente en la vía pública), lo que conlleva un mayor riesgo de contaminación.

2) Las hierbas y condimentos deshidratados comercializados en botes de PET y de vidrio presentan una mejor calidad higiénica que las plantas aromáticas comercializadas frescas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las plantas aromáticas frescas y las deshidratadas comercializadas a granel a través de los herbolarios.

3) Los valores de crecimiento microbiano se encuentran influenciados según el sistema de comercialización seguido. En general, las muestras deshidratadas envasadas en PET presentan menores recuentos microbianos que las vendidas a granel, ya que el PET puede crear pasivamente una atmósfera modificada beneficiosa que equilibre la concentración entre el oxígeno y el dióxido de carbono a través del envase, lo que se traduce en una menor intensidad de crecimiento microbiano al desacelerarlo.

4) Por el contrario, cuando las hierbas frescas se comercializan en envases de PET, los recuentos en microorganismos anaerobios potencialmente peligrosos para la salud de los consumidores, como *L. monocytogenes* y *C. perfringens*, son muy elevados. Este hecho puede deberse a que la mayor actividad de agua de las hierbas frescas, unido a la atmósfera pasiva que se crea en el interior del envase de PET, propicie un ambiente anaerobio que favorezca el desarrollo de estos dos microorganismos.

5) Cuando las hierbas frescas se comercializan en envases de papel celofán se potencia el crecimiento de microorganismos aerobios (*B. cereus*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos y mohos y levaduras) frente al crecimiento de microorganismos anaerobios, por la alta permeabilidad al oxígeno que presenta el papel celofán frente al PET. Estos microorganismos aerobios no están ligados a enfermedades de transmisión alimentaria, por lo que esto no supone un riesgo para la salud de los consumidores.

6) En consecuencia, el tipo de envase a elegir vendrá condicionado por la forma en la que se encuentren estas hierbas y especias. En general, el PET mejora la calidad higiénica de las hierbas deshidratadas, mientras que el papel celofán se postula como el mejor sistema para comercializar hierbas y especias frescas.

6. Bibliografía

1. Agata, N.; Ohta, M.; Mori, M.; Isobe, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *129*, 17-20.
2. Aguado, J.; Calles, J.A.; Cañizares, P.; López, B.; Rodríguez, F.; Santos, A.; Serrano, P.D. Ingeniería de la industria alimentaria. Volumen I. Conceptos básicos. Ed. Síntesis **1999**.
3. Aguilar, A.E.; López, A. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* **2017**.
4. Ahn, J.; Grün, I.U.; Mustapha, A. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 148-155.
5. Alonso, M.J. Hierbas y especias. Utilidad alimentaria y usos medicinales. Col.legi de Farmacèutics de Barcelona **2008**.
6. Alvarado, R.E.; López, Y.K.; Orellana, M.A. Investigación de la Actividad Antimicrobiana de 25 Extractos de Especies Vegetales Utilizadas por la Población Materno-Infantil. Universidad de El Salvador **2003**.
7. Anderson, G.I.; Skeie, M.; Sørhaug, T.; Langsrud, T.; Granum, P.E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *69*, 237-46.
8. Andrade, M.; Ribeiro-Santos, R.; Costa Bonito, M.C.; Saraiva, M.; Sanchez-Silva, A. Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2018**, *92*, 497-508.
9. Arcila-Lozano, C.C.; Loarca-Piña, G.; Lecona-Urbe, S.; González de Mejía, E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch Latinoam. Nutr.* **2004**, *54*, 100-111.
10. Arora, D.S.; Kaur, J. Antimicrobial activity of spices. *Intl. J. Antimicrob. Agents* **1999**, *12*, 257-262.
11. Badei, A.Z.M.; Faheid, S.M.; El-Akel, A.; Mahmoud, B. Application of some spices in flavoring and preservation of cookies: 2 antimicrobial and sensory properties of cardamom, cinnamon, and clove. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch* **2002**, *98*, 261-265.

12. Bagamboula, C.F.; Uyttendaele, M.; Debevere, J. Inhibition effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalol and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 33-42.
13. Bara, M.T.F.; Vanetti, M.C.D. Antimicrobial effect of spices on the growth of *Yersinia enterocolitica*. *J. Herbs Spices Med. Plants* **1995**, *3*, 51-58.
14. Baratta, M.T.; Dorman, H.J.D.; Deans, S.G.; Biondi, D.M.; Ruberto, G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oil Res.* **1998**, *10*, 618-627.
15. Bassanetti, I.; Carcelli, M.; Buschini, A.; Montalbano, S.; Leonardi, G.; Pelagatti, P.; Tosi, G.; Massi, P.; Fiorentini, L.; Rogolino, D. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control* **2017**, *73*, 606-612.
16. Baydar, H.; Sağdıç, O.; Özkan, G.; Karadogan, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* **2004**, *15*, 169-172.
17. Beecher, D.J.; Schoeni, J.L.; Lee Wong, A.C. Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 4423-4428.
18. Benítez, G.; González-Tejero, M.R.; Molero Mesa, J. *Origanum vulgare* L. Inventario Español de Conocimientos Tradicionales (2^a Fase) **2014**.
19. Beuchat, L.R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 413-423.
20. Botanical on-line. Historia de las especias y plantas aromáticas **2021**.
21. Cano, E.; Cano, A.; Cano, A.; González, A. Flora medicinal y aromática **2007**, 183.
22. Cantú-Valdéz, J.A.; Gutiérrez-Soto, G.; Hernández-Martínez, C.A.; Sinagawa-García, S.R.; Quintero-Ramos, A.; Hume, M.E.; Herrera-Balandrano, D.D.; Méndez-Zamora, G. Mexican oregano essential oils as alternatives to butylated hydroxytoluene to improve the shelf life of ground beef. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 4555-4564.
23. Carbonero, P. Bioquímica de las fermentaciones. Universidad Politécnica de Madrid **1975**.
24. Castro-Ibáñez, I.; Gil, M.I.; Allende, A. Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2017**, *85*, 284-92.

25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Food Safety: *Clostridium perfringens* **2017**.
26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of listeriosis. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2000**, *49*, 1129-1130.
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Public health dispatch: outbreak of listeriosis-northeastern United States. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2002**, *51*, 950-951.
28. Cevallos, C.; Hernández-Pezzi, G.; Torres, A.; Ordoñez, P.; Villarubia, S.; Bleda, M.J. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Instituto de Salud Carlos III. Boletín Epidemiológico Semanal* **2005**, *13*, 25-36.
29. Chartier, F. La cocina aromática. Ed. Planeta **2018**.
30. Codex Alimentarius. Código de Prácticas de Higiene para Especies y Hierbas Aromáticas Desecadas. **2014**, CAC/RCP 42:18.
31. Coles, R.; Kirwan, M.J.; McDowell, D. Manual del Envasado de Alimentos y Bebidas **2004**, *311*.
32. Costa, D.C.; Costa, H.S.; Albuquerque, T.G.; Ramos, F.; Castilho, M.C.; Sanches-Silva, A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 336-54.
33. Cutter, C.N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium associated with beef. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 601-607.
34. Damjanović-Vratnica B. Herbal Extracts-Possibility of Preventing Food-Borne Infection. *Intech* **2016**, *32*, 137-144.
35. Dawson, S.J.; Evans, M.R.W.; Willby, D.; Bardwell, J.; Chamberlain, N.; Lewis, D.A. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. *Euro Surveill.* **2006**, *11*, 89-90.
36. De, M.; De, A.K.; Banerjee, A.B. Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 616-618.
37. de Francisco, R.; Imbernón, A. Envases de PET reciclado y su Uso en Alimentación. *Revista Plásticos Modernos* **2015**, *110*, 700.
38. Del Campo, J.; Amiot, M.J.; Nguyen-The, C. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 1359-1368.

39. Denayer, S.; Delbrassinne, L.; Botteldoorn, N.; Dierick, K. Rapport annuel Intoxications alimentaires en Belgique. Service scientifique Pathogènes alimentaires. *Laboratoire national de référence pour les toxiinfections alimentaires* **2015**.
40. Dghaim, R.; Khatib, S.A.; Rasool, H.; Khan, M.A. Determination of heavy metals concentrations in traditional herbs commonly consumed in the United Arab Emirates. *J. Environ. Res. Public Health* **2015**, 2015, 972878.
41. Dima, C.; Dima, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, 5, 29-35.
42. Directiva 2010/67/UE de la Comisión, de 20 de octubre de 2010, que modifica la Directiva 2008/84/CE, por la que se establecen criterios específicos de pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. L 277, de 20 de octubre de **2010**, 17-26.
43. Dolea, D.; Rizo, A.; Fuentes, A.; Barat, J.M.; Fernandez-Segovia, I. Effect of thyme and oregano essential oils on the shelf life of salmon and seaweed burgers. *Food Sci. Technol. Int.* **2018**, 24, 394-403.
44. Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. Ed. Acribia **2001**.
45. Draughon, F.A. Use of Botanicals as Biopreservatives in Foods. *Food Technol.* **2004**, 58, 20-28.
46. Duncan, S.E.; Moberg, K.; Amin, K.N.; Wright, M.; Newkirk, J.J.; Ponder, M.A.; Acuff, G.R.; Dickson, J.S. Processes to Preserve Spice and Herb Quality and Sensory Integrity During Pathogen Inactivation. *J. Food Sci.* **2017**, 82, 1208-1215.
47. Elgayyar, M.; Draughon, F.A.; Golden, D.A.; Mount, J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot.* **2001**, 64, 1019-1024.
48. Elviss, N.C.; Little, C.L.; Hucklesby, L.; Sagoo, S.; Surman-Lee, S.; de Pinna, E.; Threlfall, E.J. Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, 134, 83-88.
49. Embuscado, M.E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants - a mini review. *J. Funct. Foods* **2015**, 18, 811-819.

50. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. *EFSA J.* **2005**, 199, 1-65.
51. European Food Safety Authority (EFSA). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* **2016**; 14 (7):4524, 1-93.
52. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2019**; 17 (12):5926, 82-87.
53. European Spice Association (ESA). Quality Minima Document **2011**.
54. Farber, J.M.; Peterkin, P.I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol. Rev.* **1991**, 55, 476-511.
55. Fonnegra, R.; Luz, S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Ed. Universidad de Antioquía **2007**.
56. Food and Drug Administration (FDA). Defect Levels Handbook **2018**.
57. Food and Drug Administration (FDA) Risk Profile: Pathogens and Filth in Spices **2017**, 1-221.
58. Food and Drug Administration (FDA). Foodborne Pathogenic Microorganism & Natural Toxins Handbook. Bad Bug Book **2000**, 263.
59. Food Safety Authority of Ireland (FSAI). *Bacillus cereus* factsheet **2011**.
60. Gandhi, M.; Chikindas, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food. Microbiol.* **2007**, 113, 1-15.
61. Gaullin, F.; Arvy, M. Especies, aromatizantes y condimentos. Ed. Aedos **2007**.
62. Gaysinsky, S.; Davidson, P.M.; Bruce, B.D.; Weiss, J. Growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in surfactant micelles. *J. Food Prot.* **2005**, 68, 2559-2566.
63. Gekenidis, M.T.; Gossin, D.; Schmelcher, M.; Schoner, U.; Remus-Emsermann, M.N.P.; Drissne, D. Dynamics of culturable mesophilic bacterial communities of three fresh herbs and their production environment. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, 123, 916-932.
64. Ghasemi, A.; Hashemi, M.; Ghahfarokhi, F.T. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Ind. Crops Prod.* **2013**, 48, 43-48.

65. Giacometti, J.; Bursac, D.; Putnik, P.; Gabrić, D.; Bilušić, T.; Krešić, G.; Stulić, V.; Barba, F.J.; Chemat, F.; Barbosa-Cánovas, G.; Režek, A. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 245-262.
66. Gómez-Estaca J.; López de Lacey, A.; López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Montero, P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 889-96.
67. Graves, L.M.; Hunter, S.B.; Ong, A.R.; Schoonmaker-Bopp, D.; Hise, K.; Kornstein, L.; DeWitt, W.E.; Hayes, P.S.; Dunne, E.; Mead, P.; Swaminathan, B. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet network. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 2350-2355.
68. Graves, L.M.; Swaminathan, B.; Hunter, S.B. Subtyping *Listeria monocytogenes*. *Listeria*, listeriosis and food safety **1999**, 280-292.
69. Gray, M.L.; Killinger, A.H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bact. Rev.* **1966**, *30*, 309-382.
70. Hanif, M.A.; Nawaza, H.; Ayub, M.A.; Tabassum, N.; Kanwal, N.; Rashid, N.; Saleem, M.; Ahmad, M. Evaluation of the effects of Zinc on the chemical composition and biological activity of basil essential oil by using Raman spectroscopy. *Ind Crops Prod.* **2017**, *96*, 91-101.
71. Hao, Y.Y.; Brackett, R.E.; Doyle, M.P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol.* **1998**, *15*, 367-378.
72. Hao, Y.Y.; Brackett, R.E.; Doyle, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 307-312.
73. Hara-Kudo, Y.; Kobayashi, A.; Sugita-Konishi, Y.; Kondo, K. Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 2820-2824.
74. Hinneburg, I.; Dorman, H.J.D.; Hiltunen, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* **2005**, *97*, 122-129.
75. Hirasa, K. Ciencia y tecnología de las especias. Ed. Acribia **2002**.

76. Hogeback, J. What's the Difference Between an Herb and a Spice? *Encyclopedia Britannica* s.f.
77. International Organization for Standardization (ISO 11290:2017). Microbiology of the Food Chain-Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria Monocytogenes* and *Listeria* spp. Part 1: Detection Method and Part 2: Enumeration Method; ISO Publishers: Geneve, Italy, 2017.
78. International Organization for Standardization (ISO 7937:2005). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of *Clostridium perfringens*-Colony-Count Technique; ISO Publishers: Geneve, Italy, 2005.
79. International Organization for Standardization (ISO 7932:2005). Microbiology of Food and Animal Feeding stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of Presumptive *Bacillus cereus*-Colony-Count Technique at 30 °C; ISO Publishers: Geneve, Italy, 2005.
80. International Organization for Standardization (ISO 4833:2003). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms-Colony Count Technique at 30 °C; ISO Publishers: Geneve, Italy, 2003.
81. International Organization for Standardization (ISO 21527-2:2008). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds-Part 2: Colony Count Technique in Products with Water Activity Less than or Equal to 0,95; ISO Publishers: Geneve, Italy, 2008.
82. Jay, J.M.; Loessner, M.J.; Golden, D.A. Modern Food Microbiology (Seventh Edition). Ed. Springer **2005**.
83. Jeddi, M.Z.; Yunesian, M.; Noori, N. Microbial evaluation of fresh minimally processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. *J. Health Popul. Nutr.* **2014**, *32*, 391.
84. Khan, M.S.A.; Zahin, M.; Hasan, S.; Husain, F.M.; Ahmad, I. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *49*, 354-360.
85. Kotiranta, A.; Lounatmaa, K.; Haapasalo, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 189-98.

86. Larson, A.E.; Yu, R.R.; Lee, O.A.; Price, S.; Haas, G.J.; Johnson, E.A. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *33*, 195-207.
87. Lechowicz, J.; Krawczyk-Balska, A. An update on the transport and metabolism of iron in *Listeria monocytogenes*: the role of proteins involved in pathogenicity. *Biometals* **2015**, *28*, 587-603.
88. Linnan, M.J.; Mascola, L.; Lou, X.D.; Goulet, V.; May, S.; Salminen, C.; Hird, D.W.; Yonekura, M.L.; Hayes, P.; Weaver, R.; Audurier, A.; Plikaytis, B.D.; Fannin, S.L.; Kleks, A.; Broome, C.V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* **1988**, *319*, 823-828.
89. Loewenfeld, C.; Back, P. Guía de las Hierbas y Especies. Ed. Omega **1980**, 364.
90. Lung, M.Y.; Chang, Y.C. Antioxidant Properties of the Edible Basidiomycete *Armillaria mellea* in Submerged Cultures. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 6367-6384.
91. Madhavi, D.L.; Deshpande, S.S.; Salunkhe, D.K. Technological Aspects of Food Antioxidants. CRC Press **2019**.
92. Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. Brock Biología de los microorganismos. Ed. Pearson Prentice Hall **2003**.
93. Martínez, L.; Bastida, P.; Castillo, J.; Ros, G.; Nieto, G. Green Alternatives to Synthetic Antioxidants, Antimicrobials, Nitrates, and Nitrites in Clean Label Spanish Chorizo. *Antioxidants* **2019**, *8*, 184.
94. McCarthy, S.A. *Listeria* in the environment. Foodborne listeriosis. Ed. Elsevier **1990**, 25-29.
95. Meena, M.R.; Sethi, V. Antimicrobial activity of essential oils from spices. *J. Food Sci. Technol.* **1994**, *31*, 68-70.
96. Melo, J.; Quevedo, C.; Graca, A.; Dia Quintas, C. Hygienic quality of dehydrated aromatic herbs marketed in Southern Portugal. *AIMS Agric. Food* **2019**, *5*, 46-53.
97. Mendiola, M.; Montalban, J. Plantas Aromaticas Gastronomicas. Ed. Mundi-Prensa **2009**.
98. Menon, K.V.; Garg, S.R.; Mandokhot, U.V. Inhibitory action of cinnamon of *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *J. Food Sci. Technol.* **2002**, *39*, 432-434.

99. Miranda, G.; Berna, A.; Bon, J.; Mulet, A. Modeling of the process of moisture loss during the storage of dried apricots. *Food Sci. Technol. Int.* **2011**, *17*, 439-447.
100. Miranda, G.; Berna, A.; Mulet, A. Dried-Fruit storage: an analysis of package headspace atmosphere changes. *Foods* **2019**, *8*, 56.
101. Moghaddam, M.; Mehdizadeh, L.; Sharifi, Z. Macro and microelement content and health risk assessment of heavy metals in various herbs of Iran. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 12320-31.
102. Mohammadi, S.; Jazani, N.H.; Kouhkan, M.; Babaganjeh, L. Antibacterial effects of microbial synthesized silver-copper nanoalloys on *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Listeria monocytogenes* and *Brucella abortus*. *Iran. J. Microbiol.* **2018**, *10*, 171-179.
103. Mohapatra, S.; Leelavathi, L.; Meignana, A.I.; Arumugham, I.; Pradeep, K.R.; Rajeshkumar, S. Assessment of antimicrobial efficacy of zinc oxide nanoparticles synthesized using clove and cinnamon formulation against oral pathogens - an *in vitro* study. *J. Evol. Med. Dent. Sci.* **2020**, *9*, 2034-2039.
104. Morris, W.E.; Fernández-Miyakawa, M.E. Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Rev. Argent. Microbiol.* **2009**, *41*, 251-260.
105. Murray, E.D.G.; Webb, R.A.; Swann, M.B.R. A disease of rabbit characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **1926**, *29*, 407-439.
106. Napoli, E.; Siracusa, L.; Ruberto, G. New Tricks for Old Guys: Recent Developments in the Chemistry, Biochemistry, Applications and Exploitation of Selected Species from the *Lamiaceae* Family. *Chem. Biodivers.* **2020**, *17*, e1900677.
107. Nasar-Abbas, S.M.; Halkman, A.K. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *Int. J. Food. Microbiol.* **2004**, *97*, 63-9.
108. Nawaz, H.; Hanif, M.A.; Ayub, M.A.; Ishtiaq, F.; Kanwal, N.; Rashid, N.; Saleem, M.; Ahmad, M. Raman spectroscopy for the evaluation of the effects of different concentrations of Copper on the chemical composition and biological activity of basil essential oil. *Spectrochim. Acta A* **2017**, *185*, 130-138.

109. Nieto, G.; Díaz, P.; Bañón, S.; Garrido, M.D. Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 23-9.
110. Nychas, G.J.E.; Skandamis, P.; Tassou, C. Antimicrobials from herbs and spices. *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods* **2003**, *9*, 177-199.
111. Nonsee, K.; Supitchaya, C.; Thawien, W. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. *Int. Food Res. J.* **2011**, *18*, 1531-1541.
112. Obiajunwa, E.I.; Adebajo, A.C.; Omobuwajo, O.R. Essential and trace element of some Nigerian medicinal plants. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2002**, *252*, 473-476.
113. Orberá, T. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Rev. Cub. Salud Pública* **2004**, *30*, 3.
114. Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional. *Boletín Oficial del Estado*, 17 de marzo de **2015**, núm. 65, 24012-24015.
115. Organización Mundial de la Salud (OMS). La irradiación de los alimentos. Técnicas para preservar y conservar la inocuidad de los alimentos. OMS **1989**.
116. Özkan, G., Sağdıç, O.; Özkan, M. Note: Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Sci. Technol. Int.* **2003**, *9*, 85-88
117. Pagotto, F.; Ng, L.K.; Clark, C.; Farber, J.; The Canadian Public Health Laboratory Network. Canadian listeriosis reference service. *Foodborne Pathog. Dis.* **2006**, *3*, 132-137.
118. Pandey, A.; Singh, P. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian J. Plant Sci.* **2011**, *1*, 69-80.

- 119.Papageorgiou, G.; Botsoglou, N.; Govaris, A.; Giannenas, I.; Iliadis, S.; Botsoglou, E. Effect of dietary oregano oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2003**, *87*, 324-335.
- 120.Passalacqua, N.; Cabrera, J. Microorganismos indicadores. Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial **2014**, *3*, 5-116.
- 121.Patel, J.; Keelara, S.; Green, J. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella on Fresh Herbs by Plant Essential Oils. *Foodborne Pathog. Dis.* **2018**, *15*, 1-7.
- 122.Perugachi, F.; Karina, M. Plan de mejora en el proceso de elaboración de salsas de tomate y mayonesas de una planta de alimentos. Universidad de las Américas **2012**.
- 123.Pirie, J.H.H. The genus *Listerella* Pirie. *Science* **1940**, *91*, 383.
- 124.Pohl, P.; Dzimitrowicz, A.; Jedryczko, D.; Szymczycha-Madeja, A.; Welna, M.; Jamroz, P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *130*, 326-335.
- 125.Portuondo, I. *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Rev. Cub. Salud Pública* **2012**, *38*, 98-108.
- 126.Potortì, A.G.; Bua, G.D.; Lo Turco, V.; Ben Tekaya, A.B.; Beltifa, A.; Ben Mansour, H.; Dugo, G.; Di Bella, G. Major, minor and trace element concentrations in spices and aromatic herbs from Sicily (Italy) and Mahdia (Tunisia) by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chem.* **2020**, *313*, 126094.
- 127.Radaelli, M.; Da Silva, B.P.; Weidlich, L.; Hoehne, L.; Flach, A.; da Costa, L.A.; Ethur, E.M. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 424-430.
- 128.Rahnama, M.; Najimi, M.; Ali, S. Antibacterial effects of *Myristica fragrans*, *Zataria multiflora* Boiss, *Syzygium aromaticum*, and *Zingiber officinale* Rosci essential oils, alone and in combination with nisin on *Listeria monocytogenes*. *Comp. Clin. Pathol.* **2012**, *21*, 1313-1316.
- 129.Ramírez, N.D.; Serrano, J.A.; Sandoval, T.H. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2006**, *37*, 56-71.
- 130.Rao, M.A.; Anantheswaran, R.C. Convective Heat Transfer to Fluid Foods in Cans. *Adv. Food Res.* 1988, *32*, 39-84.

131. Real Decreto 2242/1984, de 26 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias. *Boletín Oficial del Estado*, de 22 de diciembre de **1984**, núm. 306, 36997-37003.
132. Reglamento (CE) n.º 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, de 31 de diciembre de **2008**, núm. L 354, 34-50.
133. Rees, J.A.; Bettison, J. Procesado térmico y envasado de alimentos **1994**, 287.
134. Ribeiro-Santos, R.; Andrade, M.; Sanches-Silva, A.; de Melo, N. Essential Oils for Food Application: Natural Substances with Established Biological Activities. *Food Bioproc. Tech.* **2018**, *11*, 43-71.
135. Ríos, J.L.; Recio, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 80-4.
136. Roller, S.; Seedhar, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4° and 8° C. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, *35*, 390-394.
137. Ryser, E.T. Foodborne listeriosis. *Listeria*, listeriosis, and food safety **1999**, 299-303.
138. Sago, S.K.; Little, C.L.; Greenwood, M.; Mithani, V.; Grant, K.A.; McLaughlin, J.; de Pinna, E.; Threlfall, E.J. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 39-43.
139. Samapundo, S.; Heyndrickx, M.; Xhaferi, R.; Devlieghere, F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *150*, 34-41.
140. Sapkota, R.; Dasgupta, R.; Rawat, N.; Rawat, D. Antibacterial Effects of Plants Extracts on Human Microbial Pathogens & Microbial Limit Tests. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **2012**, *2*, 926-36.
141. Schweiggert, U.; Carle, R.; Schieber, A. Conventional and alternative processes for spice production - a review. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 260-8.
142. Seeliger, H.P.R. Listeriosis. Hafner Publishing Co., New York **1961**.

143. Sekeroglu, N.; Ozkutlu, F.; Kara, S.M.; Ozguven, M. Determination of cadmium and selected micronutrients in commonly used and traded medicinal plants in Turkey. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 86-90.
144. Settani, L.; Miceli, A.; Francesca, N.; Moschetti, G. Investigation of the hygienic safety of aromatic plants cultivated in soil contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2012**, *26*, 213-219.
145. Shah, S.; Ray, K.S. Study on antioxidant and antimicrobial properties of black cummin (*Nigella sativa* Linn). *J. Food Sci. Technol.* **2003**, *40*, 70-73.
146. Silva, N.C.C.; Barbosa, L.; Seito, L.N.; Fernandes, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 1510-1514.
147. Smith-Palmer, A; Stewart, J; Fyfe, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **1998**, *26*, 118-122.
148. Solórzano-Santos, F; Miranda-Novales M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 136-41.
149. Sokovic, M.; van Griensven, L.J. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2006**, *116*, 211-224.
150. Sospedra, I.; Soriano, J.M.; Mañes, J. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs commercialized in Spain. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65*, 364-368.
151. Srivastava, A.K.; Srivastava, S.K.; Syamsundar, K.V. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 51-53.
152. Suárez-Machín, C.; Garrido-Carralero, N.A.; Guevara-Rodríguez, C.A. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar **2016**, *50*, 20-28.
153. Suhr, K.I.; Nielsen, P.V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 665-674.
154. Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; Bigger, S.W. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3197-3207.

155. Tajkarimi, M.; Ibrahim, S.; Cliver, D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. **2010**, *21*, 1199-1218.
156. Tappero, J.W.; Schuchat, A.; Deaver, K.A.; Mascola, L.; Wenger, J.D. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States-effectiveness of prevention efforts? *J. Am. Med. Assoc.* **1995**, *273*, 1118-1122.
157. Theivendran, S.; Hettiarachchy, N.S.; Johnson, M.G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 39-44.
158. Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. Crecimiento microbiano. Introduccion a la microbiologia **2007**.
159. Tsigarida, E.; Skandamis, P.; Nychas, G.J.E. Behavior of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 901-909
160. Volpe, K.E.; Kathariou, S.; Edwards, J.S.; Wolf, L.A. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis as a Tool for Subtyping *Listeria monocytogenes* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1435-1450.
161. Weinssetel, N.A. Antimicrobial action of selected plant-derived compounds against *Listeria monocytogenes*. Retrospective Theses and Dissertations, **2006**, Paper 1910.
162. Weisany, W.; Samadi, S.; Amini, J.; Hossaini, S.; Yousefi, S.; Maggi, F. Enhancement of the antifungal activity of thyme and dill essential oils against *Colletotrichum nymphaeae* by nano-encapsulation with copper NPs. *Ind Crops Prod.* **2019**, *132*, 213-225.
163. Wesley, I.V.; Ashton, F. Restriction enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* strains associated with foodborne epidemics. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 969-975.
164. Xu, W.; Qu, W.; Huang, K.; Guo, F.; Yang, J.; Zhao, H.; Luo, Y. Antibacterial effect of Grapefruit Seed Extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* **2007**, *45*, 126-33.
165. Yin, M.; Chen, W. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Sci.* **2003**, *63*, 23-28.

- 166.Zengin, M.; Özcan, M.M.; Çetin, Ü.; Gezin, S. Mineral contents of some aromatic plants, their growth soils and infusions. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 581-589.
- 167.Zhang, M.; Meng, X.; Bhandari, B.; Fang, Z.; Chen, H. Recent application of modified atmosphere packaging (map) in fresh and fresh-cut foods. *Food Rev. Int.* **2014**, *31*, 172-193.

CAPITULO II

CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE VERDURAS TÍPICAS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA DE COMERCIALIZACIÓN

1. Introducción

1.1. Gamas alimentarias. Descripción y clasificación

Según la diferencia en la forma de conservación (tecnología que utiliza la industria alimentaria) se han establecido las **Gamas de Alimentos**, definiéndose cinco:

- **Primera gama:** alimentos frescos como fruta, verdura, carne, pescado o cereales, es decir, productos que no se han sometido a ningún tratamiento de conservación ni han sufrido ningún tratamiento higienizante. Mantienen todas sus propiedades organolépticas (gusto, olor o sabor) y, para mantenerlas, deben conservarse en la mayoría de los casos a temperaturas de refrigeración. Se trata de alimentos muy perecederos, por lo que las condiciones de conservación y manipulación deben ser muy cuidadosas para evitar riesgos. No se conservarán más de 48 horas (carne o pescado); por ello, si no se tiene la intención de consumirlos dentro de este periodo de tiempo, lo más recomendable es congelarlos.

No se deben aceptar aquellos alimentos que muestren señales de deterioro tisular, putrefacción, moho, decoloración, marchitación o malos olores; sin embargo, los actuales problemas medioambientales sugieren tener precaución incluso con aquellos alimentos de primera gama que no presentan las señales anteriores (Dickin *et al.*, 2016). De hecho, un estudio reciente realizado por el *Center for Science in the Public Interest* (CSPI, EEUU) encontró que las frutas y vegetales contaminados con pesticidas y/o metales pesados causan más enfermedades transmitidas por alimentos que la carne de pollo y huevos combinados (Food Protection Training Manual, 2013). Por ejemplo, algunos autores encontraron altas concentraciones de cobre, cinc, cadmio y plomo en *Beta vulgaris* L., *Abelmoschus esculentus* L. y *Brassica oleracea* L. (Sharma *et al.*, 2009). Además, ya desde 2011 se advertía del problema que supone la absorción de agua contaminada con metales pesados (como cadmio, cobre, plomo, cromo y mercurio) por plantas que están expuestas a fuentes hídricas de estas características, eso sin resaltar la calidad del aire y del suelo, en varias regiones geográficas del mundo (Suruchi *et al.*, 2011). Ahora bien, una gran cantidad de frutas y vegetales pueden venir contaminados con *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 debido al uso de fertilizantes con estiércol (Food Protection Training Manual, 2013).

- **Segunda gama:** conservas o semiconservas como fruta en almíbar o salsas. Se someten a un proceso térmico y posterior envasado; esto conlleva que puedan conservarse durante periodos más largos. El proceso térmico reduce el crecimiento bacteriano y, por tanto, aumenta la vida útil de estos alimentos. No requieren, con alguna excepción (semiconservas de anchoas, por ejemplo), temperaturas frías de almacenamiento.

Corresponden a los alimentos enlatados. El desarrollo de las latas de conserva (Appert, 1810) por parte de la industria alimentaria significó un gran avance en la comercialización y prolongación de la vida útil de muchos alimentos. La comercialización a nivel industrial se produjo cuando Pasteur explicó el fundamento por el que dicho procedimiento alargaba la vida útil de los alimentos (Mataix, 2009). Se trata de alimentos que pueden mantenerse durante varios meses (incluso años) y cuya presentación se puede realizar en diversos tipos de envases (latas, frascos de vidrio, etc.). Su preparación se basa en la aplicación de un tratamiento térmico de esterilización en autoclave al alimento que ha sido previamente envasado y el envase a su vez cerrado herméticamente. Se incluyen también en este grupo las semiconservas, o alimentos enlatados que requieren refrigeración para su conservación.

Es muy sencillo proceder a la inspección de los alimentos de segunda gama en buenas condiciones y desechar las latas que puedan generar enfermedades transmitidas por alimentos. Los productos enlatados han de ser producidos en industrias alimentarias y no de forma “casera”; las latas han de estar libres de óxido y abolladuras, además de venir propiamente selladas, etiquetadas y con forma ligeramente cóncava en ambos extremos (Food Protection Training Manual, 2013).

Uno de los problemas que presentan estos alimentos es el hallazgo de metales pesados (principalmente en atún, sardinas y pescados enlatados) en algunas industrias. Algunos autores, utilizando espectroscopia de absorción atómica para cuantificar las concentraciones de metales pesados (mercurio, cadmio y plomo) en algunas muestras de latas de atún tomadas de diferentes supermercados (Italia), encontraron que todos los alimentos de segunda gama analizados presentaban altas concentraciones de mercurio seguido de cadmio y plomo respectivamente (Storelli *et al.*, 2010). Por otro lado, en 2010 se utilizó análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la determinación de bisfenol A (Bisphenol A, BPA) y validar así la calidad de alimentos de segunda gama.

No obstante, luego de analizar 78 productos enlatados tomados de supermercados (Canadá), la concentración promedio de BPA fue cercana al límite establecido por la Comisión Europea (0,6 mg/kg), resaltando el hecho que los alimentos enlatados de tomate y pasta de tomate al igual que los atunes presentaron las mayores concentraciones de BPA (Cao *et al.*, 2010).

- **Tercera gama:** productos congelados como las verduras, pescados o mariscos. El objetivo es conseguir unos altos periodos de conservación. El tiempo de almacenamiento depende del tipo de alimento.

Son alimentos que se caracterizan por su comodidad ya que tienen una larga vida útil que permiten al consumidor mantenerlos en el congelador de la casa y disponer de ellos en el momento oportuno. En general, conllevan operaciones de preparación previas que reducen la manipulación por parte del consumidor, quien, en la mayoría de los casos, sólo ha de cocinarlos. Su precio en la actualidad es muy competitivo frente a otros tipos de alimentos y su calidad puede considerarse como muy buena, cuando las tecnologías de aplicación de frío de las que se disponen actualmente se aplican de forma adecuada. La congelación resulta también una buena opción para la conservación de alimentos cocinados y precocinados (Mataix, 2009).

La aplicación de frío aumenta la vida útil de los alimentos, ya que inactiva los microorganismos, inactiva las enzimas responsables de los procesos de degradación y ralentiza las alteraciones químicas (oxidaciones). La mayoría de los microorganismos presentes quedan en estado latente, volviendo a activarse cuando sube la temperatura; por ello, es absolutamente necesario mantener las bajas temperaturas sin fluctuaciones, es decir, mantener la cadena de frío (Mataix, 2009).

En general, la calidad de un alimento de tercera gama depende, en mayor medida, de las operaciones de preparación a las que se halla sometido, así como de sus condiciones de almacenamiento y descongelación. Si la congelación no es rápida se produce una distorsión importante en la estructura del alimento (deshidratación y ruptura de células) como consecuencia de la formación de cristales de hielo grandes y poco numerosos. En el proceso de cristalización del hielo hay dos etapas: la nucleación y el crecimiento de cristales.

Si la temperatura baja despacio se forman pocos núcleos cristalinos que posteriormente crecen mucho y dañan las paredes de las células que los rodean o en los que están inmersos. Además, estos cristales se forman en los espacios intercelulares por lo que los solutos de esta zona se empiezan a concentrar en el agua no congelada provocando la salida de agua intracelular hacia el exterior de la célula por diferencia de presión osmótica. Como consecuencia, los cristales de hielo intercelulares van creciendo mientras las células se van deshidratando. El agua que sale de las células ya no vuelve a entrar por lo que éstas quedan sin turgencia (aplastadas y deshidratadas), lo que unido a la ruptura de las paredes celulares provocadas por los grandes cristales de hielo formados provocan grandes cantidades de exudado al descongelar el producto, lo cual conlleva a pérdidas de agua, sustancias nutritivas, aromáticas, etc. Por el contrario, una disminución rápida de temperatura lleva a la formación de muchos núcleos cristalinos tanto dentro como fuera de las células, que en la etapa de crecimiento dan lugar a muchos y pequeños cristales, los cuales no distorsionan el medio en que se encuentran.

- **Cuarta gama:** productos envasados al vacío o en atmósferas controladas, que han sido cortados o pelados, no se han sometido a ningún proceso de cocción y se han envasado en bolsas o recipientes en atmósfera controlada o al vacío. Por ejemplo, las bolsas de ensaladas o verduras peladas y cortadas listas para ser utilizadas directamente. Requieren refrigeración y su caducidad no debe exceder de una semana.

- **Quinta gama:** productos elaborados, cocinados y envasados listos para consumir que han sido sometidos a procesos higienizantes que garantizan su salubridad y seguridad, así como sus cualidades organolépticas originales. Para su consumo, solo es necesario calentarlos a más de 60 °C. Por ejemplo, lasañas, pizzas congeladas, alimentos esterilizados o pasteurizados, etc.

1.2. Verduras de I Gama

Como ya se ha expuesto antes, la I Gama está constituida por alimentos frescos, tales como frutas, hortalizas, carnes, pescados, mariscos, huevos y otros productos conservados mediante métodos tradicionales como la deshidratación, la salazón y la fermentación. Se trata de alimentos no transformados que no han sufrido ningún tratamiento higienizante. Por tanto, en general, son alimentos de riesgo, muy perecederos, y que en la mayoría de los casos precisan refrigeración. En frutas y hortalizas se encuentran, además de productos frescos, frutas y hortalizas deshidratadas y encurtidas.

Las frutas y verduras han de ser de calidad y ésta no se puede mejorar después de la cosecha; sin embargo, los procedimientos postcosecha adecuados pueden mantenerla. Para mejorar la seguridad de los alimentos, es de vital importancia que los productos hortícolas no presenten microorganismos bacterianos y fúngicos. La utilización de agua desinfectada para lavar y limpiar los productos cosechados es un paso fundamental para prolongar la vida de almacenamiento (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017).

1.2.1. Papel de las frutas, verduras y hortalizas crudas como responsables de enfermedades de transmisión alimentaria

Los requisitos relativos a las *Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)*, *Buenas Prácticas de Fabricación (BPF)* y *Buenas Prácticas de Distribución (BPD)*, tienen como objetivo minimizar el riesgo de contaminación de los productos de IV Gama. Sin embargo, no sucede lo mismo con las verduras de I Gama; la mayor incidencia de infecciones relacionadas con los alimentos desde finales de los años ochenta exige un mejor control de las estrategias de prevención o la aplicación de las estrategias de intervención necesarias en cada paso (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017).

Las verduras de I Gama son productos muy perecederos y vulnerables al ataque microbiano, ya que no están sujetos a ninguna inactivación microbiana como la pasteurización o cocción (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017).

La contaminación microbiana de frutas y hortalizas puede ocurrir en todas las etapas de la producción agraria, desde la siembra a la cosecha, así como en las operaciones postcosecha (Guerrero, 2014).

Las fuentes más frecuentes de contaminación son las siguientes:

- **Yacimientos de agua de riego contaminados:** pueden ser utilizados para la preparación de fertilizantes y pesticidas. La contaminación del agua de riego puede producirse por intrusión de animales o por percolación o drenaje de materia fecal proveniente de instalaciones ganaderas.

- **Abonos de origen animal:** que no han sido sometidos a un adecuado compostaje.

- **Intrusión de animales domésticos o salvajes:** supone otro punto de contaminación fecal.

- **Formación de aerosoles provenientes de áreas ganaderas.**

- **Transporte por insectos.**

- **Manipulación humana:** gran número de infecciones virales, como la hepatitis A, y la infección por *Shigella*, han sido asociadas a la manipulación humana. La adecuada disposición de instalaciones sanitarias en el campo cercanas al área de trabajo y la formación continua a los trabajadores en BPA, ha reducido significativamente el riesgo de contaminación a través de esta ruta (Guerrero, 2014).

Diversos autores han revisado el establecimiento y estrategias de supervivencia de patógenos entéricos humanos en vegetales, que podrían utilizarlas como vectores entre éstas y los huéspedes animales (Brandl *et al.*, 2008; Barak *et al.*, 2011). Además, es posible que la utilización de ciertos factores genéticos necesarios para invadir o establecerse en huéspedes animales, sea también empleada para su establecimiento en plantas y raíces, lo que contribuiría a su persistencia en las plantas. Una vez ocurrida la contaminación, la posibilidad de eliminación es muy remota. En muchas ocasiones, los productos son directamente empacados en el campo y enviados directamente a los canales de distribución, de tal manera que los microorganismos podrían permanecer viables durante la comercialización tras una eventual contaminación en el campo (Guerrero, 2014).

La posibilidad de que un patógeno ingerido produzca enfermedad depende de la relación dosis-respuesta; así, por ejemplo:

- **Virus:** los virus no pueden multiplicarse en los alimentos; sin embargo, algunos pueden causar enfermedades con unas pocas partículas virales ingeridas. En el caso de *Norovirus*, son suficientes de 10 a 100 partículas y las personas infectadas pueden excretar varios millones de partículas de infección en heces o vómitos.

- ***E. coli* O157:H7 y algunos serovares de *Salmonella*:** producen enfermedad con unas pocas células bacterianas ingeridas, sin haber crecido en los alimentos durante su vida útil. Por ejemplo, brotes causados en jugos de frutas, como la naranja, con un pH demasiado bajo para su crecimiento. Se debe eliminar su presencia en la materia prima.

- **Bacterias formadoras de esporas (*B. cereus*, *C. perfringens* y *C. botulinum*):** en este caso, necesitan alcanzar cantidades suficientemente altas en los alimentos para producir enfermedades a los consumidores. Por ejemplo, 10^5 UFC/g en el caso de *B. cereus*. Además, *B. cereus* y *C. botulinum* necesitan producir toxinas en los alimentos (European Food Safety Authority, 2005). Sin embargo, estas esporas patógenas sobreviven a una amplia gama de procesos alimentarios, y el crecimiento en las frutas o verduras de IV Gama durante su período de conservación es el punto crítico para el aumento en el riesgo de enfermedad. Hay que asegurar una conservación en temperaturas adecuadas y evitar el deterioro físico, pues al liberarse el contenido de las células, se crea un entorno rico en nutrientes que favorece la infección por parte de estos microorganismos. El crecimiento puede ocurrir en una amplia gama de condiciones, pero no en alimentos ácidos como muchas frutas procesadas ni en productos de baja actividad de agua como frutas y verduras secas o frutas en conserva (Nguyen-The, 2012).

1.3. Verduras de IV Gama

1.3.1. Definición y características

La definición de productos de IV Gama puede variar someramente según los países y el modo de preparación.

En general, los productos de IV Gama se definen como “*los productos vegetales, frutas y hortalizas frescos sin tratamiento térmico, preparados, lavados y envasados que han podido ser objeto de troceado, corte o cualquier otra operación que afecte a su integridad física, listos para consumir o cocinar y destinados al consumo humano*” (Gil *et al.*, 2017).

Otra definición comúnmente aceptada es la propuesta por la *Asociación Internacional de Productores de Vegetales Frescos Cortados (International Fresh-cut Produce Association, IFPA)*, que define a los productos de IV Gama como “*cualquier fruta o vegetal fresco, o sus combinaciones, que han sido físicamente alterados en su forma original pero permanecen en estado fresco*” (Gil *et al.*, 2003).

Entre las distintas denominaciones con que se conoce a dichos productos, son frecuentes las de:

- **Cuarta gama.**
- **Productos mínimamente procesados en fresco.**
- **Listos para consumir (ready-to-eat, ready-to-use).**
- **Frescos-cortados (fresh-cut)** (Ortega *et al.*, 2018).

Están formados por tejidos vegetales frescos, es decir vivos; por tanto, tienen una mayor actividad fisiológica que los productos vegetales enteros debido a las operaciones mecánicas a las que son sometidos (cortado, rallado, pelado, etc.), con el consiguiente aumento en el consumo de oxígeno y en la producción de anhídrido carbónico y etileno (Ortega *et al.*, 2018). Por otro lado, hay que destacar que, en este tipo de alimentos, no se emplean procedimientos que garanticen la asepsia completa (por ejemplo, tratamientos térmicos); por ello el control de la microflora solo puede conseguirse mediante una higienización muy estricta durante las etapas de elaboración y la adecuada conservación en atmosfera modificada en condiciones de refrigeración (Gil *et al.*, 2017).

Las hortalizas troceadas se cortan y lavan con agua potable abundante para eliminar la suciedad, los residuos de plaguicidas, microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli*, huevos de parásitos y otros responsables de podredumbre. El sistema de lavado se lleva a cabo por ducha o aspersión e inmersión en la mayoría de los casos, y el desinfectante más utilizado es el hipoclorito sódico (100 ppm en la disolución desinfectante puede reducir 100 veces la carga microbiana). Posteriormente se realiza el escurrido, con objeto de eliminar el exceso de agua (Gil *et al.*, 2017).

El envasado se puede realizar en bolsas de plástico transparente (de uso muy extendido por su reducido coste y porque su presentación aporta sensación de frescura), tarrinas o bandejas de diferentes polímeros plásticos, y en atmósfera protectora con una mezcla de gases:

- **Oxígeno:** 5 %. Sin oxígeno no hay respiración de los productos vegetales.
- **Dióxido de carbono:** 5 % (por su efecto bactericida).
- **Nitrógeno:** 90 % (gas de llenado inerte):



Figura 1. Verduras de IV Gama comercializadas según diferentes sistemas de envasado

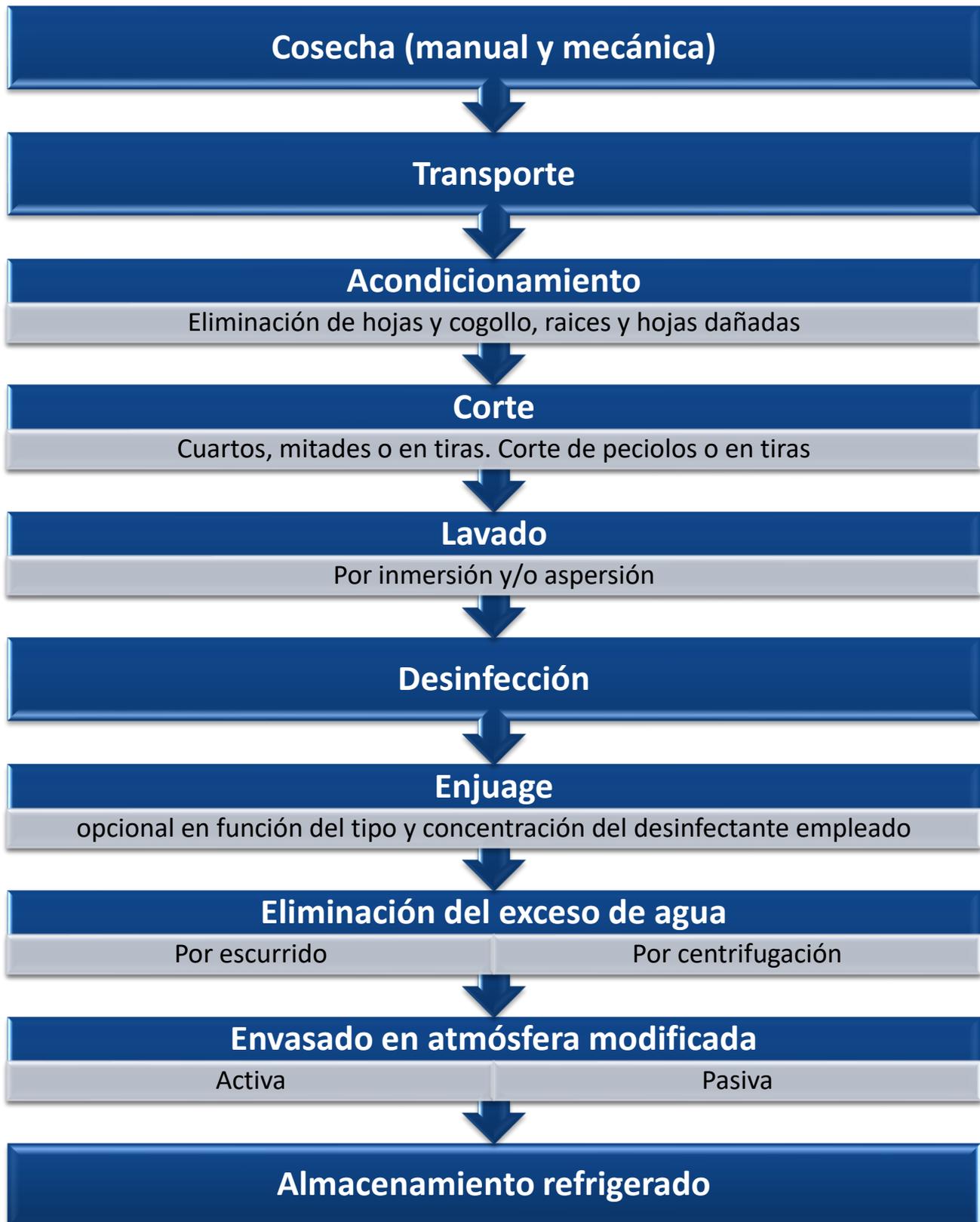


Figura 2. Envasado de hortalizas de IV Gama (adaptado de Pirovani *et al.*, 2009)

Por otra parte, estos productos se caracterizan por su facilidad de uso en el momento de la preparación del alimento y de su consumo (no necesitan limpieza ni lavado). Además, son productos sanos que aportan gran cantidad de nutrientes necesarios de forma diaria para preservar una adecuada salud (Villegas, 2014).

Los productos que más se trabajan en IV Gama son:

- **De gran tamaño:** lechuga, zanahoria, espinaca, fruta, apio, puerro, naranja y manzana.

- **De pequeño tamaño:** las hortalizas de pequeño tamaño son cada vez más atractivas y su sabor es muy intenso; además, se adaptan a las condiciones de invernadero obteniéndose con buena calidad. Destacan la espinaca baby, apio pequeño, mini zanahoria, lechuga baby, etc. (Villegas, 2014).

Los productos de IV Gama, por tanto, están en plena expansión y esto ha hecho posible que se desarrollen otros productos, como los de V Gama (cocinados con poca caducidad y refrigerados). Los productos de V Gama están formados por hortalizas frescas cocidas y envasadas sin colorantes ni conservantes, por lo que su fecha de caducidad se amplía entre 1 y 3 meses (Villegas, 2014).

De forma general, en los productos de IV Gama hay que cumplir ciertos requisitos (Villegas, 2014):

- **La materia prima ha de ser de calidad.**
- **No debe romperse la cadena del frío.**
- **Hay que tener en cuenta la fecha de caducidad.**

En España, los alimentos de IV Gama se introdujeron en los años 80, concretamente en Navarra donde se instaló una fábrica de procesado. Después se extendieron rápidamente a otras Comunidades Autónomas, adquiriendo una importancia relevante en el sector hortofrutícola. Comenzaron teniendo su principal destinatario en el sector de la hostelería (restaurantes, cafeterías, etc.), aunque poco a poco su consumo se ha ido extendiendo a los hogares. Desde entonces su importancia ha ido en aumento por dos motivos:

- **El consumidor cada vez tiene menos tiempo para dedicar a la preparación de comidas:** por ello, estos productos son muy demandados, ya que ofrecen comodidad, ahorro de tiempo y una presentación saludable.

- **Frutas y hortalizas son alimentos clave en la dieta mediterránea.**

La conservación y la extensión de la vida útil siguen siendo una gran preocupación para este tipo de productos, ya que estuvieron disponibles por primera vez para los consumidores en la década de los 40 (si bien, como se acaba de exponer, a España no llegaron hasta finales de la década de los 80).

Los métodos tradicionales de conservación de los productos de IV Gama se clasifican en tres categorías:

- **Preservación con base física:** se ajustan la temperatura ambiental, la humedad, la presión y la composición del gas para prolongar su vida útil. El almacenamiento en frío es uno de los métodos físicos más utilizados y eficientes para mejorar la vida útil de las frutas y verduras frescas, aunque en ocasiones puede producirse el daño por frío al almacenar en las mismas condiciones distintas variedades de frutas con diferentes temperaturas de almacenamiento óptimas respectivamente.

- **Preservación con base química:** en general, actualmente la población es más consciente de la salud, higiene y seguridad alimentaria. El abuso en el uso de aditivos por parte de la industria alimentaria ha causado mella en los consumidores; tanto es así, que se empieza incluso a cuestionar la adición de cloro u otros compuestos químicos al agua de lavado, prefiriéndose la utilización de sustancias naturales como el vinagre.

- **Tecnología de biopreservación:** se caracteriza por la seguridad. Supone la utilización racional del potencial antimicrobiano de los microorganismos naturales y sus productos antibacterianos, con el fin de extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos.

En conclusión, las limitaciones de la vida útil de estos productos siguen siendo el mayor obstáculo para un mayor desarrollo de frutas y verduras frescas, a pesar de los esfuerzos por parte de la industria alimentaria.

1.3.2. Ventajas e inconvenientes de la IV Gama en restauración

Las frutas y verduras de IV Gama suponen la manera más sencilla de seguir una dieta sana:

- **Ventajas:**

- **Son saludables.**
- **Son fáciles de consumir y con rapidez de uso.**
- **Tienen alto valor nutricional.**
- **Tienen gran sabor y frescura:** conservadas entre 1 y 4 °C. La fecha de caducidad está comprendida entre 5 y 7 días, aproximadamente.
- **Son productos innovadores:** no se estropean al estar envasados en atmósfera modificada.
- **Tienen máxima calidad.**
- **Son productos maduros:** se recolectan en su punto óptimo.
- **Son productos seguros:** se someten a una fase de preenfriamiento para evitar la pérdida de calidad y se limpian con agua clorada; además, no se añade ningún tipo de conservante.

Por otro lado, su popularidad ha aumentado entre la población mundial; ello ha llevado a un mayor consumo e inversión, por parte de la industria alimentaria, en frutas y hortalizas frescas en los últimos años.

Desde hace bastante tiempo, la comunidad científica ha expuesto los beneficios para la salud del consumo de frutas y verduras (disminución del riesgo de diabetes tipo II, algunos tipos de cáncer, síndrome metabólico, obesidad, etc.).

Las frutas y las verduras son componentes esenciales de una dieta saludable. En general, se calcula que cada año podrían salvarse 1,7 millones de vidas si el consumo de estos alimentos fuera el estimado.

Según la OMS y la FAO, la cantidad mínima de frutas y verduras (excluidas las patatas y otros tubérculos feculentos) a consumir es de 400 g/día, con el fin de evitar enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, etc.

Con el fin de intentar aumentar el consumo de frutas y verduras, se ha llevado a cabo una amplia variedad de intervenciones de salud, promoción y mercadeo social en todo el mundo durante más de una década. Sin embargo, el éxito de estas iniciativas, medido en términos de aumento en el consumo diario por persona por servicio, sigue siendo modesto (Rekhy *et al.*, 2014).

Una de las grandes ventajas que se debería aprovechar es incluir estos productos en la industria del vending, colocando máquinas en instituciones como colegios, institutos y hospitales.

- **Inconvenientes:** quizás el principal inconveniente de estos productos es el aumento de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados con el consumo de productos frescos, debido al aumento de las ventas (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017).

Las crisis alimentarias actuales están determinadas por varios factores:

- **Modificaciones en las prácticas agrícolas, procesado y transformación de los vegetales.**

- **Internacionalización de la producción agraria.**

- **Aumento de la población:** numerosos estudios demográficos han puesto de manifiesto la preocupación por el aumento de población en el planeta.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los productos frescos que han sido tratados se deterioran más rápidamente que las materias primas no procesadas; esto se debe a los daños causados por los métodos de procesamiento mínimo (pelado, rebanado, corte en dados, trituración, etc.). Generalmente, estas operaciones de procesamiento acortan la vida útil de las frutas y verduras recién cortadas debido al ablandamiento del tejido, el pardeamiento de la superficie del corte, el valor nutricional reducido, la presencia de mal sabor y el deterioro microbiológico durante el almacenamiento. Además, la superficie expuesta después del procesamiento mínimo también beneficia el crecimiento de algunos microorganismos patógenos.

Cabe destacar que en los últimos años ha habido un gran incremento de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos y, concretamente, asociados a productos frescos; ello ha supuesto la aparición de alertas de salud pública.

Muchos países han puesto en marcha diversas estrategias para prevenir y minimizar la contaminación en frutas y hortalizas (Nguyen-The, 2012):

- **Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).**
- **Buenas Prácticas de Manufacturación (BPM).**
- **Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC).**

Es de vital importancia prevenir la contaminación al principio de la producción agraria ya que, si los productos vegetales destinados al consumo en fresco son contaminados con microorganismos patógenos, éstos no pueden ser inactivados o eliminados del producto sin alterar sus cualidades sensoriales y/o nutricionales (Nguyen-The, 2012).

Las infecciones causadas por estos microorganismos provocan, normalmente, un típico cuadro de infección gastrointestinal; sin embargo, pueden producir enfermedades más severas. Los patógenos más importantes en la contaminación de vegetales son:

- *L. monocytogenes*, *C. botulinum* y *B. cereus*: proceden, principalmente, del suelo.

- *Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *E. coli* O157:H7 y otras especies patógenas de *E. coli*: son patógenos de contaminación fecal. La infección por *E. coli* O157:H7 puede generar un síndrome urémico hemolítico en niños de corta edad, fallos renales y, en casos más graves, la muerte.

En septiembre del año 2006, una epidemia causada por *E. coli* O157:H7 fue asociada al consumo de espinaca mínimamente procesada. Esta crisis alimentaria afectó a 26 Estados de los EEUU y Canadá, causando 205 infecciones y tres muertes. Se ordenó la retirada del mercado de más de 42.000 bolsas de espinacas.

En Europa (Francia y Alemania, año 2011), se produjo una de las epidemias más grandes, cuyo brote provocó más de 3.500 casos de diarrea hemorrágica causada por *E. coli* serotipo O104:04 y 44 personas perdieron la vida. Este hecho generó pérdidas de más de 200 millones de dólares semanales en España en la venta de pepinos, ya que, según el gobierno alemán, el consumo de pepinos provenientes de España estaba asociado a la enfermedad; sin embargo, posteriormente fue demostrado que germinados de semillas fueron la causa principal. Alemania tuvo que indemnizar a dos empresas españolas por el error en el brote de *E. coli*.

Todo esto demuestra el impacto social y económico que tienen los patógenos humanos en este sector alimentario, con importantes repercusiones en la salud pública y en la percepción por parte del consumidor de este tipo de productos (Guerrero, 2014).

- *Cryptosporidium* y *Cyclospora*: parásitos.

- **Virus entéricos**: virus de la hepatitis A, *Enterovirus* y *Norovirus* (Norwalk) (Nguyen-The, 2012).

Por todo ello, es esencial prevenir la contaminación como primer paso durante todas las etapas de cultivo y procesado de los vegetales. El empleo postcosecha de soluciones desinfectantes con agua clorada u otros agentes químicos, así como el uso de otras alternativas físicas, son imprescindibles para garantizar la inactivación de microorganismos patógenos (Guerrero, 2014).

Otra posible estrategia que puede ser empleada en el producto final, pero también durante la etapa de cultivo, involucra la aplicación de control biológico. Un gran número de microorganismos obtenidos de la fitosfera de varios vegetales han mostrado gran potencial para inhibir el crecimiento de patógenos humanos. Asimismo, el desarrollo de bacteriófagos que puedan inactivar microorganismos específicos también ha sido estudiado. Esta área de investigación ofrece gran potencial de desarrollo biotecnológico (Guerrero, 2014).

1.3.3. Métodos de desinfección

1.3.3.1. Métodos químicos

La calidad de los productos hortícolas se puede mejorar mediante la utilización de *compuestos químicos GRAS* (*Generally Recognized As Safe*; Generalmente Reconocidos como Seguros); por ejemplo, desinfectantes, fungicidas y germicidas.

Los desinfectantes son agentes tales como el calor, la irradiación o los productos químicos, que destruyen, neutralizan o inhiben el crecimiento de microorganismos portadores de enfermedades. Los desinfectantes se utilizan para reducir, pero no necesariamente eliminar, los microorganismos del ambiente a niveles considerados seguros.

El agente desinfectante más común es el cloro, que puede aplicarse mediante rociado o inmersión. Posteriormente, se puede llevar a cabo un tratamiento con uno o más fungicidas, que depositan un residuo en el producto que inhibe los patógenos de desintegración que infectan más tarde o escapan de la acción de los desinfectantes. Los desinfectantes también se usan ampliamente para minimizar la contaminación del producto con patógenos de interés para la salud humana (Rekhy *et al.*, 2014).

Como ya se ha expuesto anteriormente, y de forma previa al envasado, las frutas y verduras deben lavarse con agua que contenga desinfectantes para eliminar las partículas del suelo y otros contaminantes (el agua libre de desinfectantes contiene esporas de hongos y bacterias que pueden infectar el producto). Sin embargo, hay que tener en cuenta ciertos factores que pueden afectar al resultado, tales como la carga bacteriana inicial y el tipo de microorganismo, el tipo de superficie a lavar, el tipo de desinfectante, temperatura y tiempo de exposición al desinfectante, etc.

Los principales métodos químicos de desinfección son:

- **Hipoclorito de sodio:** la inocuidad de los alimentos incluye, dentro de las medidas de primera magnitud para la reducción de riesgos de patógenos microbiológicos, la desinfección de superficies y alimentos, entre otros. Uno de los productos más utilizados por su eficacia y costo es el cloro, ya sea en forma de hipoclorito de sodio o de calcio.

En el contexto actual de la pandemia provocada por el SARS-CoV-2, una de las medidas básicas de prevención es la desinfección de superficies, siendo el cloro un agente recomendado por organizaciones internacionales.

El cloro es un gas amarillo-verdoso que puede presentarse de forma gaseosa, líquida o sólida:

- **Cloro gaseoso:** su dosificación es complicada y peligrosa.
- **Cloro sólido (hipoclorito de calcio):** ampliamente utilizado, si bien su disolución en agua fría es complicada.
- **Cloro líquido (hipoclorito de sodio):** es más costoso pero de uso más frecuente.

Los agentes clorados se usan comúnmente para la desinfección del agua y la desinfección del producto (Castro-Ibáñez *et al.*, 2017). El cloro se aplica comúnmente como ácido hipocloroso e hipoclorito en la industria de productos frescos como desinfectante en concentraciones que varían entre 50 y 200 ppm de cloro libre y para un tiempo de exposición máximo de 5 minutos. Se ha verificado que éste es el tiempo máximo de exposición aplicado, ya que tiempos de lavado más largos (de 5 a 30 minutos) no produjeron un aumento en la eliminación de microorganismos (Rekhy *et al.*, 2014).

Presenta ventajas e inconvenientes:

- **Ventajas:** precio relativamente bajo, facilidad de aplicación, amplio espectro de efectividad antimicrobiana y mínimo impacto sobre la calidad nutricional y sensorial del producto.

- **Inconvenientes:** bajo ciertas circunstancias muestra una eficiencia limitada para reducir las cargas microbianas, ya que puede ser fácilmente inactivado por la materia orgánica, y su acción es altamente dependiente del pH, habiéndose detectado en algún caso crecimiento de *L. monocytogenes* (por ejemplo, en la lechuga troceada) o de *Salmonella* (en brotes de espinaca) (Casp, 2014).

La Comisión Europea, principalmente debido a la posible generación de *subproductos de desinfección* (*Disinfection by-products*, DBP), ha permitido que cada Estado Miembro decida sobre la aprobación del uso de desinfectantes a base de cloro en el lavado de productos frescos. Por ello, algunos países como Alemania, Países Bajos, Dinamarca, Bélgica y Suiza han prohibido estos productos.

Por esta razón, existe la necesidad de desarrollar métodos mejores, más seguros y menos dañinos para el medio ambiente. En este sentido, se han desarrollado diferentes métodos para reducir y/o reemplazar el uso de cloro, tales como métodos biológicos, compuestos químicos alternativos y tecnologías físicas, o incluso la combinación de ellos.

- **Lactato de calcio:** el calcio se utiliza generalmente para mantener la firmeza de los productos frescos durante el almacenamiento, ya que puede interactuar con la pectina manteniendo la estructura de la pared celular. El lactato de calcio tiene propiedades antimicrobianas y no proporciona sabor desagradable ni amargor a los productos. Sin embargo, los estudios de investigación con este producto son escasos (Rekhy *et al.*, 2014).

- **Dióxido de cloro:** el dióxido de cloro (ClO₂) es un gas de color rojizo a verde amarillento que se disuelve en agua a temperatura ambiente. En su forma pura, es un gas peligroso; sin embargo, es muy improbable que las personas respiren un aire que contenga niveles peligrosos de dióxido de cloro, ya que no se produce de forma natural en el medio ambiente.

Se utiliza para una gran variedad de actividades como antimicrobiano, incluida la desinfección de agua potable. Permite destruir bacterias, virus y algunos tipos de parásitos como *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

Se introdujo como desinfectante para agua potable a gran escala en 1956, cuando Bélgica cambió el cloro por dióxido de cloro. Su utilización más común en tratamiento de agua es como preoxidante con anterioridad a la cloración de agua de consumo para destruir impurezas del agua natural que de otro modo produciría trihalometanos por el cloro libre (el dióxido de cloro únicamente produce un 30 % de trihalometanos frente a un tratamiento con cloro convencional y materia orgánica).

Se sospecha que los trihalometanos son subproductos cancerígenos, y aparecen en algunos casos durante la cloración del agua únicamente cuando hay productos orgánicos que están de modo natural en el agua bruta. Por ello, uno de los métodos de control normalmente utilizados para evitar la formación de trihalometanos en las plantas de tratamiento de agua convencionales es eliminar previamente la materia orgánica presente, o cuando esto no es posible, utilizar desinfectantes alternativos como el dióxido de cloro.

La concentración máxima de dióxido de cloro en agua potable no debe exceder de 0,8 ppm.

El uso del dióxido de cloro en la industria de corte fresco ha sido estudiado y comparado con el hipoclorito de sodio.

Presenta ventajas e inconvenientes:

- **Ventajas:** tiene una mayor capacidad de oxidación, no reacciona con nitrógeno o amoníaco para formar subproductos dañinos, tiene menor reactividad con la materia orgánica, es menos corrosivo que el cloro y puede inhibir el pardeamiento enzimático.

- **Inconvenientes:** su concentración máxima permitida es bastante baja, es inestable (ya que es explosivo y debe generarse in situ), su eficiencia antimicrobiana depende del pH y se degrada fácilmente cuando se expone a la luz solar.

Aunque es un desinfectante aprobado por la Food and Drug Administration (FDA), su utilización no está siendo evaluada por la UE en el *Reglamento Delegado (UE) n.º 1062/2014 de la Comisión, de 4 de agosto de 2014, relativo al programa de trabajo para el examen sistemático de todas las sustancias activas existentes contenidas en los biocidas que se mencionan en el Reglamento (UE) n.º 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo [(Reglamento (UE) n.º 528/2012, de 22 de mayo; Reglamento Delegado (UE) n.º 1062/2014, de 4 de agosto)]*.

- **Clorito sódico acidificado:** este compuesto puede utilizarse en frutas y verduras crudas como spray o inmersión en el rango de 500 a 1200 ppm. Las aplicaciones de clorito sódico acidificado mostraron un efecto antimicrobiano sustancial contra *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* inoculadas en melones y espárragos. Sin embargo, el número de estudios es todavía limitado, y se necesita más información sobre la utilidad general del uso de clorito sódico acidificado en la desinfección de productos (Beuchat, 1998; Parish *et al.*, 2003; Artés *et al.*, 2009).

- **Bromo y yodo:** el bromo y el yodo poseen actividad antimicrobiana, aunque algunas cuestiones relacionadas con la salud limitan su uso en los productos (Ramos *et al.*, 2013).

El bromo posee una relación antimicrobiana sinérgica cuando se añade a soluciones de cloro, pero hay preocupaciones de seguridad sobre la producción de compuestos orgánicos bromados en el ser humano y el medio ambiente (Beuchat, 1998; Parish *et al.*, 2003).

El yodo elemental y las combinaciones de tensioactivos no iónicos o portadores yodóforos, tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana y son menos corrosivos que el cloro a bajas temperaturas. Sin embargo, las soluciones que contienen yodo utilizadas como desinfectantes de productos de contacto directo son limitadas debido a una reacción entre el yodo y el almidón que da lugar a un color azul-púrpura (Parish *et al.*, 2003; Ayala-Zavala *et al.*, 2010).

- **Fosfato trisódico (TSP):** las soluciones con un 15 % de fosfato trisódico son eficaces para la inactivación de *Salmonella* en superficie del tomate. Sin embargo, incluso con un 15 %, sólo se consiguió una reducción de 2 log₁₀ (Zhuang *et al.*, 1996; Beuchat, 1998). Estos autores concluyeron que la utilización del fosfato trisódico como desinfectante para la eliminación de *Salmonella* de la superficie de los tomates verdes maduros tiene un buen potencial. Sin embargo, su utilización para eliminar *L. monocytogenes* de la lechuga rallada se demostró menos eficaz (Weissinger *et al.*, 2000; Parish *et al.*, 2003). Las soluciones que contenían más del 10 % de fosfato trisódico dañaron el calidad sensorial de la lechuga. Hay que tener en cuenta que el pH de las soluciones de fosfato trisódico oscila entre 11 y 12, lo que limita su aplicación comercial como desinfectante de frutas y verduras (Parish *et al.*, 2003).

- **Compuestos de amonio cuaternario (QAC):** los compuestos de amonio cuaternario son tensioactivos catiónicos que son capaces de penetrar en las superficies en contacto con los alimentos más fácilmente que otros desinfectantes (Ramos *et al.*, 2013). Su actividad antimicrobiana es mayor contra los hongos y las bacterias Gram positivas que contra las bacterias Gram negativas (Aase *et al.*, 2000; To *et al.*, 2002). Aunque no están aprobados para el contacto directo con los alimentos, estos compuestos pueden tener una utilidad limitada en productos enteros, ya que el producto debe ser pelado antes de su consumo (Parish *et al.*, 2003).

El contacto directo de estos compuestos con los alimentos requiere una aprobación reglamentaria y una demostración de que los productos son seguros para el consumo (Dunn, 1949; Rossmore, 2001).

- **Agua electrolizada:** existen dos tipos de agua electrolizada con propiedades higienizantes (Ramos *et al.*, 2013):

• **Agua electrolizada ácida o agua electrolizada oxidante (AEW):** el agua oxidante electrolizada, o agua activada, es una tecnología relativamente nueva aplicada en la industria alimentaria. Se obtiene por electrolisis diafragmática de una solución de agua corriente saturada con cloruro sódico. Tiene un fuerte efecto bactericida sobre los microorganismos patógenos y de deterioro (Selma *et al.*, 2008). Este efecto se atribuye a su bajo pH (2,1-4,5), su alto potencial de oxidación-reducción (superior de 1000 mV), y la presencia de oxidantes activos como el ácido hipocloroso (Rico *et al.*, 2007; Keskinen *et al.*, 2009).

• **Agua electrolizada básica o neutra (NEW):** la solución básica electrolizada también tiene un fuerte efecto bactericida con valores de pH que van de 5,0 a 8,5 y valores de potencial de oxidación-reducción que van de 500 a 700 mV (Graça *et al.*, 2011).

Estas soluciones se generan convencionalmente generadas por electrólisis de cloruro sódico acuoso (0,5-1,0 % de NaCl), y se produce una solución ácida electrolizada (AEW) o una solución básica (NEW) en el ánodo y el cátodo, respectivamente (Ramos *et al.*, 2013).

Ha demostrado ser muy eficaz, seguro, fácil de manipular, relativamente barato y ecológico (Huang *et al.*, 2008; Surdu *et al.*, 2018).

Este método consigue una solución desinfectante a partir de agua corriente, sin aditivos químicos, por lo que no hay necesidad de manipular productos químicos concentrados potencialmente peligrosos, tales como cloro. Además, las propiedades del agua electrolizada pueden ser controladas en su lugar de producción (Kim *et al.*, 2000).

La FDA aprueba una concentración máxima de 200 ppm.

- **Peróxido de hidrógeno:** el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un oxidante que posee actividad bacteriostática y bactericida debido a su fuerte poder oxidante y también a la generación de agentes citotóxicos (radical hidroxilo) (Ramos *et al.*, 2013). Se utiliza como agente antimicrobiano o blanqueador en el rango de 0,04-1,25 % hasta 80 ppm en el agua de lavado de productos (Hwang *et al.*, 2001; Akbas *et al.*, 2007; Alexandre *et al.*, 2012).

Para una mayor eficacia de este compuesto, deben utilizarse concentraciones comprendidas entre el 2 y el 4 %; las concentraciones más bajas, en torno al 1-2 %, no son eficaces en la reducción de la carga bacteriana y las concentraciones más altas (4-5 %) interfieren en la calidad general del producto (Beltrán *et al.*, 2005; Rico *et al.*, 2007; Ölmez *et al.*, 2009).

Aunque la eficacia antimicrobiana del peróxido de hidrógeno puede ser comparable a 100-200 ppm de tratamiento con cloro a temperatura ambiente, se lograron mayores reducciones microbianas con el peróxido de hidrógeno y se mantuvo una mayor calidad general cuando se aplicaron temperaturas más altas (50-60 °C) (Parish *et al.*, 2003).

Tiene ventajas e inconvenientes:

• **Ventajas:** la formación de estas especies citotóxicas es lo que asegura sus propiedades antimicrobianas (bactericidas o bacteriostáticas, dependiendo de la concentración, pH y temperatura). Este desinfectante puede aplicarse en superficies en contacto con alimentos.

• **Inconvenientes:** no puede evitar la contaminación cruzada que aún puede ocurrir en el agua de lavado de las verduras, ya que su descomposición es rápida y la cinética de desinfección es lenta. Además, puede producir pardeamiento en las verduras (en especial a la lechuga); por ello, debe añadirse en combinación con un compuesto anti-pardeamiento adecuado (eritorbato de sodio).

Aunque es una sustancia GRAS, la FDA no permite su utilización en descontaminación de productos frescos.

- **Ozono:** el tratamiento con ozono no es una técnica novedosa. Se descubrió en el S. XVIII pero hasta bien entrado el S. XX no se estudió con profundidad. Se utiliza tras su aprobación por el *Real Decreto 168/1985, de 6 de febrero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre Condiciones Generales de Almacenamiento Frigorífico de Alimentos y Productos Alimentarios* (actualmente este Real Decreto está derogado a favor del *Real Decreto 176/2013, de 8 de marzo, por el que se derogan total o parcialmente determinadas reglamentaciones técnico-sanitarias y normas de calidad referidas a productos alimenticios*) (Real Decreto 168/1985, de 6 de febrero; Real Decreto 176/2013, de 8 de marzo).

El ozono es un potente agente antimicrobiano de gran reactividad y penetrabilidad. Cuando se utiliza en el agua, las concentraciones de ozono oscilan entre 0,03 a 20,0 ppm. Cuando se utiliza en forma de gas, la concentración alcanza dosis más altas, como 20.000 ppm (Saftner *et al.*, 2003; Martin-Diana *et al.*, 2005; Manganaris *et al.*, 2006; Rico *et al.*, 2007).

El agua ozonizada se ha aplicado comúnmente con fines de saneamiento de hortalizas frescas cortadas, logrando algunas reducciones microbianas y prolongando la vida útil de los productos (Alexandre *et al.*, 2011a; Alexandre *et al.*, 2011b, Alexandre *et al.*, 2012b; Miller *et al.*, 2013)

Varios estudios demostraron que el ozono gaseoso es generalmente más eficaz que en soluciones acuosas (Klockow *et al.*, 2010). Este tratamiento fue eficaz contra los microorganismos patógenos y de deterioro, asegurando al mismo tiempo una calidad aceptable del producto (Parish *et al.*, 2003; Al-Haddad *et al.*, 2005; Baur *et al.*, 2005; Beltrán *et al.*, 2005a; Hua *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2007; Ölmez *et al.*, 2009).

Otros estudios se ocupan de la acción del ozono gaseoso en el envase. Los resultados indicaron que este tratamiento es muy eficaz contra *E. coli* O157:H7, prolongando además la vida útil de los productos. Sin embargo, en algunos productos como las espinacas, puede producirse una notable degradación del color (Al-Haddad *et al.*, 2005; Klockow *et al.*, 2010; Oner *et al.*, 2011).

Se aconseja iniciar el tratamiento con ozono desde el momento del transporte de los alimentos y mantenerlo en los envases posteriores, ya que en ambos casos es habitual la contaminación patógena tanto de bacterias como de mohos.

Las concentraciones antimicrobianas efectivas de ozono son mucho más bajas en comparación con el hipoclorito de sodio. Sin embargo, hay que considerar la corrosividad y la baja estabilidad (Rekhy *et al.*, 2014).

- **Ácido peroxiacético:** es una combinación de ácido peracético ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que suele comercializarse en forma de líquido. Es un fuerte agente oxidante que se utiliza para lavar frutas y verduras en concentraciones de hasta 80 ppm (Ramos *et al.*, 2013).

El ácido peroxiacético es eficaz en la inactivación de microorganismos patógenos en suspensión a concentraciones más bajas que las requeridas cuando se utiliza el cloro. Sin embargo, los estudios revelaron que 80 ppm de ácido peroxiacético en el agua de lavado no es suficiente para obtener una reducción sustancial reducción de la carga microbiana de las frutas y hortalizas frescas cortadas (Sapers, 2006; Rico *et al.*, 2007; Artés *et al.*, 2009).

- **Ácidos orgánicos débiles:** los ácidos orgánicos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como aditivos. Su aplicación es bien aceptada por los consumidores, ya que la mayoría de ellos están naturalmente presentes en los alimentos como ingredientes.

Muchos ácidos orgánicos son considerados como sustancias GRAS y están aprobados por la FDA y la UE.

Algunos ejemplos son:

- **Ácido acético:** principal ingrediente del vinagre. Se conoce desde tiempos muy remotos y se emplea como condimento y conservante de alimentos.

- **Ácido cítrico:** responsable de la acidez de las frutas cítricas. Para uso industrial, se obtiene por fermentación aeróbica de la caña de azúcar (sacarosa) o del azúcar de maíz (dextrosa) por una cepa de *Aspergillus niger*. Se emplea como acidulante en bebidas carbonatadas y alimentos.

- **Ácido propiónico:** responsable del olor característico del queso suizo.

- **Ácido láctico:** se produce por la fermentación bacteriana de lactosa gracias a *Streptococcus lactis*. Se fabrica industrialmente por la fermentación controlada de hexosas de melaza, maíz y leche y es utilizado como acidulante.

- **Ácido sórbico:** se encuentra en gran variedad de plantas y se utiliza como fungicida y conservante de alimentos, entre otros usos.

- **Ácido ascórbico:** conocido como vitamina C, protege del escorbuto.

- **Ácido málico:** presente, por ejemplo, en las manzanas, cerezas, albaricoques, etc. En ocasiones se utiliza para conferir sabor artificial de vinagre en ciertos productos.

Los ácidos orgánicos presentan ventajas frente al hipoclorito de sodio cuando se utilizan como desinfectantes para la industria de productos frescos, ya que su interacción con moléculas orgánicas no produce compuestos tóxicos ni carcinogénicos. Su posible desventaja es la modificación en el sabor del producto, su alto costo y la corrosividad en los equipos de proceso (Rekhy *et al.*, 2014).

La investigación disponible muestra claramente que, para tener efectos antimicrobianos significativos, estos ácidos orgánicos deben usarse en concentraciones mucho más altas que el hipoclorito de sodio (Rekhy *et al.*, 2014).

1.3.3.2. Métodos físicos

- **Envases modificados:** la forma más sencilla es el envasado al vacío (Vacuum Packed, VP), en el que los productos se envasan en una película poco permeable al O₂, se evacua el aire y se sella el paquete (Arvanitoyannis, 2012):

- **Envasado en atmósfera modificada (EAM/MAP; Modified Atmosphere Packaging):** la técnica de conservación en atmósfera modificada consiste en envasar los productos alimenticios en materiales con barrera a la difusión de los gases, en los cuales el ambiente gaseoso ha sido modificado para disminuir el grado de respiración, reducir el crecimiento microbiano y retrasar el deterioro enzimático con el propósito de alargar la vida útil del producto. Dependiendo de las exigencias del alimento a envasar se requerirá una atmósfera con ambientes ricos en CO₂ y pobres en O₂, los cuales reducen el proceso de respiración de los productos conservando sus características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas por un mayor tiempo (Ospina *et al.*, 2008).

Las atmósferas modificadas tienen su origen en la década de los 30, cuando las embarcaciones que transportaban carne y mariscos desde Australia y Nueva Zelanda a Reino Unido utilizaron gases para preservar los productos.

Las frutas y hortalizas son elementos esenciales de la alimentación humana. Tienen importantes fuentes de energía, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas (A, C, B₆, B₁₂, tiamina, riboflavina, etc.) y minerales (calcio, hierro, magnesio, fósforo). De forma tradicional, las frutas y hortalizas cortadas han sido envasadas con films o películas poliméricas para protegerlas y conseguir que tengan una atmósfera modificada adecuada.

Ello supone aumentar el período de vida útil del producto al reducir la tasa de respiración y de producción de etileno del producto vegetal, con la consiguiente disminución progresiva de los cambios asociados a la maduración y senescencia de los vegetales (Campbell-Platt, 2016).

El envasado en atmósfera modificada (MAP) implica la modificación de la composición de la atmósfera interna de un envase mediante la reducción de la cantidad de oxígeno (O₂) y sustituyéndolo por dióxido de carbono (CO₂) y/o nitrógeno (N₂) (Ramos *et al.*, 2013).

Con ello, se pretende prolongar la vida postcosecha de los productos enteros y precortados reduciendo su tasa de respiración y la producción de etileno, minimizando la actividad metabólica, retrasando la actividad metabólica, el pardeamiento enzimático y conservando el aspecto visual (Cui *et al.*, 2009).

El reequilibrio gaseoso puede lograrse mediante técnicas activas o pasivas dentro de un envase hecho de varios tipos y/o combinaciones de películas (Saxena *et al.*, 2008). Sin embargo, este tipo de envasado tiene un inconveniente relacionado con los niveles de CO₂ generados, que no sólo puede inhibir los microorganismos de deterioro aeróbico sino que también puede permitir o incluso estimular el crecimiento de patógenos (Rosa *et al.*, 2007; Rodríguez-Aguilera *et al.*, 2009).

Los beneficios de emplear atmósferas modificadas son variados, ya que frenan la actividad respiratoria, reducen o inhiben la síntesis de etileno, inhiben la maduración, limitan el ablandamiento (actividad de la pectinestearasa y la poligalacturonasa), retrasan las pérdidas de textura, restringen los cambios de composición (pérdida de acidez y de azúcares, degradación de clorofila, desarrollo de antocianos, biosíntesis de carotenos, prevención de la rancidez y el pardeamiento enzimático; por ello reducen las alteraciones fisiológicas y los daños por frío, manteniendo el color y protegiendo las vitaminas de los productos frescos), retardan el desarrollo de microorganismos, mantienen las características organolépticas durante la comercialización, evitan las mezclas de olores en el sitio de almacenamiento y posibilitan una mejor presentación (clara visión del producto).

Sin embargo, también presenta inconvenientes, tales como la inversión en maquinaria de envasado con gas, el coste de los gases y materiales de envasado y la pérdida de beneficios del envasado cuando se abre o se perfora el envase.

Los materiales poliméricos empleados para el envasado de frutas y hortalizas cortadas en atmósferas modificadas deben de cumplir unos requisitos adecuados en cuanto a permeabilidad a gases, para así disminuir la respiración y producción de etileno en los tejidos vegetales, la pérdida de humedad por transpiración en los mismos, y retrasar el desarrollo microbiano, manteniendo así su calidad y prolongando su vida útil. Además, utilizando atmósferas con altos niveles de O₂ se evita el desarrollo de bacterias anaerobias patógenas como *C. botulinum*, *S. aureus* o *L. monocytogenes*, coliformes como *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., etc., que pueden crecer incluso a temperaturas de refrigeración (Campbell-Platt, 2016).

Al envasar frutas y hortalizas cortadas en películas plásticas con una relativa baja permeabilidad a los gases, se genera en el interior del envase una atmósfera con una concentración baja de O₂ y alta de CO₂ (como resultado de la respiración del propio producto vegetal, y en función de la permeabilidad gaseosa de los films utilizados). Si la concentración de O₂ se reduce hasta un nivel muy bajo y/o la concentración de CO₂ aumenta excesivamente se generan unas condiciones de anaerobiosis, que dan lugar a procesos fermentativos en los tejidos y, en consecuencia, a aumento en los mismos de los contenidos de etanol y acetaldehído, que provocan daños y sabores anormales en los productos (Casp, 2014).

Para evitar este riesgo de anaerobiosis, en el envasado de frutas y hortalizas se eligen películas plásticas que tengan una permeabilidad razonablemente alta al O₂ y CO₂. Es importante resaltar que el uso de una atmósfera modificada complementa (pero no sustituye) los efectos positivos que generan las bajas temperaturas en la conservación de estos productos. Generalmente, la composición de las atmósferas modificadas que resulta beneficiosa para la conservación de la mayoría de frutas y hortalizas se corresponde con un 2-5 % de O₂ y 3-8 % de CO₂, evitando que se excedan los niveles del 10-20 % (Casp, 2014).

La generación de la atmósfera modificada puede ser:

+ **De forma pasiva:** los procesos metabólicos de las frutas y vegetales frescos continúan una vez recolectados. La modificación de forma pasiva tiene lugar por efecto de la respiración y permeabilidad de la película. Normalmente, la estructura del envase lleva incorporada una película polimérica (varía según su naturaleza y temperatura) para que la permeabilidad de los gases a través de la película influya en la composición de la atmósfera que se desarrolla (Campbell-Platt, 2016).

+ **De forma activa:** es una tecnología relativamente nueva dónde se incorporan algunos aditivos en la matriz o dentro del envase para modificar la atmósfera en el interior. Durante la maduración de las frutas y hortalizas se produce etileno (C_2H_4), una hormona vegetal que puede tener efectos positivos y negativos sobre el producto fresco. Hay muchas sustancias adsorbentes de etileno, si bien las comercializadas se basan en el permanganato de potasio (oxida el etileno a acetaldehído, a ácido acético y a CO_2 y H_2O) (Campbell-Platt, 2016).

Es importante tener en cuenta una serie de factores para conseguir una determinada y adecuada atmósfera en el interior de un envase para la conservación de las frutas y hortalizas contenidas en el mismo:

+ **Dependientes del producto:** tasa respiratoria del producto (a la temperatura de almacenamiento); cociente respiratorio del producto (a la temperatura de almacenamiento); cantidad de producto y volumen vacío dentro del envase; concentraciones de O_2 y CO_2 óptimas para el producto.

+ **Dependientes del film plástico:** permeabilidad al O_2 , CO_2 , y vapor de agua, a la temperatura seleccionada (así como la influencia de la humedad relativa sobre los valores de permeabilidad); área superficial del envase; integridad del cierre del envase; tolerancia de la película al manejo mecánico.

En general, las películas plásticas usadas en el envasado en atmósferas modificadas constan de uno o más materiales poliméricos, a los que se adicionan diversos aditivos (plastificantes, estabilizantes, etc.) y con espesores variables: las envolturas de poliestireno (PS) y *policloruro de vinilo* (*Polyvinyl chloride*, PVC) son de 10-15 μ y los de las bolsas de *polipropileno* (*Polypropylene*, PP) de 25-30 μ (Casp, 2014).

Las películas plásticas recomendadas en el envasado de frutas y hortalizas presentan una relación de permeabilidad de CO_2 /permeabilidad de O_2 relativamente alta (de 3 a 5); de esta manera se logra que en el interior del envase sea posible la disminución de los niveles de CO_2 . Esta relación de permeabilidad se conoce como *coeficiente de selectividad* (β), y permite estimar la concentración de CO_2 que se alcanzará en el equilibrio en el interior del envase para una determinada concentración de O_2 deseada en el mismo, y para un producto con un determinado *coeficiente respiratorio* (CR), que se define como la relación CO_2 emitido/ O_2 absorbido (Casp, 2014).

Por otro lado, es necesario abordar el problema de la humedad relativa; para ello, se deben seleccionar películas que tengan una moderada-alta permeabilidad al vapor de agua, con el fin de evitar que una excesiva humedad relativa dentro del envase origine condensación de agua y, por tanto, se deposite agua líquida sobre la superficie de los productos (favoreciendo el crecimiento microbiano). De cualquier forma, la mejor manera de evitar la formación de condensados es evitar fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento y distribución de los productos envasados en atmósfera modificada (Casp, 2014). El agua líquida acumulada en el envase puede conducir al crecimiento de mohos y bacterias, así como al empañamiento de las películas si se permite que se acumulen en el envase. Para ello, se han utilizado almohadillas absorbentes del goteo formadas por sales de poliacrilato y copolímeros ramificados de almidón (pueden absorber el agua líquida 100-500 veces su propio peso) (Campbell-Platt, 2016).

• **Envasado en atmósfera controlada (CAS/CAP; Controlled Atmosphere Storage/Controlled Atmosphere Packaging):** es importante diferenciar el *almacenamiento en atmósfera controlada (CAS/CAP)* del *envasado en atmósfera modificada (EAM/MAP)*. El almacenamiento en atmósfera controlada es una técnica de almacenamiento que posibilita alterar las condiciones de almacenamiento del envase durante su vida útil. Con esta técnica, la composición del gas no se modifica de inmediato pero, a posteriori y utilizando películas o revestimientos adecuados, se puede cambiar el gas, reaccionando a la respiración dentro del envase. Por tanto, la diferencia es que en el envasado en atmósfera modificada (EAM) la composición del gas se modifica inicialmente, creando una atmósfera personalizada para cada tipo de producto y en el almacenamiento en atmósfera controlada (CAS/CAP) la atmósfera se controla continuamente durante todo el periodo de almacenamiento (García Iglesias *et al.*, 2006).

En el almacenamiento en atmósfera controlada (CAS o CAP), se suele utilizar un generador de gas para crear y controlar la atmósfera modificada en un almacén frigorífico donde se guarda el producto (Yam *et al.*, 1995). Sin embargo, en el almacenamiento en atmósfera modificada, la composición inicial de los gases se modifica en una sala de almacenamiento hermética y la atmósfera cambia con el tiempo debido a que el producto se almacena dentro de las tolerancias establecidas y la atmósfera cambia con el tiempo debido a la actividad respiratoria y al crecimiento de microorganismos.

Esta técnica requiere mucho capital y es difícil de operar; por lo tanto, es más apropiado para los alimentos que son susceptibles de cambios a largo plazo, como manzanas, kiwis y peras y la carne (Robertson, 2013).

En el envasado en atmósfera modificada (EAM), el producto se mantiene en un envase de polímero permeable cuidadosamente diseñado, y la atmósfera modificada se crea y mantiene a través de la respiración del producto y la permeabilidad del gas del envase. Es una tecnología más asequible ya que no se necesita un generador de gas (Yam *et al.*, 1995); sin embargo, también es una tecnología más difícil de aplicar ya que la permeabilidad de los envases a los gases debe ser considerada para el mejor diseño.

- **Envases activos e inteligentes:** en los últimos años, uno de los desarrollos más innovadores en el ámbito del envasado de alimentos son los envases activos e inteligentes, basados en interacciones deliberadas con el alimento o el entorno alimentario (Restuccia *et al.*, 2010).

Se basa en la incorporación de determinados agentes en sistemas de envasado (ya sea sueltos dentro del envase, adheridos al interior de los materiales de envasado o incorporados dentro de los propios materiales de envasado) para mejorar la calidad y la seguridad de los alimentos y, por tanto, prolongar su vida útil (Kerry *et al.*, 2006; Dainelli *et al.*, 2008). Como agentes activos se utilizan ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extractos naturales, iones, etanol, etc., que se incluyen en papeles, plásticos, metales o combinaciones de estos materiales (Dainelli *et al.*, 2008; Restuccia *et al.*, 2010), es decir, las sustancias responsables de la función activa o inteligente pueden estar contenidas en un recipiente separado, por ejemplo, en una pequeña bolsita de papel o como sustancias directamente incorporadas al material de envasado (Dainelli *et al.*, 2008; Arvanitoyannis, 2012).

- **Envases de nanocompuestos:** en la actualidad, la industria alimentaria utiliza envases que no son degradables, con el problema medioambiental que ello supone.

Se han utilizado varios biopolímeros en el desarrollo de materiales para envases alimentarios ecológicos; sin embargo sus pobres propiedades mecánicas y de barrera han limitado su uso (de Azeredo, 2009; Duncan, 2011; Roy *et al.*, 2012). El uso de rellenos con al menos una dimensión a nanoescala (nanopartículas) produce nanocompuestos que tienen una mayor superficie, lo que favorece las interacciones entre el relleno y la matriz y el rendimiento del material resultante.

Las tecnologías a nanoescala pueden ser prometedoras para mejorar los envases de los productos. Sin embargo, es necesaria una investigación más amplia antes de su aplicación en la industria alimentaria.

- **Irradiación:** como ya se ha expuesto en el Capítulo I (apartado 1.3.2), el mecanismo de transmisión de calor por radiación se basa en la propiedad que tienen los cuerpos de emitir ondas electromagnéticas desde su superficie en un amplio intervalo de longitudes de onda. Los rayos gamma, los rayos X y los haces de electrones se denominan *radiaciones ionizantes*, porque son capaces de producir iones, átomos o moléculas cargados electrónicamente (Ramos *et al.*, 2013). Tienen los mismos mecanismos en cuanto a sus efectos sobre los alimentos y los microorganismos. El principal objetivo de las radiaciones ionizantes es el agua que produce radicales libres, que reaccionan, destruyen o desactivan los componentes bacterianos (Soliva-Fortuny *et al.*, 2003; Allende *et al.*, 2006; Rico *et al.*, 2007). La irradiación a bajas dosis se aplica a las frutas y verduras frescas para retrasar la maduración del producto y es muy eficaz para reducir los patógenos bacterianos, parasitarios y protozoarios patógenos (Prakash *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2005).

Este tratamiento ha sido aprobado por la FDA para su uso en frutas y verduras a un nivel máximo de 1,0 kGy (Parish *et al.*, 2003). Sin embargo, este organismo evaluó una petición, presentada por la *Food Irradiation Coalition*, solicitando el uso de la irradiación para mejorar la seguridad de los productos frescos cortados a dosis de hasta 4,5 kGy. En respuesta, dictaminaron que sólo para la lechuga Iceberg y las espinacas, hasta una dosis máxima de 4,0 kGy, puede ser utilizada.

- **Luz ultravioleta:** la radiación ultravioleta (UV) se clasifica según la longitud de onda (Prakash *et al.*, 2000):

- **UV-A o de rango cercano:** va de 315 a 400 nm.
- **UV-B o de rango medio:** va de 280 a 315 nm.
- **UV-C o de rango lejano:** va de 100 a 280 nm. Es la más aplicada a las frutas y verduras frescas, ya que actúa directa o indirectamente como agente antimicrobiano. Puede causar daños directos en el ADN bacteriano o puede inducir mecanismos de resistencia contra los patógenos en diferentes frutas y verduras. Dosis bajas dosis de radiación UV-C (254 nm) también reducen el deterioro de una amplia gama de frutas y hortalizas cuando se aplica después de la cosecha (Ben-Yehoshua *et al.*, 2005).

- **Luz pulsada:** una tecnología alternativa a la luz ultravioleta es la luz pulsada (PL) o pulso de luz de alta intensidad (HILP) (Palgan *et al.*, 2011). Es una técnica rápida y eficaz para inactivar microorganismos en alimentos sólidos y líquidos (supone una luz de amplio espectro en el rango de longitud de onda de 100-1100 nm).

La luz pulsada mata a los microorganismos utilizando pulsos de corta duración y alta frecuencia de una luz intensa de amplio espectro, rica en luz UV-C. Produce cambios estructurales del ADN microbiano, comparables a los efectos causados por las fuentes continuas de luz ultravioleta, pero mecanismos adicionales parecen estar implicados (Takeshita *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2005; Pataro *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos componentes de los alimentos también podrían absorber las longitudes de onda efectivas disminuyendo la eficacia del tratamiento (Artés *et al.*, 2009; Ramos-Villarreal *et al.*, 2012).

Los pulsos de luz intensa fueron capaces de matar a los microorganismos utilizando pulsos cortos (85 ns a 0,3 ms) y de alta frecuencia (0,45-15 Hz) o 3-551 J/pulsos de un espectro amplio e intenso rico en luz UV-C (Gómez-López *et al.*, 2005).

- **Procesamiento a alta presión:** con este método los alimentos se someten a presiones elevadas (en el rango de 100-1000 MPa) para lograr la inactivación microbiana y enzimática, sin producir degradación de sabor y de los nutrientes asociados con el procesamiento térmico tradicional.

Puede aumentar la estabilidad química o microbiana y realizar cambios de textura deseables en los productos alimentario, dependiendo de la presión, del tiempo de tratamiento y de los tipos de enzimas y/o microorganismos (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005).

Es un proceso que puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o, incluso, en frío; por ello, el calor daña poco los nutrientes o los sabores y colores naturales (gracias a esto, se consiguen productos de alta calidad).

Proporciona alimentos de alta calidad con mayor seguridad y una vida útil más larga, manteniendo características similares a los productos frescos (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005; Laboissière *et al.*, 2007; Schlüter *et al.*, 2009).

- **Ultrasonidos:** el uso de los ultrasonidos (US) en la industria alimentaria ha sido objeto de investigación y desarrollo desde hace muchos años (Ramos *et al.*, 2013). Este método ha surgido como una tecnología de procesamiento alternativa a los enfoques térmicos convencionales de los alimentos (Rico *et al.*, 2007; Oey *et al.*, 2008).

Los ultrasonidos se utilizan a frecuencias del orden de 20-100 kHz y requiere la presencia de un medio líquido para la transmisión de energía. Por sí solo, el ultrasonido no es significativamente eficaz para disminuir la contaminación microbiana de alta carga (Sagong *et al.*, 2011; Alexandre *et al.*, 2012b). Por este motivo, este tratamiento se ha utilizado en combinación con desinfectantes acuosos (por ejemplo, ácidos orgánicos, cloro y dióxido de cloro) mostrando mejores resultados (Cao *et al.*, 2010).

- **Plasma frío:** sin duda, el plasma de gas frío (gases ionizados no térmicos) ha supuesto una tecnología antimicrobiana muy novedosa para descontaminar superficies infectadas (Ramos *et al.*, 2013).

Se compone de moléculas de gas que han sido disociadas por un aporte de energía; está constituido por fotones, electrones, iones positivos y negativos, átomos, radicales libres y moléculas excitadas o no excitadas que, en combinación, tienen la capacidad de inactivar microorganismos (Fernández *et al.*, 2012).

Este método de higienización flexible utiliza la electricidad y un gas portador como aire, oxígeno, nitrógeno o helio. Su mecanismo de acción se debe a la luz ultravioleta y a los productos químicos reactivos del proceso de ionización del plasma frío (Niemira, 2012).

En el procesamiento de alimentos, la aplicación directa de plasma frío, así como tratamiento semidirecto o indirecto con plasma térmico, es de interés ya que con ellos se pueden tratar los alimentos a bajas temperaturas (< 70 °C) (Ramos *et al.*, 2013).

Los estudios sobre productos han demostrado que el plasma frío es muy eficaz en la eliminación de patógenos humanos superficiales, como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. (Misra *et al.*, 2011; Niemira, 2012; Wang *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013; Schlüter *et al.*, 2013).

1.3.3.3. Métodos biológicos

Para prevenir el crecimiento de patógenos y microorganismos de deterioro en los productos, se ha investigado la aplicación de agentes de biocontrol. Este método se conoce como *bioconservación* y consiste en alargar la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos utilizando microorganismos y/o sus metabolitos (Ramos *et al.*, 2013).

Así, por ejemplo, las bacterias lácticas se han estudiado por poseer un efecto antagónico sobre los patógenos. Se encuentran de forma natural en los productos alimentarios y los estudios sugieren que cuando se aplican a las superficies de los productos, son fuertes competidoras por el espacio físico y nutrientes, y/o pueden producir una amplia gama de metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas que afectan negativamente a los patógenos (Sagong *et al.*, 2011). Las bacteriocinas son sustancias GRAS y se han empleado en combinación con otros aditivos alimentarios como agentes protectores en productos frescos (Rodgers, 2001, 2008).

Por lo tanto, la bioconservación es una forma innovadora y prometedora de prolongar la vida útil de las frutas y hortalizas frescas y reducir riesgos microbianos (Settanni *et al.*, 2008).

1.3.3.4. Métodos combinados

Las tecnologías de barrera más ampliamente utilizadas se basan en las temperaturas de almacenamiento, la actividad del agua, el pH, el potencial redox, las atmósferas modificadas, y la adición de conservantes (Rahman *et al.*, 2011; Randazzo *et al.*, 2009; Trias *et al.*, 2008a; Trias *et al.*, 2008b).

Estos métodos utilizan una secuencia de tratamientos suaves (de baja intensidad) para inhibir o inactivar los factores responsables del deterioro alimentos, evitando el uso de tratamientos únicos en condiciones más severas (Ramos *et al.*, 2013).

Las sinergias de envasado, es decir, la combinación de varias estrategias de envasado con el fin de conseguir tecnologías de barrera eficaces, ofrece ventajas que cada una no puede ofrecer por sí solas. Las tecnologías de barrera más ampliamente utilizadas se basan en las temperaturas de almacenamiento, la actividad del agua, el pH, el potencial redox, las atmósferas modificadas, y la adición de conservantes (Rahman *et al.*, 2011; Randazzo *et al.*, 2009; Trias *et al.*, 2008a; Trias *et al.*, 2008b).

Los envases con atmosfera modificada de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno, combinados con la inmersión en hipoclorito de sodio, han mostrado mejores efectos antimicrobianos que las mismas estrategias por separado. Así, por ejemplo, el método de plasmas de descarga de barrera dieléctrica junto con una atmosfera modificada redujo las colonias de *E. coli* O157:H7 y tiene buenas perspectivas para su uso en envasado de frutas y vegetales cortados y listos para consumo (Lin *et al.*, 2018).

Estos métodos utilizan una secuencia de tratamientos suaves (de baja intensidad) para inhibir o inactivar los factores responsables del deterioro alimentos, evitando el uso de tratamientos únicos en condiciones más severas (Ramos *et al.*, 2013).

La eficacia de los métodos de conservación combinados suele depender de los tipos de tratamiento, el tipo y la fisiología de los microorganismos objetivo, las características de las superficies de los productos, el tiempo de exposición y la concentración del limpiador/desinfectante, el pH y la temperatura (Singla *et al.*, 2011). El objetivo principal es utilizar técnicas de conservación que prolonguen la estabilidad del almacenamiento y no tengan efectos perjudiciales en los atributos de calidad del producto (Parish *et al.*, 2003).

Un claro ejemplo es la impregnación al vacío, que es una de las técnicas modernas ampliamente utilizadas para conservar frutas y verduras frescas. La impregnación al vacío se realiza aplicando una presión de vacío en un tanque o horno que contiene el producto sumergido por un corto tiempo y luego restableciendo la presión atmosférica mientras el producto permanece sumergido. Los productos recién cortados se sumergen en una solución de impregnación al vacío durante un período de tiempo específico, dependiendo de la calidad y el tipo de frutas que se restauran a la presión atmosférica. Después de restaurar el producto a la presión atmosférica, los gases tapados en los poros de las frutas recién cortadas se intercambian en la solución de impregnación al vacío (Singh *et al.*, 2018). Se utilizan diferentes tipos de soluciones de impregnación al vacío, como el jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS), la miel, la solución de glucosa (8 °Brix), el jarabe de arce, etc. (Singh *et al.*, 2018).

1.3.3.5. Métodos basados en ingeniería genética

La utilización de la ingeniería genética para el desarrollo de alimentos vegetales más productivos y resistentes se conoce desde hace años. Esta tecnología se utiliza comúnmente para introducir atributos deseables como la mejora del color, el aroma, el olor y el sabor en diferentes productos hortofrutícolas (Artés *et al.*, 2014). El primer producto transgénico que se introdujo como producto alimentario fue un tomate con una actividad reducida de la poligalactanasa.

Aunque en la última década se han producido grandes avances en estas técnicas, todavía no se ha publicado información sobre el desarrollo de frutas y hortalizas modificadas genéticamente que hayan superado algunos problemas relevantes de la ciencia postcosecha, como la resistencia a los daños por frío, una mayor vida útil o la resistencia a los patógenos (Artés *et al.*, 2104). Sin embargo, se han identificado diferencias en la aclimatación al frío entre hojas y frutos a nivel molecular (Weiss *et al.*, 2009), lo que indica la importancia de los estudios de tejidos específicos. Además, aspectos bioquímicos se ven afectados diferencialmente por el daño por frío, como la síntesis de azúcares, ácidos orgánicos y antioxidantes o glutatión (Gómez *et al.*, 2009). En cuanto a las vías implicadas en el control de la maduración y los rasgos relacionados con la postcosecha, la identificación de expansinas y receptores C₂H₄ (Brummell *et al.*, 1999; Kevany *et al.*, 2007) como genes candidatos para mejorar estos aspectos requiere una mayor validación en varios cultivos.

1.3.4. Sistemas de envasado y comercialización de la IV Gama Alimentaria

Los productos procesados cada vez tienen mayor aceptación y ello posibilita, como es lógico, la aparición de estudios sobre el adecuado diseño de los envases. Hasta ahora se ha empleado el formato tradicional de empaquetado de productos frescos, pero se requieren envases más específicos que puedan combinar varios productos en una sola bandeja, bolsa o tarrina sin que se mezclen los sabores (Villegas, 2014).

Los envases más utilizados son:

- **Bolsas de papel celofán:** son el envase de mayor aceptación por su reducido coste y su presentación, ya que aporta sensación de frescura al producto (Villegas, 2014):



Figura 3. Mezcla de diferentes lechugas en bolsas de papel celofán

Son películas de papel celofán creadas específicamente para empaque horizontal y, al tratarse de películas flexibles y robustas pero transparentes y brillantes, resultan perfectas para realzar cualquier producto y hacer que destaque su elección en los lineales de los supermercados.

- **Tarrinas de diversos polímeros plásticos:** son muy utilizadas por su gran versatilidad las tarrinas de *polipropileno biaxialmente orientado* (*Biaxially Oriented Polypropylene*, BOPP), de *polietileno de baja densidad* (*Low Density Polyethylene*, LDPE) y de *propileno lineal de baja densidad* (*Linear Low Density Polyethylene*, LLDPE) recubiertas por películas 100 % biodegradable en PLA CELULOSA.

- **Bandejas:** generalmente se utiliza el *poliestireno* (*Polystyrene*, PS) expandido envuelto en films retráctiles de polímeros plásticos flexibles como el LDPE:



Figura 4. Pimiento verde cortado en trozos envasado en tarritas de LLDPE con tapadera retráctil del mismo material

El envasado es una operación de vital importancia en la manipulación y distribución de las frutas y hortalizas cortadas. La finalidad principal del envasado en este tipo de productos, desde el momento de su elaboración hasta el momento de su consumo, es:

- **Facilitar unidades convenientes de manipulación y venta.**
- **Aportar un sistema de protección física del producto.**
- **Prevenir la contaminación.**

En general, un envase alimentario debe cumplir las siguientes funciones:

- **Proteger al contenido de agentes externos (biológicos, químicos o físicos).**
- **Prevenir o retardar el deterioro y la pérdida de calidad del producto.**
- **Permitir un fácil llenado y cerrado.**
- **Resistir determinadas condiciones:** por ejemplo, condiciones térmicas que se apliquen durante la preparación del producto.
- **Reducir la interacción entre material del envase y el contenido.**
- **Aportar una satisfactoria apariencia comercial, facilitando el adecuado etiquetado del producto.**

Antes, durante o después del envasado se puede aplicar algún método físico de conservación tal como la refrigeración, la atmósfera modificada o la adición de algunos productos químicos (son pocos los que se han considerado seguros y no tóxicos, tales como el ácido cítrico y el ácido ascórbico).

Estos métodos de conservación se utilizan para reducir el crecimiento de microorganismos y la actividad enzimática en los tejidos vegetales (polifenoloxidasas, peroxidadas, pectinesterasas, etc.), que son responsables de la alteración del producto. La actividad enzimática aumenta especialmente en los tejidos dañados después de operaciones como el corte, como consecuencia del mayor contacto entre sustratos y enzimas que hace posible la aparición de procesos de ablandamiento, decoloración, etc. Además, se genera una mayor disponibilidad de nutrientes celulares liberados que serán utilizados por los microorganismos contaminantes. En la medida de lo posible, lo ideal es utilizar la sinergia de diversos métodos de conservación (Guerrero, 2014).

2. Objetivos

El procesamiento de vegetales frescos de IV Gama incluye varias etapas, entre las que se encuentran el lavado en presencia de algún desinfectante químico. Sin embargo, no están sujetos a ninguna inactivación microbiana, como la pasteurización o la cocción, lo que hace que estos productos sean una importante vía de transmisión para patógenos alimentarios esporulados, sobre todo para grupos de población más susceptible a este tipo de enfermedades por tener debilitado su sistema inmune.

Los vegetales y verduras de IV Gama, frescos y cortados, son mucho más propensos a la degradación microbiana en comparación con los vegetales enteros de I Gama, ya que tienen mayor superficie expuesta al ambiente exterior. Esto disminuye aún más su calidad nutricional y vida útil, por lo que se requieren métodos específicos de envasado y un almacenamiento en condiciones de temperatura y humedad adecuadas en todo momento.

Para que estos productos tengan una calidad, seguridad y valor nutricional adecuado, la industria necesita implementar diferentes estrategias mediante la introducción o combinación de técnicas sostenibles, especialmente los procedimientos estándar de saneamiento.

Por otro lado, para los vegetales de I Gama (ya sea en restauración colectiva, hospitales o en el ámbito doméstico) se suele adicionar lejía a la hora de lavarlos para lograr la desinfección; sin embargo, estudios recientes han alertado sobre la posible formación de compuestos reactivos dañinos para la salud, por lo que sería adecuado buscar opciones caseras de desinfección menos dañinas que la lejía apta para el consumo humano.

Según todo esto, los objetivos principales de nuestro estudio han sido:

- **Estudiar la calidad higiénica de verduras y vegetales de I Gama procedentes de diferentes establecimientos comerciales y ver la evolución microbiana según la presencia o no de peciolo a lo largo del sistema de almacenamiento en refrigeración.**
- **Estudiar la calidad higiénica de verduras y vegetales de IV Gama procedentes de diferentes establecimientos comerciales y ver la evolución microbiana según la presencia o no de peciolo a lo largo del sistema de almacenamiento en refrigeración.**
- **Realizar un estudio comparativo sobre la calidad microbiológica entre estos vegetales de I y IV Gama para poder determinar qué sistema de comercialización es más idóneo a la hora de garantizar la seguridad alimentaria.**

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras analizadas

En el siguiente estudio se analizaron 54 muestras de vegetales y verduras (con peciolo y sin peciolo), adquiridas siempre en un importante comercio del sector agroalimentario de Granada capital y de distintas marcas comerciales. De ellas:

- **27 muestras pertenecen a la I Gama alimentaria.**
- **27 muestras pertenecen a la IV Gama alimentaria:** envasadas en atmósfera modificada.

Todas ellas fueron almacenadas en refrigeración a +4 °C tras el proceso de la compra hasta el momento de realizar los análisis microbiológicos.

Los análisis se efectuaron por triplicado en cada una de las muestras y éstas se mantuvieron en refrigeración en todo momento y adecuadamente protegidas evitando una contaminación exógena de las mismas.

Se han estudiado los microorganismos descritos en el Capítulo I (*L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus*, microorganismos aeróbicos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras).

3.2. Métodos de análisis microbiológico

3.2.1. Preparación de las muestras

Descrito en el apartado 3.2.1. del Capítulo I.

3.2.2. Enriquecimiento y medios de cultivo

Descrito en el apartado 3.2.2. del Capítulo I.

3.2.3. Incubación y conservación de cultivos

Descrito en el apartado 3.2.3. del Capítulo I.

3.2.4. Recuento de microorganismos

Descrito en el apartado 3.2.4. del Capítulo I.

3.2.5. Material utilizado

Descrito en el apartado 3.3. del Capítulo I.

3.3. Tratamiento estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS 22.0 para Windows (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, EE.UU.). Los datos se expresaron como el promedio y desviación estándar de cuatro repeticiones. Se aplicó el ANOVA, prueba de comparación para detectar las diferencias entre las medias y regresión lineal. Diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

4. Resultados y discusión

4.1. Presencia y evolución microbiana en vegetales de I Gama. Importancia del peciolo sobre el crecimiento microbiano

Aunque las muestras estudiadas se compraron a nivel local, éstas son vendidas ampliamente en todo el país y su consumo es alto, por lo que este estudio es bastante representativo.

Las muestras han sido divididas entre:

- **Verduras con peciolo:** se han analizado un total de 27 muestras entre brotes de espinacas, grelos y acelgas.

- **Verduras sin peciolo:** se han analizado un total de 27 muestras entre escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg.

El *peciolo*, en botánica, hace referencia a la parte de la hoja que une la lámina con su base foliar o tallo. Las hojas con este peciolo se denominan *hojas pecioladas* (por ejemplo, las hojas de espinacas):



Figura 5. Hoja peciolada de espinacas

El peciolo es una estructura delgada y de intenso color verde, cuya función es la de suministrar savia a la hoja y de vuelta desde ésta, además de dar al limbo una sujeción firme contra los elementos. Esta estructura une la lámina con el tallo y es generalmente cilíndrica y estrecha. En las hojas sin peciolo, el limbo sale directamente de la ramita y se denominan *hojas sésiles*, como sucede por ejemplo en las hojas de lechuga Romana:



Figura 6. Hoja sésil (sin peciolo) de lechuga Romana

Los análisis se han realizado el día que se compraron (1^{er} día), a mitad de su almacenamiento en refrigeración (3^{er} día) y al 5^o día de su almacenamiento en refrigeración, considerando esta fecha como el tiempo máximo de almacenamiento que soporta una verdura sin que empiecen a aparecer signos propios de enmohecimiento.

4.1.1. Calidad higiénica de verduras de I Gama con peciolo

En la Tabla 1 se recogen los recuentos microbianos encontrados en verduras y vegetales de I Gama con peciolo:

Tabla 1. Concentración (media ± EEM) de los distintos microorganismos objeto de estudio, según el día de almacenamiento en refrigeración, en verduras de I Gama con peciolo

VERDURAS DE I GAMA CON PECIOLO							
I Gama	Día	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>C. perfringens</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>B. cereus</i> (UFC/g) Media ± EEM	Mesófilos (UFC/g) Media ± EEM	Psicrófilos (UFC/g) Media ± EEM	Mohos y levaduras (UFC/g) Media ± EEM
Grellos	0	2,33 x 10 ² ± 0,40 x 10 ²	0,80 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	0,89 x 10 ⁴ ± 0,17 x 10 ⁴	0,84 x 10 ⁴ ± 0,23 x 10 ⁴	0,95 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	2,33 x 10 ² ± 0,60 x 10 ²
	3	2,99 x 10 ² ± 0,16 x 10 ²	1,10 x 10 ¹ ± 0,30 x 10 ¹	1,39 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴	1,29 x 10 ⁴ ± 0,13 x 10 ⁴	1,56 x 10 ⁴ ± 0,08 x 10 ⁴	3,33 x 10 ² ± 0,36 x 10 ²
	5	3,20 x 10 ² ± 0,04 x 10 ²	1,40 x 10 ¹ ± 0,30 x 10 ¹	2,27 x 10 ⁴ ± 0,07 x 10 ⁴	1,93 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	2,62 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	7,67 x 10 ² ± 0,20 x 10 ²
Brotos Espinacas	0	3,13 x 10 ² ± 0,30 x 10 ²	2,30 x 10 ¹ ± 0,40 x 10 ¹	1,13 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴	1,07 x 10 ⁴ ± 0,15 x 10 ⁴	1,12 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴	20,70 x 10 ² ± 0,60 x 10 ²
	3	3,85 x 10 ² ± 0,20 x 10 ²	2,40 x 10 ¹ ± 0,30 x 10 ¹	2,24 x 10 ⁴ ± 0,13 x 10 ⁴	1,76 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	2,30 x 10 ⁴ ± 0,26 x 10 ⁴	23,00 x 10 ² ± 0,46 x 10 ²
	5	4,53 x 10 ² ± 0,06 x 10 ²	4,10 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	2,21 x 10 ⁴ ± 0,10 x 10 ⁴	2,73 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	2,95 x 10 ⁴ ± 0,07 x 10 ⁴	37,00 x 10 ² ± 0,80 x 10 ²
Acelgas	0	2,85 x 10 ² ± 0,25 x 10 ²	0,15 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	1,69 x 10 ⁴ ± 0,02 x 10 ⁴	1,34 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	1,90 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	1,33 x 10 ² ± 0,58 x 10 ²
	3	3,35 x 10 ² ± 0,20 x 10 ²	0,40 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	2,43 x 10 ⁴ ± 0,09 x 10 ⁴	2,06 x 10 ⁴ ± 0,13 x 10 ⁴	2,65 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	2,33 x 10 ² ± 0,15 x 10 ²
	5	3,75 x 10 ² ± 0,15 x 10 ²	0,60 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	2,67 x 10 ⁴ ± 0,07 x 10 ⁴	2,30 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴	2,97 x 10 ⁴ ± 0,16 x 10 ⁴	4,67 x 10 ² ± 0,52 x 10 ²

En general, las verduras pertenecientes a la I Gama con peciolo presentan un alto recuento bacteriano para los microorganismos estudiados, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) especialmente en el caso de *B. cereus*, *C. perfringens* y mohos y levaduras.

De todas las verduras analizadas son las especies con peciolo (espinacas y grelos) las que presentan mayores valores bacterianos, llegándose a alcanzar a los 5 días de almacenamiento en refrigeración valores muy próximos a los límites considerados como seguros, sobre todo para *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *C. perfringens*.

La principal causa de deterioro de las verduras es el ataque por diferentes tipos de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como por mohos y levaduras. El problema del deterioro microbiano de estos alimentos tiene implicaciones económicas, tanto para los fabricantes y distribuidores (deterioro de materias primas, reducción de la vida útil en los anaqueles de los supermercados, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para los consumidores (aparición de enfermedades de transmisión alimentaria) sino se realiza una adecuada desinfección de los vegetales en restauración casera y colectiva (Little *et al.*, 2008).

Es conocido que las verduras frescas para ensaladas, hierbas o frutas pueden contaminarse a nivel de la producción primaria a través de las aguas de riego y del empleo de abono animal no suficientemente tratado (Comisión Europea, 2002). Sin embargo, solo en los últimos años se ha hecho evidente y recurrente la asociación de alimentos, como las verduras para ensaladas, con enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que demuestra que pueden surgir problemas de salud importantes por el consumo de verduras contaminadas si las prácticas de higiene a nivel de la producción primaria no son las adecuadas. En nuestro caso, los altos recuentos microbianos encontrados en las verduras analizadas, especialmente en las espinacas y para microorganismos potencialmente peligrosos para la salud humana como *L. monocytogenes* y *C. perfringens*, pudiera ser atribuido tanto a deficientes prácticas higiénicas en el sector primario como a una contaminación adicional a nivel de la distribución y comercialización de estos alimentos en las grandes cadenas de alimentación. Por ello, coincidimos con algunos autores (Fisher *et al.*, 2005) que preconizan que las verduras, hierbas y frutas están expuestas a una variedad de condiciones durante el crecimiento, la cosecha, la preparación y la distribución, y es posible que estas condiciones puedan aumentar el potencial de contaminación microbiana, destacando la necesidad de la implementación de buenas prácticas de higiene de la granja a la mesa para prevenir la contaminación y/o el crecimiento bacteriano en estos vegetales, especialmente cuando van a ser consumidos en crudo como sucede hoy día con el creciente auge de los llamados “batidos verdes”. En nuestro estudio, las tres verduras de hoja verde analizadas (espinacas, grelos y acelgas), al quinto día de almacenamiento en refrigeración, presentan una calidad microbiana bastante mala; de ahí la importancia de concienciar al consumidor de este tipo de “batidos verdes” y la necesidad de higienizar muy bien estas verduras antes de su consumo.

Hay que tener en cuenta que estos batidos verdes se consumen en crudo y no existe ningún tratamiento térmico higienizante posterior a su preparación que pueda garantizar la calidad higiénica de las verduras de hoja verde analizadas, lo que podría acarrear un serio peligro de salud pública. Tal como recogen algunos autores (Neher *et al.*, 2019), el compost de aves de corral usado como abono en un campo de espinacas actuó como vehículo de bacterias de naturaleza entérica tales como *C. perfringens* y *E. coli*. En este mismo sentido se postulan otros autores (Shepherd *et al.*, 2010) al afirmar que si las condiciones en la superficie del compost procedentes de deshechos avícolas no son adecuadas, se puede permitir la supervivencia de patógenos (tales como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*) en los suelos de cultivo, especialmente en campos de cultivo de hortalizas verdes como las acelgas y espinacas.

En nuestro caso desconocemos la trazabilidad de las verduras analizadas, ya que esta información no aparece al consumidor cuando realiza el acto de la compra en una gran superficie comercial (sí podría justificar los altos recuentos obtenidos en bacterias entéricas y ubicuas como *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus*). Estos resultados encontrados por nosotros estarían de acuerdo con el estudio llevado a cabo por algunos autores (Devarajan *et al.*, 2021) que, al evaluar los impactos de la basura de aves de corral compostada sobre las comunidades bacterianas en terrenos de cultivo, encontraron que la supervivencia de microorganismos tales como *Salmonella enterica* y *L. monocytogenes* es muy alta y, por tanto, la contaminación de vegetales así cultivados es mayor:

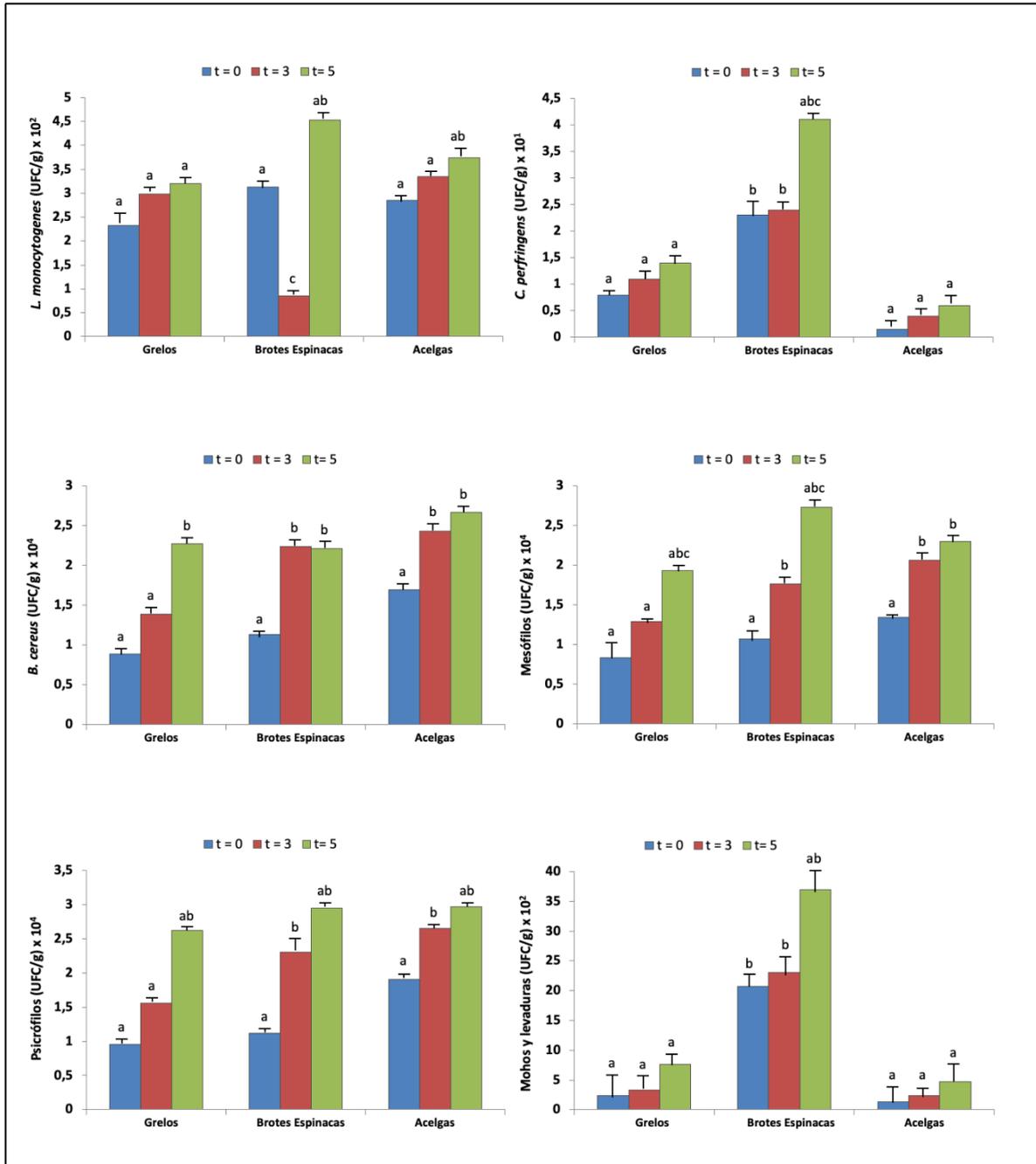


Figura 7. Recuentos microbianos medios medidos como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) en verduras de I Gama con peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas entre las verduras analizadas (p < 0,05)*

De las tres verduras analizadas, son los brotes de espinacas los que presentan mayores recuentos microbianos al quinto día de su almacenamiento en refrigeración y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellos y las otras dos verduras, especialmente para *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y mohos y levaduras. Las espinacas aparecen en la literatura científica como verduras con alto grado de contaminación biológica. Los datos de nuestro estudio coinciden con los aportados por ciertos autores (Warriner *et al.*, 2009), quienes describen como, en la primera década del actual siglo, los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos relacionados con los productos frescos han sido cada vez más frecuentes y generalizados. Dentro de estos brotes de alto impacto, hay que recoger el asociado con las espinacas contaminadas con *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, que provocaron casi 200 casos de enfermedades transmitidas por alimentos en América del Norte y pérdidas de mercado superiores a los 300 millones de dólares.

El razonamiento científico para reducir o eliminar los microorganismos patógenos en el contexto agrícola está cambiando y todavía no se ha perfilado del todo, pero es necesario concienciar en el seno de la industria de las actividades que los agricultores, empacadores y transportistas a nivel individual deben poner en práctica a fin de reducir al mínimo la contaminación microbiana.

En nuestro estudio, a las espinacas le siguen en orden de contaminación microbiana las acelgas y, a continuación, los grelos. Ambas verduras presentan también altos recuentos microbianos en microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, así como en *B. cereus*, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas verduras y estos microorganismos al quinto día de su almacenamiento en refrigeración.

Investigaciones recientes han identificado que las frutas y verduras son la fuente de gran cantidad de brotes de enfermedades y que contribuyen a la transmisión de éstas en mayor medida que los alimentos de origen animal, siendo las espinacas, las acelgas y los grelos alimentos que con mayor frecuencia se han visto implicados en infecciones alimentarias en Estados Unidos y Canadá en los últimos años (Berger *et al.*, 2010).

Un estudio llevado a cabo por ciertos investigadores (Kozak *et al.*, 2013), determinó que de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos relacionados con el consumo de productos agrícolas en Canadá, desde 2001 hasta 2009, las infecciones bacterianas representaron el 66 % del total y los vehículos alimentarios más comúnmente implicados en los brotes fueron las verduras de hoja verde (como espinacas y acelgas) y las hierbas.

Por otro lado, un estudio realizado por otros investigadores (Callejón *et al.*, 2015) aborda la ocurrencia de brotes de transmisión alimentaria asociados con el consumo de frutas y verduras frescas en los Estados Unidos y la Unión Europea durante el período comprendido entre los años 2004 y 2012, prestando especial atención a los patógenos responsables de estos brotes, los mecanismos de contaminación y los vehículos de productos frescos involucrados. Este estudio concluye que en la mayoría de los brotes relacionados con el consumo de vegetales verdes, *Norovirus*, *Salmonella* y *L. monocytogenes* son los patógenos involucrados en la mayoría de las infecciones asociadas con los brotes.

Nuestros resultados coinciden con los de estos autores ya que las tres verduras de hoja verde analizadas (espinacas, acelgas y grelos), al quinto día de su almacenamiento en refrigeración, presentan una deficiente calidad microbiológica que las puede convertir en vehículos potenciales de enfermedades de transmisión alimentaria, especialmente si no se someten a un adecuado proceso de limpieza y desinfección antes de su consumo, por los altos recuentos en *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *C. perfringens*.

L. monocytogenes y *B. cereus* son microorganismos capaces de formar *biofilms*. Son varios los estudios que preconizan la facilidad que tienen estos microorganismos para adherirse a la superficie de las hojas de vegetales verdes como espinacas y lechugas. En nuestro estudio, *L. monocytogenes* es un microorganismo que presenta, al quinto día de su almacenamiento en refrigeración, valores el doble de los considerados como higiénicamente seguros, especialmente en las espinacas y en las acelgas y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en relación con los grelos. Tal vez esté contribuyendo a estos altos recuentos microbianos esta formación de *biofilms* de este patógeno sobre la superficie de las hojas.

Como establece el estudio llevado a cabo por ciertos autores (Sokunrotanak *et al.*, 2014), si bien los productos frescos y saludables (como las verduras) se han vuelto populares, los productos frescos han contribuido a muchos brotes de *L. monocytogenes*, que puede formar una biopelícula madura en 24 horas sobre la superficie de las hojas al estar protegida por los estomas; no obstante, esta biopelícula es más susceptible a los productos químicos en el repollo que en la lechuga.

El otro microorganismo formador de biofilms que presenta recuentos microbianos elevados en las tres verduras de hoja verde analizadas ha sido *B. cereus*, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre estas verduras al quinto día de su almacenamiento en refrigeración. Esto puede deberse a que las esporas y las células vegetativas de *B. cereus* se adhieren rápidamente a los vegetales de hojas verdes (Elharriry, 2011). La fuerza de fijación y la capacidad de formación de biopelículas aumentan con el tiempo, de ahí que en nuestro caso, tanto en los grelos como en los brotes de espinacas y en las acelgas, hayamos encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los recuentos microbianos de *B. cereus* entre el primer y el quinto día de almacenamiento en refrigeración. Por ello, se hace necesario imponer prácticas higiénicas para garantizar la seguridad de las verduras de hoja verde. En esta misma línea se pronuncian otros autores (Hussain *et al.*, 2019), que estudiaron la capacidad que tiene *B. cereus* (ATCC 10987 y ATCC 14579) para formar biofilms sobre la superficie de vegetales de hoja verde como espinacas y lechugas, siendo necesario acudir a una cinética de desinfección de agua electrolizada ligeramente ácida (SAEW) con calor suave y ultrasonidos para eliminar los biofilms, cosa que no sucede con la desinfección tradicional, ya que los biofilms se adhieren con fuerza a la superficie de las hojas y requieren de ultrasonidos para su completa eliminación.

El consumo de verduras y frutas ha aumentado debido a sus beneficios para la salud, pero este aumento también está relacionado con un número significativo de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Macieira *et al.*, 2021) que representan una amenaza para la salud pública. Es importante entender que la seguridad alimentaria comienza en la granja y continúa a lo largo de la cadena de suministro.

Nuestros resultados concuerdan con los de todos estos autores por lo que propugnamos que, para obtener productos seguros, los productores de alimentos deben seguir procedimientos específicos para evitar peligros alimentarios a lo largo de la cadena de suministros (de ahí la necesidad de dar a conocer la importancia de la inocuidad alimentaria en hortalizas y frutas, especialmente en la agricultura local ya que esta forma de producción y consumo se ha incrementado en varios países del hemisferio norte, y como éstos son considerados una forma de brindar productos alimenticios más sostenibles).

Los patógenos que más preocupan actualmente son *Salmonella* (tomates, semillas germinadas y especias) y *E. coli* O157: H7 en las verduras de hoja (espinaca y lechuga) (Olaimat *et al.*, 2012). Sin embargo, no se están teniendo en cuenta otros patógenos emergentes como *L. monocytogenes*, *B. cereus* o *C. perfringens*, cuyo hábitat natural son los suelos de cultivo y los lodos de los campos junto con el agua de riego y las aguas procedente de las inundaciones. Se hace, por tanto, necesario aumentar nuestra comprensión de todos aquellos factores que influyen en la seguridad microbiana de los vegetales frescos.

Hay que tener en cuenta que los nichos de producción primaria del agroecosistema, entre los cuales se encuentran el suelo agrícola y el agua de riego, sirven como reservorios potenciales de algunas bacterias patógenas transmitidas por los alimentos de importancia clínica. Estas bacterias clínicamente importantes incluyen: *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *L. monocytogenes* y *B. cereus* (Iwu *et al.*, 2019). En el caso de las verduras de hoja verde pecioladas estudiadas por nosotros, los recuentos en *L. monocytogenes* y *B. cereus* se encuentran en niveles muy altos, que pueden convertir a estas verduras en vehículos potenciales de enfermedad si no se extreman las medidas de higiene a nivel de la restauración casera y colectiva. En esta misma línea se postulan otros autores (Wadamori *et al.*, 2017), que identifican a *Salmonella* spp., *E. coli* O157: H7, *S. aureus*, *Campylobacter* spp., *B. cereus*, *C. perfringens* y *L. monocytogenes* como los patógenos más comunes que contaminan los productos frescos, entre ellos las verduras y las frutas.

Con relación a los mohos y levaduras en alimentos no ácidos que conservan la humedad (como las verduras), crecen más lentamente que las bacterias y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. Los niveles encontrados en las verduras analizadas son considerados higiénicamente seguros.

4.1.2. Calidad higiénica de verduras de I Gama sin peciolo

En la Tabla 2 se recogen los recuentos microbianos encontrados en verduras y vegetales de I Gama sin peciolo:

Tabla 2. Concentración (media ± EEM) de los distintos microorganismos objeto de estudio, según el día de almacenamiento en refrigeración, en verduras de I Gama sin peciolo

VERDURAS DE I GAMA SIN PECIOLO							
I Gama	Día	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>C. perfringens</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>B. cereus</i> (UFC/g) Media ± EEM	Mesófilos (UFC/g) Media ± EEM	Psicrófilos (UFC/g) Media ± EEM	Mohos y levaduras (UFC/g) Media ± EEM
Escarola	0	1,30 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,30 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,83 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,59 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,90 x 10 ⁴ ± 0,66 x 10 ⁴	n.d.
	3	2,10 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,50 x 10 ¹ ± 0,00	1,03 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,92 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	1,31 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	n.d.
	5	3,10 x 10 ¹ ± 0,07 x 10 ¹	0,50 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	1,34 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	1,22 x 10 ⁴ ± 0,09 x 10 ⁴	1,49 x 10 ⁴ ± 0,01 x 10 ⁴	n.d.
Lechuga Iceberg	0	2,20 x 10 ¹ ± 0,12 x 10 ¹	0,50 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,86 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	0,64 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,85 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	n.d.
	3	3,10 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,90 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	1,15 x 10 ⁴ ± 0,17 x 10 ⁴	0,91 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	1,35 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	n.d.
	5	3,90 x 10 ¹ ± 0,12 x 10 ¹	1,00 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	1,36 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	1,18 x 10 ⁴ ± 0,16 x 10 ⁴	1,41 x 10 ⁴ ± 0,10 x 10 ⁴	n.d.
Lechuga Romana	0	1,80 x 10 ¹ ± 0,05 x 10 ¹	0,20 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	1,09 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴	0,74 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	1,05 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	1,33 x 10 ² ± 0,15 x 10 ²
	3	2,23 x 10 ¹ ± 0,03 x 10 ¹	0,20 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	1,25 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴	0,94 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	1,41 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	1,67 x 10 ² ± 0,15 x 10 ²
	5	2,80 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,80 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	1,35 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	1,30 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	1,63 x 10 ⁴ ± 0,76 x 10 ⁴	4,67 x 10 ² ± 0,58 x 10 ²

Como podemos observar, los recuentos microbianos en las verduras de I Gama sin peciolo son significativamente menores ($p < 0,05$), para todos los microorganismos estudiados, que en la I Gama con peciolo. Para ninguna de las tres variedades de ensalada, al cabo del quinto día de almacenamiento en refrigeración, llegan a superarse los límites considerados higiénicamente seguros. Sólo hay una excepción, *L. monocytogenes*, que sigue presentando recuentos altos aunque menores que los encontrados en las verduras de hoja verde pecioladas, siendo la lechuga Iceberg la que presenta un mayor crecimiento en este microorganismo y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la lechuga Romana.

Lo mismo sucede con el crecimiento de *C. perfringens*, presentando la lechuga Iceberg los valores más altos al quinto día de su almacenamiento en refrigeración, y con unos valores superiores a los encontrados en la escarola ($p < 0,05$). Por el contrario, *B. cereus* presenta una cinética de crecimiento muy parecida en las tres lechugas analizadas, no existiendo al quinto día de almacenamiento diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes lechugas y el recuento en este microorganismo, aunque de todos los microorganismos analizados es el que presentan mayores recuentos. Lo mismo sucede para el crecimiento de microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos en las tres lechugas analizadas.

En relación con los mohos y levaduras, hay que señalar que no se ha detectado crecimiento en las lechugas escarola e Iceberg. Por el contrario, en la ensalada Romana sí hay crecimiento de mohos y levaduras aunque los recuentos son menores y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a los encontrados en las verduras de hoja verde con peciolo.

En cuanto a los microorganismos mesófilos, su presencia en un alimento indica la posible presencia simultánea de microorganismos patógenos ecológicamente relacionados, tales como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., y *L. monocytogenes*. Estos microorganismos, en microbiología alimentaria, se utilizan como indicadores que ponen de manifiesto deficiencias en la calidad microbiológica de un determinado alimento en términos más generales. De las tres muestras analizadas, es la lechuga Romana, al quinto día de almacenamiento, la que presenta mayores recuentos en microorganismos mesófilos aunque no presenta diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) respecto a la lechuga Iceberg y a la escarola. No obstante, estos valores se encuentran dentro de los rangos aceptables de un alimento higiénicamente seguro.

Con relación a los microorganismos psicrófilos, ciertos autores (Manvell *et al.*, 1986), al evaluar la calidad microbiana de ensaladas almacenadas en frío, encuentran que los recuentos en microorganismos psicrófilos aumentan cuando se rompe la cadena de frío, por lo que la cuantificación de este tipo de microorganismos puede servir como indicador de temperaturas abusivas durante la etapa de almacenamiento de las verduras de ensalada no ácidas.

En nuestro caso, los recuentos obtenidos en estos microorganismos son elevados, aunque inferiores a los encontrados en las verduras pecioladas analizadas, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el recuento en microorganismos psicrófilos en lechuga Romana en comparación con las otras dos variedades de lechugas analizadas (Iceberg y escarola). Todas las muestras analizadas en este estudio, adquiridas en los supermercados, estaban expuestas para su venta en anaqueles a temperatura de refrigeración. Para estos microorganismos psicrófilos, las temperaturas mínimas de desarrollo van de - 5 a + 5 °C, las temperaturas óptimas de desarrollo se encuentran entre 12 y 15 °C y las temperaturas de desarrollo máximas oscilan entre 15 y 20 °C; de ahí que altos recuentos microbianos en microorganismos psicrófilos en alimentos refrigerados se utilicen como indicadores de que se ha roto la cadena de frío.

Nuestros datos coinciden con los obtenidos por otros autores (Szczecz *et al.*, 2018), que durante el periodo comprendido entre 2010 y 2014 recogieron 600 muestras de lechugas Romanas orgánicas y 372 muestras de lechugas convencionales de fincas certificadas cultivadas, encontrando niveles medios de mohos y levaduras y de bacterias mesófilas, respectivamente, de $9,2 \times 10^3$ UFC/g y de $10,2 \times 10^1$ UFC/g, sin que existieran diferencias según el sistema de cultivo seguido. No obstante, otros investigadores (Ingham *et al.*, 2005) encontraron que el intervalo de fertilización a siembra con compostaje animal afectó la prevalencia de microorganismos como *E. coli*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* en lechugas pero no en cultivos de raíces como rábanos y zanahorias. En nuestro estudio, las verduras no se vendían como productos procedentes de agricultura ecológica; sin embargo, los mayores recuentos microbianos se han obtenido para *B. cereus* y esto, probablemente, se deba a la contaminación inicial de los suelos de cultivo al ser una bacteria esporular ubicuitaria en el medio ambiente que se encuentra fundamentalmente en suelos y aguas (por lo que contamina fundamentalmente a los alimentos de origen vegetal). Las cepas de *B. cereus* están muy extendidas en el medio ambiente y pueden aislarse del suelo y vegetación. Desde el suelo, se pueden transferir a varios elementos asociados, incluidas las plantas (European Food Safety Authority, 2016).

Los valores encontrados por nosotros coinciden con los obtenidos por otros autores (Abadias *et al.*, 2008) que, al analizar la calidad microbiológica de frutas y hortalizas frescas mínimamente procesadas y brotes de establecimientos minoristas, encontraron que los recuentos más bajos se asociaron generalmente con la escarola y la lechuga recién cortadas [(6,2 y 6,3 log UFC g (-1) de microorganismos aeróbicos mesófilos; 4,9-5,1 log UFC g (-1) de microorganismos psicrófilos; 4,4 y 4,6 log UFC g (-1) de mohos y levaduras)]. En cambio, los recuentos más altos de microorganismos se asociaron con rúcula y espinaca, valores éstos similares a los encontrados por nosotros donde las espinacas aparecen de nuevo como verduras con alto grado de contaminación:

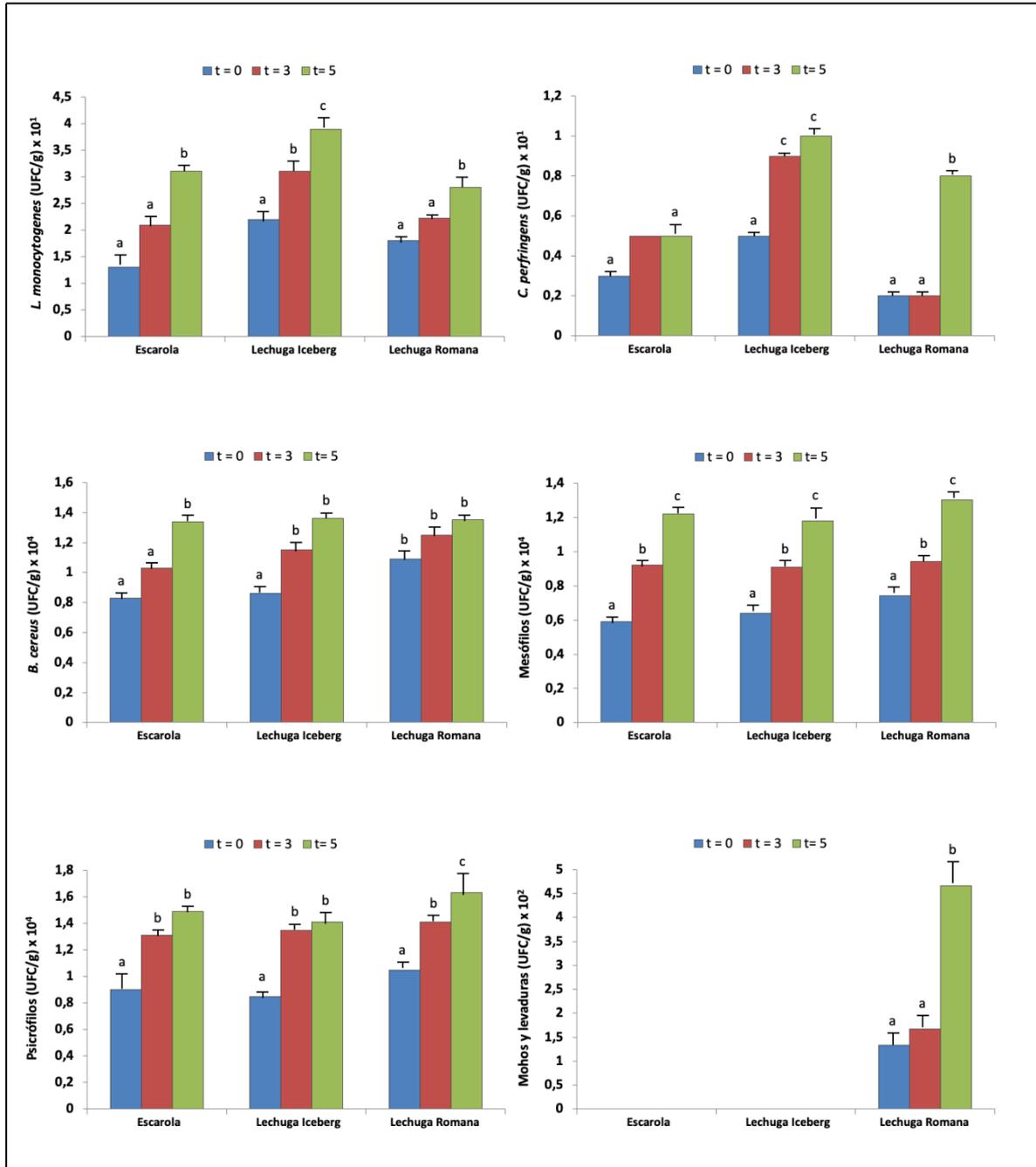


Figura 8. Recuentos microbianos medios medidos como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) en verduras de I Gama sin peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas entre las verduras analizadas (p < 0,05)*

4.1.3. Influencia del peciolo sobre el crecimiento microbiano en verduras de I Gama

Con objeto de observar la influencia que pudiera tener la presencia de peciolo sobre la calidad microbiológica de las verduras de I Gama, se procedió a comparar los recuentos microbianos entre ambos tipos de verduras (hoja peciolada vs. hoja sésil); para ello, se realizó la media de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) obtenidas en los distintos grupos de verduras estudiados para cada tipo de microorganismos (Tabla 3). Estos valores representan la media aritmética, junto con la desviación estándar, de los valores obtenidos para cada uno de los microorganismos al primer (t = 0), tercer (t = 3) y quinto día (t = 5) de almacenamiento en refrigeración a ± 4 °C en verduras de I Gama con y sin peciolo:

Tabla 3. Recuentos medios expresados en UFC/g y error estándar para los microorganismos objeto de estudio en verduras frescas de I Gama, atendiendo a la presencia o no de peciolo. *Las medias con letras diferentes dentro de una fila son significativamente diferentes (p < 0,05)*

MICROORGANISMOS (UFC/g)	VERDURAS DE I GAMA	
	Verduras con peciolo (Media \pm EEM) (n = 3)	Verduras sin peciolo (Media \pm EEM) (n = 3)
<i>L. monocytogenes</i>	$3,33 \times 10^2 \pm 0,18 \times 10^2$ ^a	$2,50 \times 10^1 \pm 0,08 \times 10^1$ ^b
<i>C. perfringens</i>	$1,47 \times 10^1 \pm 0,21 \times 10^1$	$0,54 \times 10^1 \pm 0,10 \times 10^1$
<i>B. cereus</i>	$1,88 \times 10^4 \pm 0,09 \times 10^4$ ^c	$1,14 \times 10^4 \pm 0,08 \times 10^4$ ^d
Microorganismos mesófilos	$1,47 \times 10^4 \pm 0,11 \times 10^4$	$0,94 \times 10^4 \pm 0,86 \times 10^4$
Microorganismos psicrófilos	$2,11 \times 10^4 \pm 0,18 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4 \pm 0,19 \times 10^4$
Mohos y levaduras	$11,37 \times 10^2 \pm 0,46 \times 10^2$ ^e	$0,68 \times 10^2 \pm 0,09 \times 10^2$ ^f

En general, las verduras con peciolo presentan recuentos microbianos más altos que las verduras sin peciolo, especialmente en *L. monocytogenes*, *B. cereus*, y mohos y levaduras, y con diferencias estadísticamente significativas para estos tres microorganismos (p < 0,05) entre las verduras pecioladas (espinacas, grelos y acelgas) y las verduras sin peciolo (escarola, lechuga Iceberg y lechuga Romana).

Todas estas verduras de hoja verde analizadas (espinacas, grelos y acelgas) se caracterizan por llevar peciolo. La microscopía electrónica de barrido ha permitido identificar sitios comunes de colonización, como los tricomas y estomas, a lo largo de las nervaduras, dentro de depresiones de la cutícula y alrededor de poros que secretan agua. Estas localizaciones especiales, además de proveer nutrientes y agua, también ofrecen la protección necesaria para permitir el establecimiento de los colonizadores (Guerrero, 2014). Así, podemos explicar la mayor carga microbiana en estas verduras de hoja verde analizadas en las que se incluyeron los peciolos de las mismas, puesto que éstos son, físicamente, nervaduras en las que el agua abunda. Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2019), que detectaron para *E. coli* O157:H7 en espinacas un aumento de los recuentos de este patógeno cuando se incluyeron en el análisis los peciolos. Esto es lo que ha sucedido en nuestro estudio ya que, al hacer los recuentos de los diferentes microorganismos, hemos incluido el peciolo junto con la hoja verde debido a que estas estructuras suelen consumirse conjuntamente:

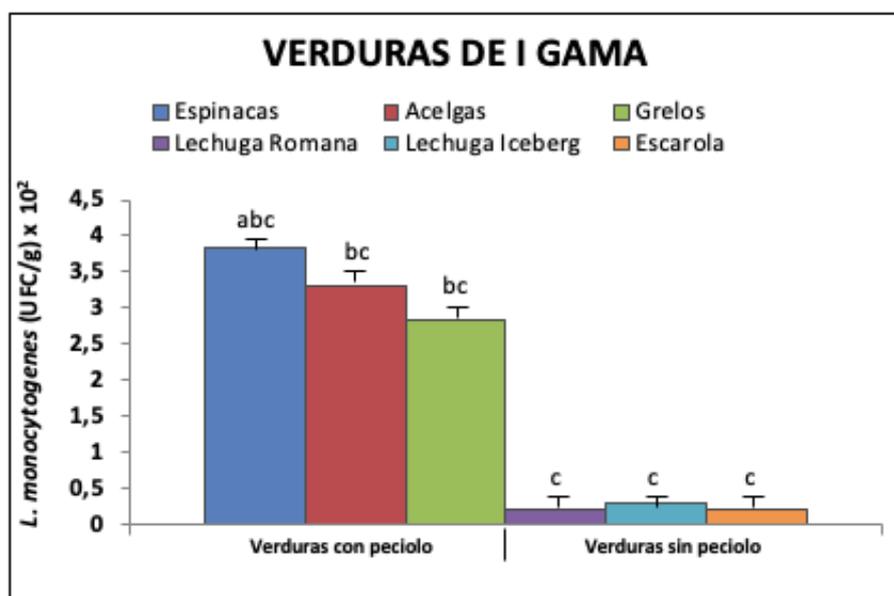


Figura 9. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *L. monocytogenes* en verduras de I Gama (pecioladas o sin peciolo); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p <0,001)*

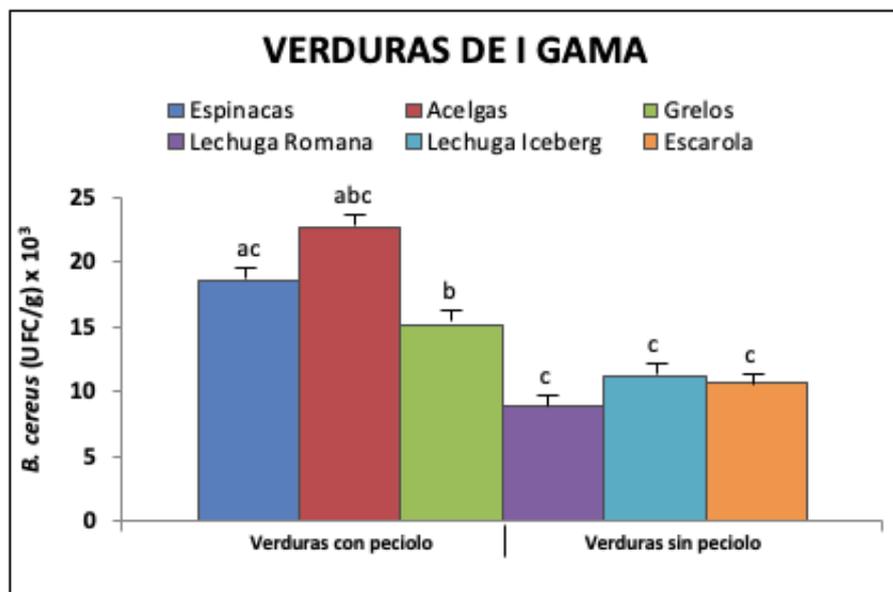


Figura 10. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *B. cereus* en verduras de I Gama (pecioladas o sin peciolo); diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras ($p < 0,05$)

Como podemos observar, en nuestro estudio los recuentos en *L. monocytogenes* y *B. cereus* son muy elevados en las verduras pecioladas y con diferencias estadísticamente significativas respecto a las verduras sin peciolo.

Es un hecho de sobra demostrado la capacidad que tienen determinados microorganismos como *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Escherichia* de adherirse y formar biopelículas sobre la superficie de objetos de metal, vidrio, plástico o caucho (Sinde *et al.*, 2000; Ryu *et al.*, 2005; Elhariry, 2008). Sin embargo, existen investigaciones limitadas que han demostrado la capacidad de adherirse y formar biopelículas en la superficie de las verduras frescas de microorganismos como *B. cereus* y *L. monocytogenes*. Algunos autores (Ells *et al.*, 2006) estudiaron la influencia de la cepa y la temperatura de crecimiento de *Listeria* spp. sobre las hojas de col intacta y recién cortada, concluyendo que la eficiencia de adherirse formando biofilms dependía de cepas específicas y que dicha fuerza de adhesión aumentaba con el tiempo de contacto, mostrando una temperatura respuesta-dependiente en las primeras etapas de exposición. Ambas bacterias son responsables de las causas más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria en el mundo, siendo los vegetales los alimentos más frecuentemente implicados en la transmisión de ambos patógenos alimentarios.

Por otra parte, otros investigadores (Patel *et al.*, 2010) estudiaron la capacidad que tiene *S. enterica* para adherirse sobre las hojas de diferentes tipos de ensaladas, concluyendo que, en general, la fuerza de adherencia de *Salmonella* fue significativamente menor en repollo, mayor en lechuga Iceberg y lechuga Romana y que el apego de *Salmonella* sobre la superficie de las hojas de vegetales es mayor en vegetales cortados que en vegetales intactos. Por ello, para garantizar el nivel de seguridad de las verduras de hoja verde, la formación de biopelículas después de la cosecha debe considerarse como un punto crítico de control durante la manipulación de estas hortalizas (Elhariry, 2011).

Asimismo, algunos autores (Solomon *et al.*, 2009) afirmaron que las bacterias con mayor capacidad hidrofóbica (como *Salmonella*, *Bacillus* y *Listeria*) pueden adherirse a la cutícula, una capa hidrófoba existente en las superficies vegetales compuestas por ácidos grasos, polisacáridos y ceras. La superficie del vegetal intacto que está cubierta por esta cera hidrófoba o cutícula puede permitir que esporas hidrófobas de *B. cereus* y sus células vegetativas puedan adherirse a la cutícula cerosa y formar biofilms.

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. La naturaleza de la matriz exopolisacáridica es diversa (dependiendo de la comunidad bacteriana) y está formada principalmente por alginato, celulosa, glucosa y galactosa. El componente mayoritario de un biofilm es agua (aproximadamente un 95 %), le sigue el exopolisacárido y, en menor cantidad, se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda *et al.*, 2005).

Se ha demostrado la formación de biopelículas en superficies de espinaca, lechuga, col china, apio, puerro, albahaca, perejil y hojas de escarola (Morris *et al.*, 2003), estimándose que entre el 10 y el 40 % de las bacterias en la superficie de las hojas intactas de perejil y escarola estaban asociadas en biopelículas. Algunos autores (Ölmez *et al.*, 2010) han observado el inicio de la formación de biopelículas por *E. coli* y *L. monocytogenes* en superficies intactas de lechugas después de 24 horas de incubación a 10 °C.

En nuestro caso, y al tener las verduras pecioladas recuentos significativamente mayores en *L. monocytogenes* y *B. cereus* que las verduras sésiles, proponemos que la capacidad de formar biofilms de estas bacterias viene también condicionada por la presencia de peciolo en los vegetales, de la misma manera que las características de la superficie de los vegetales también pueden afectar a la adhesión bacteriana. Por ejemplo, cuando los vegetales poseen hoyos y cavidades en superficies vivas como espárragos, las esporas de *B. cereus* tienen más probabilidades de poder penetrar e incrustarse en estas áreas (Park *et al.*, 1999).

Las cepas del grupo *B. cereus* muestran una impresionante diversidad ecológica, que va desde su ciclo de vida saprofito en el suelo hasta simbiótico en las vísceras e intestinos de diversos insectos y mamíferos hospedadores. Esto hace que *B. cereus*, transmitido por los alimentos, esté muy extendido en el ambiente, por lo que diversos ingredientes de alimentos crudos como verduras, patatas, leche, hierbas y especias se encuentran a menudo contaminados con esporas de *B. cereus*. En un estudio llevado a cabo por algunos investigadores (Guinebretiere *et al.*, 2003) se encontró que el suelo de cultivo de calabacines contenía entre $4-9 \times 10^5$ UFC por gramo de suelo, lo que constituyó una fuente importante de contaminación por *B. cereus* en el producto alimenticio terminado, puré de calabacín. Estos valores son similares a los encontrados por nosotros en las verduras pecioladas (espinacas, grelos y acelgas) con una media de $5,23 \times 10^5$ UFC/g y significativamente menores ($p < 0,05$) a la media encontrada en las verduras sin peciolo estudiadas ($7,28 \times 10^4$ UFC/g).

Como hemos visto, tanto *L. monocytogenes* como *B. cereus* pueden encontrarse en el suelo, prosperar en materia orgánica en descomposición tales como materiales vegetales en terrenos de cultivo (Ceuppens *et al.*, 2013) e interactuar con las raíces de las plantas en la rizosfera (Ceuppens *et al.*, 2013). Desde el suelo, ambas bacterias pueden ingresar a través de las raíces al sistema vascular de las plantas y ascender por la savia a través del tallo y de los peciolos.

En la última década, las verduras han desempeñado un papel importante en la epidemiología de la listeriosis, actuando como vehículos de *L. monocytogenes*, especialmente verduras pecioladas como las espinacas (Luber *et al.*, 2011; Mir *et al.*, 2018). Esto es muy preocupante porque muchas de estas verduras se consumen crudas y dependen solo del almacenamiento en frío para garantizar su seguridad; además, *Listeria* tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de refrigeración.

La contaminación de las verduras por *Listeria* puede producirse a partir de fuentes humanas, animales y ambientales. Como recogen ciertos autores (Faour-Klingbeil *et al.*, 2016), a nivel del campo el uso de agua no potable contaminada con materia fecal, el empleo de estiércol contaminado y el acceso de ganado o animales salvajes a los terrenos de cultivo, conduce a la aparición de microbios patógenos, entre ellos *Listeria* que es muy abundante en verduras foliáceas verdes como lechugas, espinacas y col rizada.

Por su parte, otros investigadores (Oliveira *et al.*, 2011) estudiaron la presencia de *Listeria* spp. y *E. coli* O157:H7 contenidas en 162 muestras de verduras de hoja verde comúnmente utilizadas en Brasil procedentes de cultivos tratados con compost contaminado y agua de riego, encontrando poblaciones de bacterias psicrófilas mayores a 10^5 UFC/g en el 96,7 % de las muestras, de las cuales en más de un 85 % aislaron *L. monocytogenes* en valores superiores a los límites considerados como seguros (1000 UFC/g). En nuestro estudio, hemos encontrado valores inferiores con una media de $3,33 \times 10^2$ UFC/g en las muestras pecioladas (siendo las espinacas las que presentan los recuentos más elevados, Figura 9) y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) respecto a las verduras sin peciolo.

Nuestros datos están en la línea de los datos reportados por otros autores (Chitarra *et al.*, 2014) que, al estudiar la captación potencial de *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes* del sustrato de crecimiento en hojas de lechugas procedentes de suelo regado con agua contaminada, y al tomar muestras alrededor de la rizosfera de diferentes tipos de verduras verdes seleccionadas al azar a una profundidad de 2 centímetros, constataron que, a pesar de desinfectar las hojas de las ensaladas (rúcula, canónigos y espinacas, verduras todas ellas con peciolo) las células de *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes* alcanzaron los tejidos de las hojas y se internalizaron, probablemente a través de las raíces o poros naturales de sustrato contaminado dentro de todos los vegetales analizados, ascendiendo por el peciolo hasta llegar a las hojas.

El peciolo es más que un simple canal para transmitir alimento y agua, ya que también es un factor importante para asegurar la supervivencia de las hojas (Niklas, 1999; Ennos *et al.*, 2000). Se trata de una estructura delgada, de forma cilíndrica, algunas veces acanalada y otras plana, encargada del alargamiento y aumento del grosor de la planta. Cumple la función de transporte de fluidos (agua y sustancias minerales absorbidas por la raíz), desde el tallo hasta el limbo foliar.

La mayoría de los pecíolos son blandos, tienen una gran relación de aspecto y pueden deformarse fácilmente cuando actúan con el viento y la lluvia, manteniendo la hoja estable en estado dinámico/estático y mejorando la fotosíntesis. Pero, como tal canal, nuestra hipótesis plantea la posibilidad de que microorganismos capaces de formar biofilms (como *B. cereus*, *L. monocytogenes* o *Salmonella*, entre otros) puedan quedar adheridos sobre la superficie interna de este canal convirtiendo al peciolo en una fuente de contaminación microbiana. Esto podría explicar la razón de los mayores recuentos microbianos obtenidos en las verduras pecioladas analizadas por nosotros frente a las verduras sésiles (sin peciolo), como la lechuga Iceberg, la lechuga Romana y la escarola (Figuras 9 y 10).

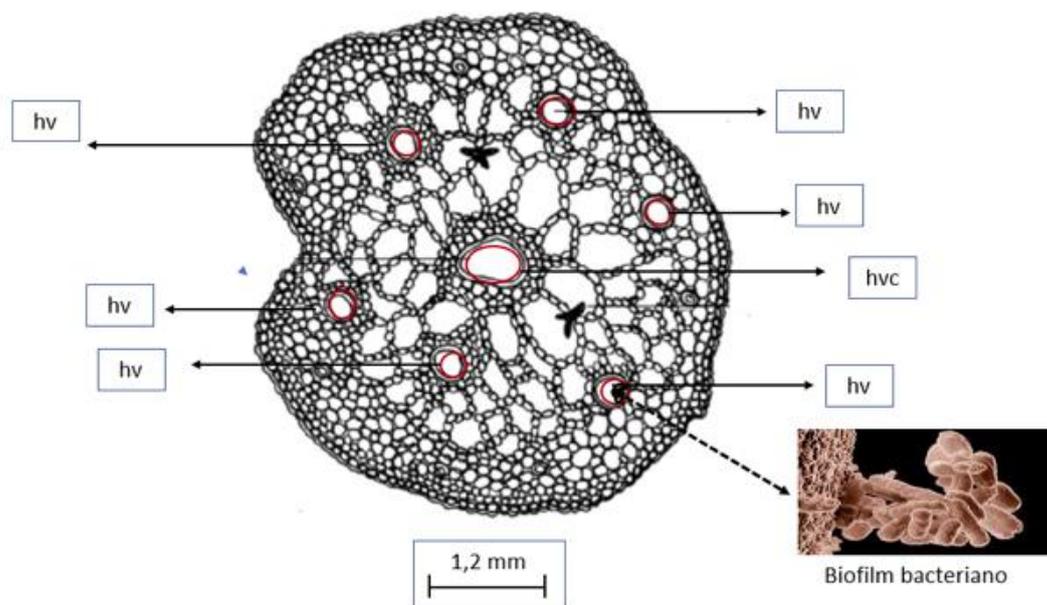


Figura 11. Hipótesis por la que propugnamos la presencia de corte transversal de un peciolo formado por un conjunto de haces vasculares más o menos cilíndricos a modo de una red de canales internos con una película de biofilm en su interior. *hv* = *haz vascular*; *hvc* = *haz vascular central*

Con relación a *C. perfringens*, microorganismo capaz de formar esporas, las verduras con peciolo presentan asimismo un recuento microbiano mayor aunque no tan elevado como sucede con *L. monocytogenes* y *B. cereus*, debido a que *Clostridium* no es capaz de formar biofilms (Figura 12). No obstante, siguen existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las verduras pecioladas y las verduras sésiles, especialmente en el caso de las espinacas y de las acelgas.

El suelo es la principal fuente de contaminación por *C. perfringens* y su presencia en los terrenos de cultivo está ligada a una contaminación fecal de las aguas de regadío, de ahí que las verduras crudas estén más expuestas a la contaminación por este microorganismo directamente del suelo que otros alimentos como la carne, leche o pescados. Por lo tanto, los suelos pueden servir como medio de contaminación de las plantas a través de semillas, raíces o superficies. Muchos patógenos residentes en el suelo se han adaptado para sobrevivir en el suelo y las esporas persisten indefinidamente, como es el caso de *C. perfringens* (Jay-Russell, 2013):

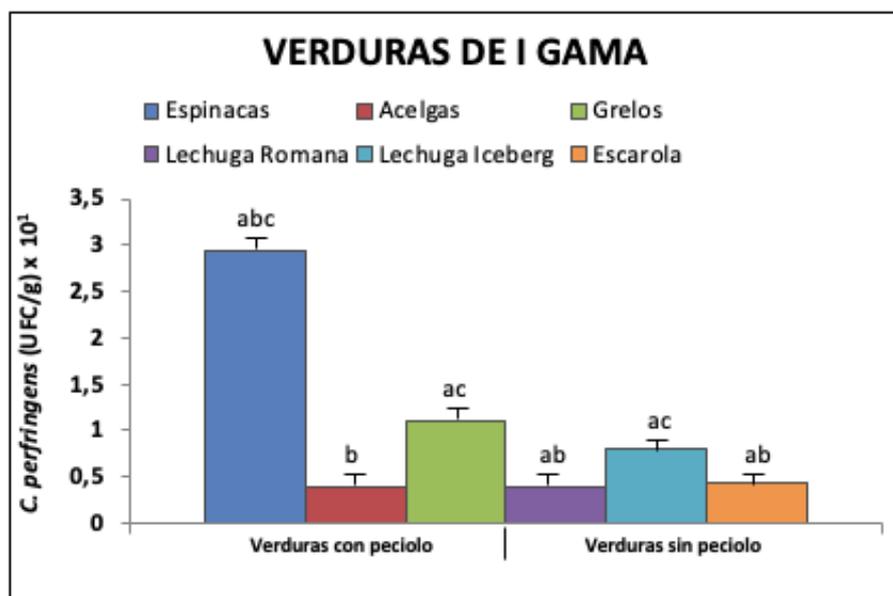


Figura 12. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *C. perfringens* en verduras de I Gama (pecioladas o sin peciolo); diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras ($p < 0,05$)

Sin embargo, la cuestión de la producción de esporas en el suelo con una transferencia a los alimentos a través de diversas rutas, o de la producción de esporas en diversas etapas del procesamiento, sigue sin resolverse (Carlin, 2011) y este microorganismo es el tercer indicador de contaminación fecal en las aguas, tras *E. coli* y *Salmonella* spp. Los recuentos encontrados, tanto en las verduras con peciolo como en las verduras sin peciolo, no llegan a superar los límites máximos considerados seguros. En la bibliografía científica, las verduras de hoja verde como la lechuga y la espinaca, así como las hierbas frescas como el perejil y la albahaca, son fuentes convencionales de infecciones bacterianas por *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O96:H19 y *Salmonella* spp (Erickson, 2012).

En nuestro trabajo, son las espinacas las que presentan mayores recuentos en *C. perfringens*, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), no sólo con las verduras sésiles (como son las tres variedades de lechuga estudiadas) sino también con otras verduras pecioladas como las acelgas y los grelos.

El recuento de microorganismos mesófilos sirve para realizar una estimación del número total de bacterias que hay en un alimento, sin identificar los diferentes tipos de gérmenes. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores o iguales a 1×10^6 - 10×10^6 UFC/g de producto alimentario suelen ser ya inicio de descomposición (Gu *et al.*, 2020). En nuestro caso, ningunas de las verduras analizadas llegan a alcanzar estos valores aunque, en general, las verduras pecioladas presentan recuentos superiores en microorganismos mesófilos y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a las verduras sin peciolo, siendo espinacas y acelgas las verduras con mayor crecimiento en este tipo de microorganismos y no existiendo entre ambas verduras diferencias estadísticamente significativas:

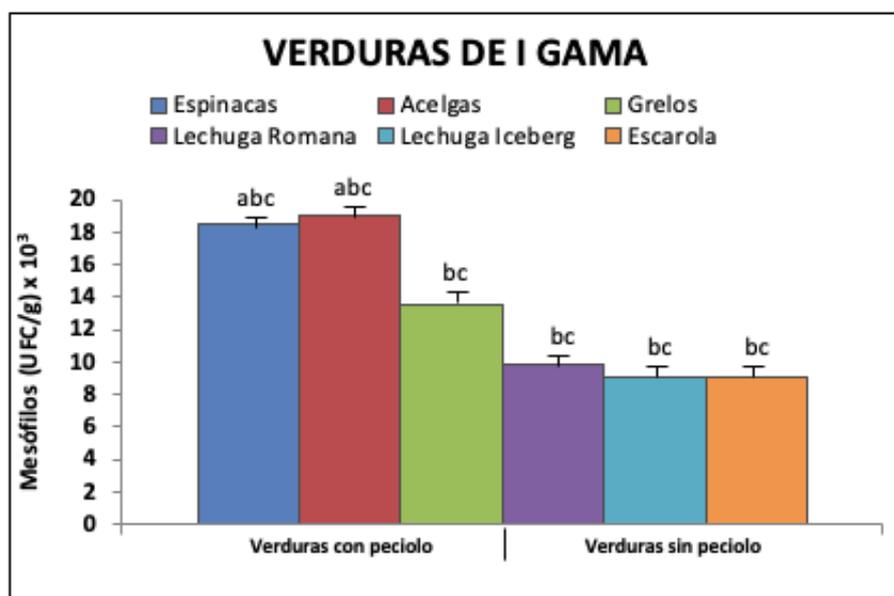


Figura 13. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos mesófilos en verduras de I Gama (pecioladas o sin peciolo); diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras ($p < 0,05$)

En la literatura científica existen diversos estudios que relacionan el crecimiento en microorganismos mesófilos con abusos de temperatura a las que se someten las espinacas, lechugas y otras verduras de hoja verde tras la etapa postcosecha y comercialización, concluyendo que, por cada grado centígrado por encima de 5 °C de almacenamiento, los recuentos en microorganismos mesófilos aumentan en un 10 % (Zhou *et al.*, 2022). Otros autores (Moreira *et al.*, 2006) han informado que la vida útil de lechugas disminuyó de 9 días a 2 °C a 3 días a 10 °C, observando que el abuso de temperatura a 8 y 15 °C aceleraba la tasa de degradación del ácido ascórbico en las hojas de lechuga de 2,7 a 2,9 veces en comparación con la tasa a 0 °C, mientras aceleraba la degradación microbiana. Si bien el recuento microbiano total en microorganismos mesófilos aumentó a $5,0 \times 10^7$ UFC/g en 8 días a 0 °C, solo se necesitaron 5 días a 8 °C y 2 días a 15 °C para alcanzar el mismo nivel en las hojas de lechuga. Por tanto, y de acuerdo con nuestros resultados, proponemos que mantener la integridad de la cadena de frío durante la manipulación postcosecha es de suma importancia para garantizar la calidad y la vida útil de los productos frescos, especialmente en el caso de las verduras pecioladas, situación ésta que no siempre se produce en los lugares de venta, especialmente en los comercios de proximidad o de barrio.

Igual sucede con los recuentos en microorganismos psicrófilos. En nuestro estudio, los niveles en microorganismos psicrófilos que presentan las verduras pecioladas siguen una tónica muy parecida a la que presentan los microorganismos mesófilos, siendo de nuevo las verduras pecioladas las que tienen mayores recuentos en estos microorganismos y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a las verduras sin peciolo. La observación visual no es capaz de detectar estas diferencias en el crecimiento microbiano dependiendo o no de la presencia de peciolo. Y hay que tener en cuenta que estas verduras analizadas por nosotros hoy se han puesto de moda para la elaboración de batidos verdes. No existen estudios donde diferencien la carga microbiana de una verdura atendiendo o no a la presencia de peciolo. Como vemos, para todos los microorganismos analizados, las espinacas, grelos y acelgas presentan mayores niveles de contaminación. Por ello, si se van a utilizar crudas como ingredientes de estos batidos o de ensaladas, hay que extremar las medidas de desinfección y evitar las contaminaciones cruzadas que puedan darse en los lugares de comercialización y venta:

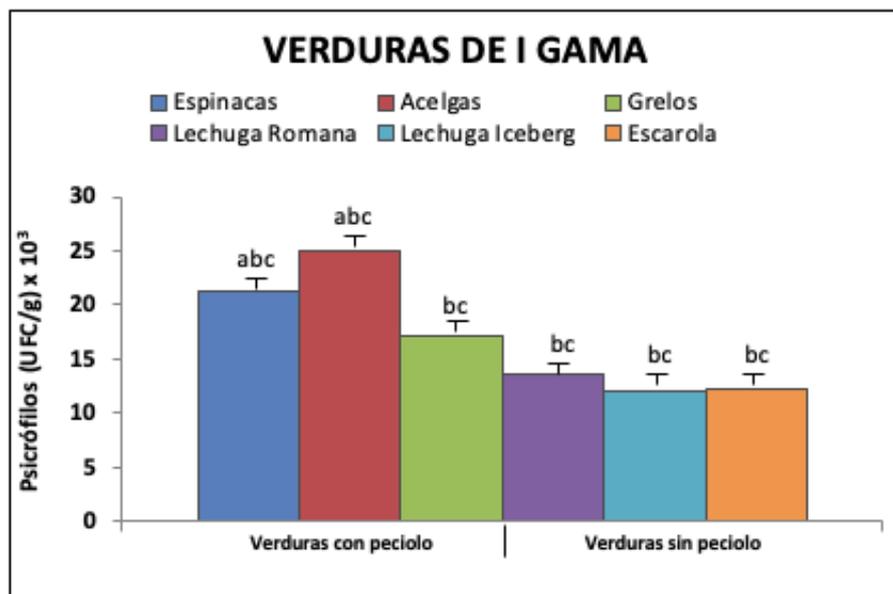


Figura 14. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos psicrófilos en verduras de I Gama (pecioladas o sin peciolo); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p < 0,05)*

Un estudio llevado a cabo por algunos autores (Faour-Klingbeil *et al.*, 2016) demostró que los puntajes generales de la evaluación visual no reflejarían directamente la seguridad de diferentes verduras para ensalada (lechuga, perejil, rúcula, cilantro, pepino, tomate y rábano) y que la importancia de la evaluación microbiológica debe considerarse en relación con los componentes individuales de la inspección. Es necesario establecer medidas de control efectivas sobre las normas de limpieza y el riesgo de contaminación cruzada para mejorar la seguridad microbiológica de las verduras y hortalizas frescas en las PYMES (bares, restaurantes, etc.) al encontrar valores en microorganismos mesófilos y psicrófilos, respectivamente, de $5,50 \pm 1,55$ y $2,90 \pm 2,57 \log_{10}$ UFC/g, valores que se encuentran dentro de los rangos encontrados por nosotros y que se achacan a las deficiencias higiénicas encontradas en las etapas de almacenamiento y distribución postcosecha. En esta misma línea, otros autores (Sagoo *et al.*, 2001; Faour-Klingbeil *et al.*, 2016) concluyen que recuentos en microorganismos mesófilos y psicrófilos superiores a 10^3 UFC/g estarían relacionadas con inadecuadas prácticas higiénicas en las etapas postcosecha.

La contaminación por patógenos de los productos frescos puede originarse antes o después de la cosecha, pero una vez que los productos agrícolas están contaminados son difíciles de desinfectar. Es necesario comprender mejor la posibilidad de que algunos patógenos invadan el sistema vascular de las plantas a través de los peciolo y establezcan una infección “*subclínica*” para poder estimar su influencia sobre el riesgo de enfermedad humana.

Además de las limitaciones de agua y nutrientes, hay que considerar que los vegetales crecen en un sistema abierto, por lo que los microorganismos de la superficie están expuestos a agentes ambientales externos, como desecación, radiación ultravioleta, estrés oxidativo y fluctuaciones de temperatura. En conjunto, estas condiciones retan constantemente la supervivencia y adaptabilidad de los microorganismos para colonizar la superficie de los vegetales, como las hojas, tendiéndose a desplazarse a otras zonas que les proporcionen mayor protección, como las mencionadas anteriormente (Guerrero, 2014). En otro estudio, para la detección de *E. coli* O157:H7 en espinacas, también se detectó un aumento de los recuentos de este patógeno cuando se incluyeron en el análisis los peciolo (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2019):

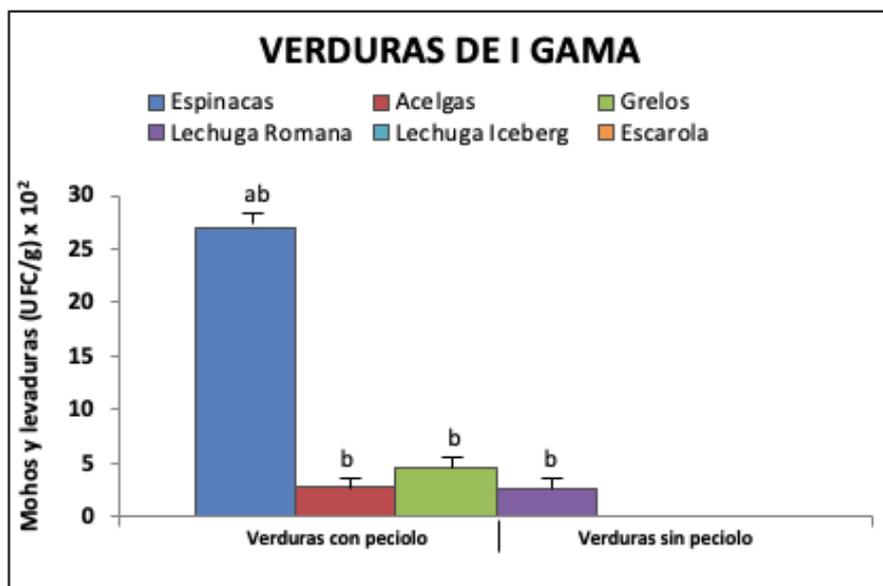


Figura 15. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para mohos y levaduras en verduras de I Gama (peciolo o sin peciolo); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p < 0,05)*

Los métodos convencionales de saneamiento de superficies pueden reducir la carga microbiana, pero no pueden eliminar los patógenos si están presentes (Olaimat *et al.*, 2012). Es necesario, por tanto, abordar investigaciones necesarias para aumentar nuestra comprensión de todos los factores que influyen en la seguridad microbiana de los productos frescos. Y en este sentido, a raíz de este trabajo, concluimos que dentro de los factores que favorecen el crecimiento de microorganismos, especialmente de aquellos como *L. monocytogenes* y *B. cereus*, por su capacidad de formar biofilms sobre superficies vivas, los peciolo de las verduras como espinacas, grelos y acelgas, deberían de ser tenidos en consideración como una parte del vegetal más susceptible a producir una enfermedad de transmisión alimentaria.

En la Tabla 4 se incluyen los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) de valores de crecimiento microbiano para las verduras frescas estudiadas y la presencia o no de peciolo. Con relación a la correlación lineal bivariada entre la presencia o no de peciolo en las verduras frescas de I Gama y el crecimiento microbiano de los grupos de patógenos alimentarios correspondientes a *C. perfringens*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, se empleó el método de Spearman (no paramétrico), debido a que no se observó homogeneidad de las varianzas por el test de Levene ($p < 0,05$) ni distribución normal de los resultados por el test de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) de los valores de crecimiento microbiano analizados en ninguno de los grupos de microorganismos estudiados; por el contrario, para el caso de *L. monocytogenes* y *B. cereus* sí que se observó una distribución normal de los valores de crecimiento microbiano analizados por la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$), por lo cual se utilizó el coeficiente de correlación obtenido por el método de Pearson.

Se puede apreciar **como la presencia de peciolo** en las verduras estudiadas (acelgas, espinacas y grelos), estuvo correlacionado significativa y positivamente con el crecimiento de *L. monocytogenes* ($p < 0,001$) y también con el de *B. cereus* ($p = 0,024$), *C. perfringens* ($p = 0,032$) y mohos y levaduras ($p < 0,05$). El crecimiento microbiano de mohos y levaduras también estuvo significativa y positivamente correlacionado con la ausencia de peciolo en las verduras frescas. Por el contrario, no hubo correlación entre **la ausencia de peciolo** en las verduras sésiles estudiadas (lechuga Romana, lechuga Iceberg y escarola) y el crecimiento microbiano de ninguno de los seis grupos de microorganismos estudiados, con excepción de mohos y levaduras.

Como podemos observar, existe una correlación positiva entre la presencia de peciolo y un mayor recuento microbiano, especialmente en el caso de microorganismos capaces de formar biofilms como *L. monocytogenes* y *B. cereus*:

Tabla 4. Coeficientes de correlación lineal (*r*) y niveles de significancia (*p*) entre los valores de recuento microbiano (UFC/g) de los microorganismos objeto de estudio y la presencia o no de peciolo en las verduras frescas de I Gama

MICROORGANISMOS	CON PECIOLO		SIN PECIOLO	
	<i>r</i> ^a	<i>p</i>	<i>r</i> ^a	<i>p</i>
<i>L. monocytogenes</i>	0,813	0,001	0,516	0,055
<i>B. cereus</i>	0,778	0,014	0,268	0,330
<i>C. perfringens</i>	0,635	0,032	0,493	0,064
Microorganismos mesófilos	0,310	0,130	-0,321	0,260
Microorganismos psicrófilos	0,283	0,349	0,400	0,317
Mohos y levaduras	0,692	0,043	0,572	0,043

^a: Se considera una correlación débil cuando el valor de *r* es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de *r* está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de *r* es superior a 0,7

El peciolo permite que la hoja se extienda hacia afuera de la planta, lo que puede mejorar su capacidad para recolectar luz. Además, los tejidos vasculares que atraviesan este órgano le permiten conducir agua y nutrientes hacia y desde la hoja (Faisal *et al.*, 2010), convirtiéndose en un reservorio donde microorganismos flagelados pueden anclarse y dar lugar a biofilms naturales que fomenten la adherencia de otros microorganismos que desde la rizosfera asciendan por los tallos hacia las hojas, siguiendo el flujo de la savia.

De la misma manera que el suelo de la rizosfera está habitado por comunidades de arqueas, bacterias y hongos (Fan *et al.*, 2018) cuya composición y actividad están estrictamente reguladas por las plantas a través de depósitos radiculares específicos liberados a la rizosfera, pensamos que el peciolo puede también constituir un hábitat atractivo para los microorganismos, especialmente aquellos capaces de formar películas en la interfase sólido-líquida entre una superficie y un medio acuoso (lo que sucede en el interior de los peciolos) proporcionando un entorno ideal para la fijación y colonización microbiana.

4.2. Presencia y evolución microbiana en vegetales de IV Gama. Importancia del peciolo sobre el crecimiento microbiano

Estas muestras fueron adquiridas en establecimientos comerciales de Granada, como en el caso anterior, pero al ser de IV Gama venían envasadas o bien en tarrinas de LDPE (Polietileno de baja densidad) o LLDPE (Polipropileno lineal de baja densidad) recubiertas por películas 100 % biodegradable en PLA CELULOSA, o bien en bolsas de papel celofán. Las muestras se mantuvieron en todo momento en refrigeración a 4 °C hasta el momento de los análisis, llevándose un riguroso control de temperaturas de la cámara refrigeradora dos veces al día (al inicio y a la finalización de cada jornada de trabajo).

Como en el apartado anterior se dividieron para analizarlas en:

- **Verduras de IV Gama con peciolo:** rúcula, canónigos y brotes de espinacas. Se analizaron un total de 27 muestras, de las cuales un 45 % venían envasadas en bolsas de papel celofán, un 30 % en tarrinas de LDPE y un 25 % en bolsas de LLDPE.

- **Verduras de IV Gama sin peciolo:** escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg. Se analizaron un total de 27 muestras, de las cuales un 55 % venían envasadas en tarrinas de LLDPE y un 45 % en bolsas de papel celofán.

Al tratarse de IV Gama todas las muestras vienen limpias, desinfectadas, listas para ser consumidas y envasadas en atmosferas modificadas. Los tres materiales con los que están fabricados los envases (papel celofán, LDPE y LLDPE) se caracterizan por tener una permeabilidad al agua muy baja (Tabla 5), propiedad común que define el envasado en IV Gama a fin de evitar la deshidratación de las verduras durante su periodo de comercialización, venta y posterior almacenamiento en los lugares de restauración casera /colectiva.

Además, todos ellos presentan una barrera frente al CO₂ y al N₂ mayor que frente al O₂, con objeto de conseguir un envase que equilibre las concentraciones de los diferentes gases de las atmosferas modificadas (MAP) y acompasarlo a la velocidad de respiración de las diferentes verduras; con ello, se persigue proteger a las verduras de IV Gama de una senescencia rápida y aumentar su vida útil con las características organolépticas y nutricionales del producto original:

Tabla 5. Propiedades de barrera frente a diferentes gases de los materiales de envasado empleados en la comercialización de verduras de IV Gama

PROPIEDADES	UNIDAD	VALOR MATERIAL ENVASADO
Permeabilidad H₂O	g/m ² 24 h	LLDPE (0,005) LDPE (0,07) Papel celofán (0,001)
Permeabilidad O₂	cm ³ /m ² /bar	LLDPE (113,12) LDPE (256,12) Papel celofán (315,17)
Permeabilidad CO₂	cm ³ /m ² /bar	LLDPE (0,002) LDPE (0,004) Papel celofán (1,240)
Permeabilidad N₂	cm ³ /m ² /bar	LLDPE (0,02) LDPE (0,03) Papel celofán (1,10)

Fuente: Tratado de higiene y seguridad alimentaria en restauración (Villalón-Mir, 2016)

Los análisis se han realizado el día que se compraron (día 0), a mitad de su almacenamiento en refrigeración (3^{er} día) y al 5^o día de su almacenamiento en refrigeración que coincide con el final de la vida útil declarada en el envase.

Las diversas variaciones en las prácticas agronómicas, procesamiento y marketing han permitido a la industria de productos agrícolas suministrar todo tipo de hortalizas de hoja verde durante todo el año. Sin embargo, las verduras de hoja verde usadas en las ensaladas de verduras listas para el consumo conservan la mayor parte de su microflora autóctona después de un procesamiento mínimo. Ciertos patógenos forman parte de esta microflora por lo que este tipo de “ensaladas listas para consumo” representan un potencial alimentario con problemas de seguridad a nivel mundial. Así, los grandes aumentos de las importaciones potencian el consumo de las mismas no sólo en temporadas de verano, sino también en el resto del año. Esto tiene la ventaja de poder consumirse esta amplia oferta de ensaladas todo el año (con independencia de la temporalidad de una zona o región del mundo) pero también conduce a un mayor riesgo global de enfermedades humanas relacionadas con una amplia gama de patógenos transmitidos por los alimentos.

Se ha demostrado que los patógenos ingresan a los tejidos de las plantas a través de aberturas naturales (estomas, uniones laterales de raíces, flores) y tejidos dañados (heridas, superficies cortadas), y que la internalización previa a la cosecha, a través de las raíces de las plantas o los estomas de las hojas, provoca que los agentes desinfectantes químicos utilizados durante el procesamiento mínimo lleguen al 100 % a los patógenos que residen dentro del tejido vegetal. Por otro lado, se conoce que la internalización postcosecha de patógenos a través de las superficies cortadas se puede minimizar (que no eliminar) manteniendo niveles efectivos de agentes desinfectantes en las aguas durante el procesamiento de lavado que tiene lugar en la elaboración de las verduras de IV Gama (Okafo *et al.*, 2003).

Por ello, y según el criterio establecido por algunos autores (Arienzo *et al.*, 2020), los microorganismos analizados han sido:

- *C. perfringens*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*: que se eligieron como **indicadores de la seguridad higiénica** o indicadores de la calidad higiénico-sanitaria de las ensaladas de IV Gama al tratarse de microorganismos ubicuitarios que se encuentran en el polvo, suelo, tierra). Su presencia en la IV Gama está indicando deficientes condiciones higiénicas seguidas durante el procesamiento de las verduras que formarán parte de estas “*ensaladas listas para consumo*”.

- Microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras: se eligieron como **indicadores de la calidad comercial** de la IV Gama, ya que la presencia de estos microorganismos reflejan la exposición de los alimentos a cualquier contaminación y, en general, la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de los mismos, siendo muy útiles estos parámetros para indicar si se ha realizado un adecuado control de temperatura durante el procesamiento industrial, el transporte y el almacenamiento de las verduras de IV Gama.

4.2.1. Calidad higiénica de verduras de IV Gama con peciolo

En la Tabla 6 se recogen los recuentos microbianos encontrados en verduras y vegetales de IV Gama con peciolo:

Tabla 6. Recuentos microbianos medios medidos en UFC/g (media ± EEM) de los microorganismos indicadores de seguridad higiénica y de calidad comercial objeto de estudio en verduras de IV Gama con peciolo

VERDURAS DE IV GAMA CON PECIOLO							
IV Gama	Día	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>C. perfringens</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>B. cereus</i> (UFC/g) Media ± EEM	Mesófilos (UFC/g) Media ± EEM	Psicrófilos (UFC/g) Media ± EEM	Mohos y levaduras (UFC/g) Media ± EEM
Rúcula	0	2,10 x 10 ¹ ± 0,05 x 10 ¹	2,20 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	0,41 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	0,38 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,66 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	n.d.
	3	2,90 x 10 ¹ ± 0,15 x 10 ¹	2,40 x 10 ¹ ± 0,30 x 10 ¹	0,67 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,76 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,87 x 10 ⁴ ± 0,09 x 10 ⁴	n.d.
	5	3,15 x 10 ¹ ± 0,07 x 10 ¹	3,40 x 10 ¹ ± 0,03 x 10 ¹	1,10 x 10 ⁴ ± 0,09 x 10 ⁴	0,98 x 10 ⁴ ± 0,07 x 10 ⁴	1,29 x 10 ⁴ ± 0,10 x 10 ⁴	n.d.
Canónigos	0	1,90 x 10 ¹ ± 0,02 x 10 ¹	0,40 x 10 ¹ ± 0,01 x 10 ¹	0,54 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	0,30 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	0,71 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	1,23 x 10 ² ± 0,08 x 10 ²
	3	2,25 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	0,80 x 10 ¹ ± 0,30 x 10 ¹	0,79 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	0,69 x 10 ⁴ ± 0,02 x 10 ⁴	0,86 x 10 ⁴ ± 0,08 x 10 ⁴	1,94 x 10 ² ± 0,50 x 10 ²
	5	2,80 x 10 ¹ ± 0,06 x 10 ¹	1,40 x 10 ¹ ± 0,30 x 10 ¹	0,10 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴	0,92 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	1,05 x 10 ⁴ ± 0,08 x 10 ⁴	2,33 x 10 ² ± 0,58 x 10 ²
Brotes Espinacas	0	2,20 x 10 ¹ ± 0,12 x 10 ¹	0,20 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,83 x 10 ⁴ ± 0,11 x 10 ⁴	0,51 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	0,89 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	n.d.
	3	2,60 x 10 ¹ ± 0,11 x 10 ¹	2,30 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	1,20 x 10 ⁴ ± 0,18 x 10 ⁴	0,90 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	1,26 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	n.d.
	5	2,90 x 10 ¹ ± 0,05 x 10 ¹	2,80 x 10 ¹ ± 0,30 x 10 ¹	1,60 x 10 ⁴ ± 0,08 x 10 ⁴	1,33 x 10 ⁴ ± 0,08 x 10 ⁴	1,63 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	1,67 x 10 ² ± 0,08 x 10 ²

En general, en las verduras de IV Gama con peciolo estudiadas por nosotros, aunque los recuentos microbianos encontrados no exceden los límites máximos para ninguno de los microorganismos analizados permitidos según la Reglamentación Europea (Tabla 7), presentan, sin embargo, valores elevados para tratarse de ensaladas que previamente han sido sometidas a un proceso de lavado y desinfección por parte de la industria alimentaria, especialmente en el caso de microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos; para estos dos microorganismos, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las diferentes ensaladas analizadas.

El recuento en placa de microorganismos aeróbicos mesófilos que se encuentran en los alimentos es uno de los indicadores microbiológicos de la calidad de los alimentos. Los organismos aeróbicos mesófilos reflejan la exposición de la muestra a cualquier contaminación y, en general, la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos. Por varias razones, este parámetro es útil para indicar si la limpieza, desinfección y control de temperatura durante el procesamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado de manera adecuada (Viswanathan *et al.*, 2001):

Tabla 7. Niveles de contaminación (UFC/g) para ensaladas de hoja verde listas para el consumo (IV Gama) según el *Reglamento Europeo (CE) n.º 1441/2007*

MICROORGANISMOS INDICADORES DE SEGURIDAD HIGIÉNICA	NIVELES DE CONTAMINACIÓN (UFC/g)		
	Satisfactorio	Aceptable	No aceptable
<i>L. monocytogenes</i>	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$\geq 10^3$
<i>B. cereus</i>	No legislado	No legislado	No legislado
<i>C. perfringens</i>	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$\geq 10^3$
MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD COMERCIAL	Satisfactorio	Aceptable	No aceptable
Microorganismos mesófilos	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$\geq 10^6$
Microorganismos psicrófilos	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$\geq 10^6$
Mohos y levaduras	No legislado	No legislado	No legislado

Así, algunos autores (Sant’Ana *et al.*, 2012) encuentran que, en la mayoría de las verduras de IV Gama analizadas en diferentes mercados de Brasil, los recuentos de microorganismos aeróbicos totales aumentaron significativamente al aumentar la temperatura de almacenamiento ($p < 0,05$), siendo necesaria la definición de estrategias de intervención efectivas a nivel de las condiciones de almacenamiento (especialmente control del tiempo/temperatura) para controlar su crecimiento en estos productos. Estos autores encontraron que el mayor crecimiento en microorganismos aerobios se producía en las verduras listas para consumo almacenadas a 15 °C/6 días, especialmente en rúcula, col rizada y ensalada verde. En los tres casos, los recuentos en microorganismos aerobios superaron los límites considerados como “no aceptables” ($\geq 10^6$ UFC/g).

En nuestro caso, el recuento en microorganismos mesófilos coloca a estas verduras en un nivel de calidad aceptable (con recuentos medios comprendidos entre 0,92 y $1,33 \times 10^4$ UFC/g) aunque estos recuentos son elevados para haber sido sometidas a desinfección y no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las tres verduras analizadas (rúcula, canónigos y espinacas).

Según el *Reglamento Europeo (CE) n.º 1441/2007*, la ausencia de *Salmonella* spp. y la ausencia de *L. monocytogenes*/25 g se consideran criterios esenciales para definir la seguridad de las verduras de IV Gama comercializadas durante su vida útil. En nuestro estudio, los recuentos de *L. monocytogenes* no llegan a superar estos límites considerados como “*aceptables*” ya que van desde los 28 UFC/g (al 5º día de almacenamiento en refrigeración) para los canónigos hasta los 31 UFC/g para la rúcula. No obstante, para verduras ya desinfectadas, consideramos que el hecho de estar presente este patógeno en la IV Gama (aunque a niveles considerados como “*satisfactorios*”) puede por sí mismo representar un riesgo de listeriosis para consumidores especialmente vulnerables como embarazadas, ancianos o personas inmunodeprimidas (por ejemplo trasplantados y enfermos de cáncer), especialmente si estas ensaladas se consumieran pasada la fecha de caducidad impresa en el envase. Como se puede observar en la Figura 17, no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en los recuentos de *L. monocytogenes* entre la rúcula, los canónigos y los brotes de espinacas, al quinto día de almacenamiento en refrigeración. En este sentido, se postulan varios autores (Safdar *et al.*, 2002; Rivero *et al.*, 2003; Fernández-Sabe *et al.*, 2009; Lund *et al.*, 2011) que preconizan que, aunque los pacientes trasplantados y enfermos de cáncer son susceptibles a *L. monocytogenes*, la incidencia reportada de listeriosis transmitida por el consumo de alimentos crudos (como las verduras de IV Gama) es baja; sin embargo, la presencia de *L. monocytogenes* y otros patógenos pueden causar en estos pacientes una alta mortalidad.

En los últimos años, varios grupos de investigación han estudiado la calidad microbiológica de los vegetales de IV Gama listos para el consumo, destacando recuentos altos de microorganismos aeróbicos mesófilos, coliformes, mohos y levaduras pero sin presencia de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* (De Giusti *et al.*, 2010; Calónico *et al.*, 2019), prestando menos atención a la evolución de la microflora durante la vida útil y refrigeración en el hogar después de la apertura del paquete:

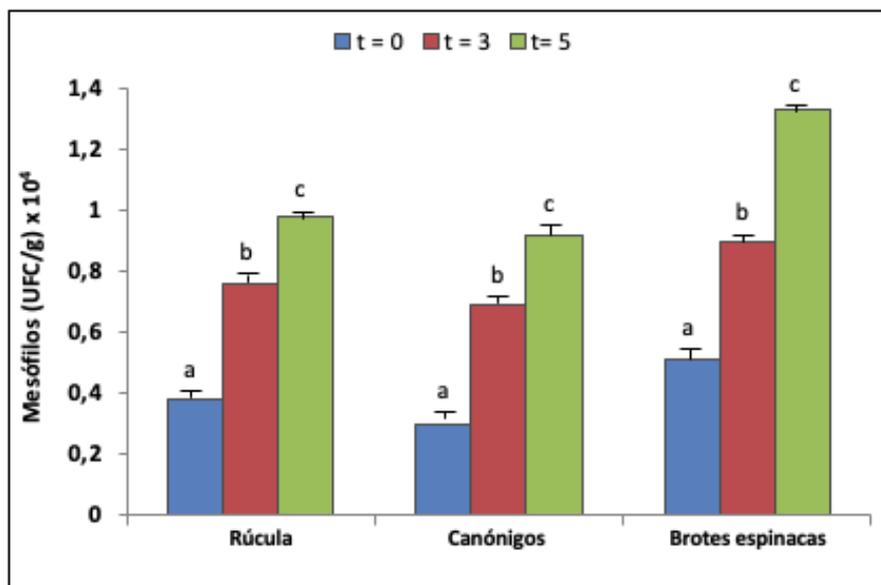


Figura 16. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos mesófilos en verduras de IV Gama con peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p <0,05)*

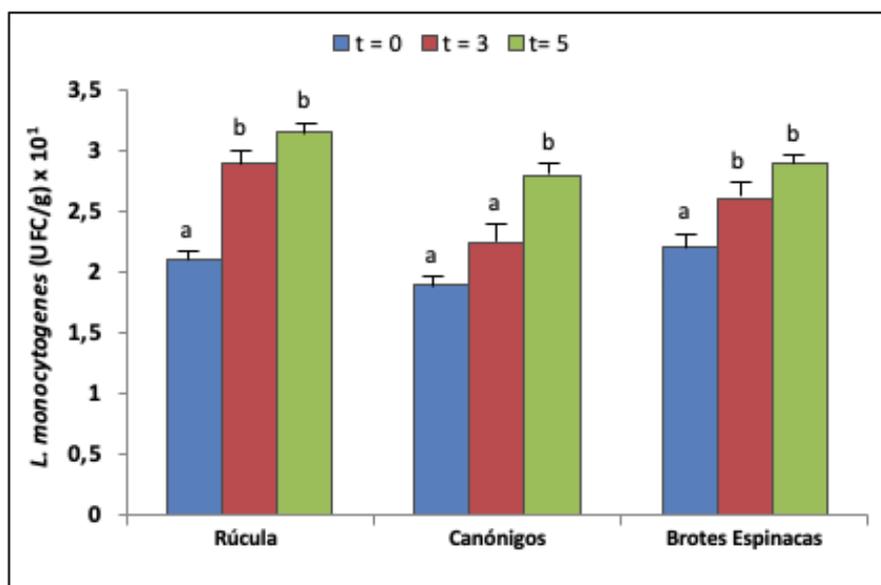


Figura 17. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *L. monocytogenes* en verduras de IV Gama con peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p <0,05)*

Por su parte, otros autores (Arienzo *et al.*, 2020), que han estudiado la evolución microbiana de verduras de IV Gama, una vez abiertos los envases y tras su almacenamiento en restauración casera, han encontrado que la calidad microbiológica y la seguridad de “*las verduras listas para consumo*” todavía parece ser un desafío a pesar de los avances en tecnología y de la existencia de Normativas y Organismos Internacionales de Seguridad Alimentaria, al encontrar valores de microorganismos mesófilos aerobios comprendidos entre 10^4 - 10^5 UFC/g y recuentos de *L. monocytogenes* comprendidos entre 30-40 UFC/g, respectivamente, para distintas muestras de lechuga Iceberg y de lechuga Romana “*listas para consumo*”. Estos autores concluyen en la necesidad de un control microbiológico más extenso y sugieren la optimización de procedimientos de lavado y desinfección estandarizados a implementar por parte de la industria elaboradora de este tipo de verduras de IV Gama.

L. monocytogenes es una bacteria conocida por crecer en una gran variedad de vegetales a temperaturas de refrigeración. Algunos autores (Beuchat *et al.*, 1990) determinaron los efectos del tratamiento con cloro y el envasado en atmósfera modificada sobre la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes*, microorganismos aerobios mesófilos, psicrótrofos y mohos y levaduras en lechugas de diferentes variedades de IV Gama almacenadas a 5 °C y 10 °C, no detectando cambios significativos en las poblaciones de *L. monocytogenes* durante los primeros 8 días de almacenamiento a 5 °C. En cambio, cuando las lechugas se almacenaban a 10 °C se produjeron aumentos significativos dentro de los 3 primeros días de almacenamiento y, después de 10 días, las poblaciones alcanzaron 108-109 UFC/g. Estos autores concluyen que el tratamiento con cloro y las atmósferas modificadas (3 % O₂, 97 % N₂) no inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes*, ya que este microorganismo es capaz de crecer en lechugas sometidas a los procedimientos de envasado y distribución comúnmente utilizados en la IV Gama alimentaria.

Estos valores coinciden con los reportados por nosotros en el presente estudio, tanto para microorganismos mesófilos aerobios como para *L. monocytogenes*. Hemos de destacar que nuestras muestras estuvieron en todo momento almacenadas a 4 °C, ya que diariamente se controlaba y registraba la temperatura de la cámara frigorífica donde estuvieron almacenadas durante los 5 días en que se llevaron a cabo los análisis microbiológicos; sin duda, éste es un hecho importante de resaltar, ya que en restauración casera no existe un control estricto y diario de las temperaturas de las neveras o refrigeradores.

La temperatura de comercialización recomendada para el envasado en atmósfera modificada de las verduras de IV Gama es de 3-4 °C, pero estos productos a menudo se almacenan a 10 °C, temperatura abusiva que permite el crecimiento de microorganismos tanto mesófilos como psicrófilos potencialmente patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. Así quedó patente en un estudio llevado a cabo por algunos autores (Oliveira *et al.*, 2012) al estudiar los efectos del tipo de envasado y la temperatura de almacenamiento sobre el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos en lechuga Romana de IV Gama envasada en atmósferas modificadas, donde constataron como *L. monocytogenes* pudo crecer a 5 °C aproximadamente un 5 % en todas las envases de ensalada, independientemente de la concentración inicial, mientras que a 25 °C la bacteria creció rápidamente y aumentó aproximadamente en un 110 % al cabo de 3 días de almacenamiento de estas lechugas de IV Gama.

En las Figuras 18 y 19 se recogen los recuentos microbianos encontrados por nosotros en *B. cereus* y *C. perfringens* en las muestras de canónigos, rúcula y brotes de espinacas:

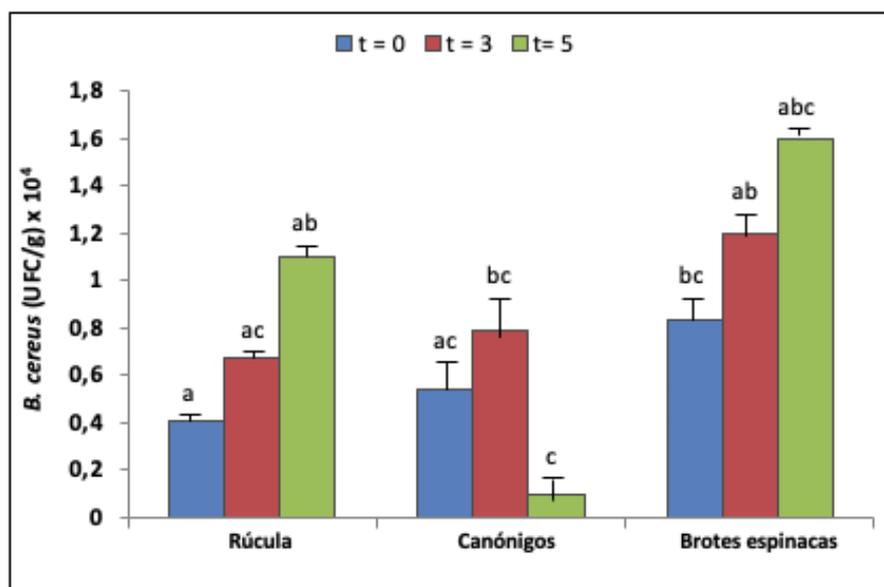


Figura 18. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *B. cereus* en verduras de IV Gama con peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras* ($p < 0,05$)

El Reglamento (CE) n.º 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios no especifica nada sobre los recuentos microbianos en *B. cereus* que deben estar presentes en una ensalada de IV Gama para ser considerada higiénicamente segura [(Reglamento (CE) n.º 1441/2007, de 5 de diciembre)]. En nuestro caso, al quinto día de almacenamiento en refrigeración, las tres verduras analizadas superan los 10^4 UFC/ g, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los brotes de espinacas y la rúcula y los canónigos.

De las tres verduras analizadas, las espinacas son las que tienen mayores recuentos microbianos en *B. cereus*, tanto en el día cero ($0,83 \times 10^4 \pm 0,11 \times 10^4$) como al quinto día de almacenamiento en refrigeración ($1,60 \times 10^4 \pm 0,08 \times 10^4$ UFC/g) y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la rúcula y a los canónigos. Vuelven de nuevo a posicionarse las espinacas, ya sean comercializadas en I Gama o en IV Gama, como las verduras que suelen presentar mayores recuentos microbianos en microorganismos patógenos como *B. cereus* y *L. monocytogenes*.

Los microorganismos ambientales típicos que se encuentran en el suelo (como *B. cereus* y *C. perfringens*) contaminan las plantas infiltrándose a través de raíces o superficies expuestas (heridas o cortadas) pudiendo ser internalizados por la planta, al originarse un recubrimiento que crea una biopelícula natural que protege a estos microorganismos de los tratamientos desinfectantes superficiales que tiene lugar en el proceso de elaboración de estas ensaladas de IV Gama (Erickson, 2012). En este mismo sentido, se pronuncian otros autores (Montville *et al.*, 2005) al concluir que los estudios han demostrado que la mayoría de los procesos de desinfección pueden reducir la tasa de las verduras con alto grado de contaminación; de hecho, en 1999 la FDA recomendó específicamente el uso de 20.000 ppm de cloro para reducir la cantidad inicial de *E. coli*, *B. cereus* y *Salmonella* spp. en 5,00 log₁₀ unidades. Sin embargo, no existe un único proceso de saneamiento establecido para eliminar por completo los patógenos de las verduras verdes destinadas a la IV Gama, ya que la reducción va a depender de la carga microbiana inicial de las verduras seleccionadas y ésta depende de numerosos factores como el uso de agua de riego sin tratar, fertilizantes orgánicos inapropiados, vida silvestre u otras fuentes que pueden ocurrir en cualquier lugar desde la granja hasta la mesa, así como fallos durante la cosecha, manipulación, procesamiento y empaque.

En relación con los resultados obtenidos para *C. perfringens* (Figura 19), los mayores recuentos microbianos en este patógeno se encuentran al quinto día de almacenamiento en refrigeración para la rúcula, seguida de los brotes de espinacas y de los canónigos, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre estas dos verduras y la rúcula al finalizar la fecha de caducidad de las mismas. Al igual que en el caso de *L. monocytogenes*, los recuentos de *C. perfringens* no llegan a alcanzar estos límites considerados como “no aceptables”, pero su presencia en estas verduras pecioladas listas para el consumo es preocupante ya que puede indicar falta de higiene por contaminaciones cruzadas en la industria alimentaria:

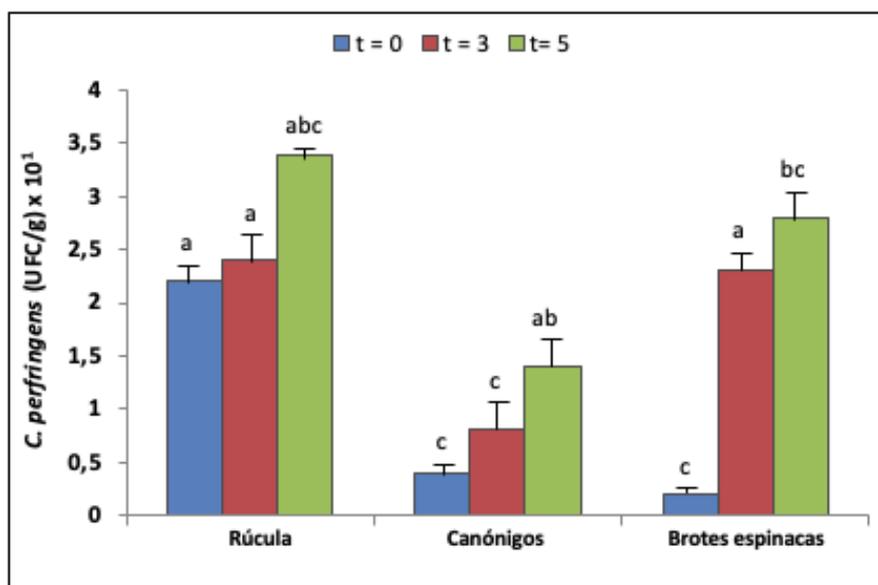


Figura 19. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para *C. perfringens* en verduras de IV Gama con peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p < 0,05)*

Si bien en la literatura científica existe bastante información sobre la calidad higiénico-sanitaria de diferentes tipos de lechugas de IV Gama de hoja verde (lechuga Iceberg, lechuga Romana, escarola, etc.), no existen apenas estudios donde se aborde la calidad microbiológica de verduras de IV Gama con peciolo, como rúcula, canónigos o brotes de espinacas, aunque el consumo de estas verduras en España se ha incrementado en los últimos 10 años en más de un 35 % y, actualmente, suponen en los supermercados el 22 % del total de las ensaladas de IV Gama comercializadas.

En la literatura científica existen diversos estudios donde se pone de manifiesto que las verduras frescas cortadas y envasadas en atmósferas modificadas (EAM) pueden modificar la atmósfera en el interior de sus envases como resultado del consumo de O₂ y de la producción de CO₂ (Zagory *et al.*, 1988; Willox, 1995; Pirovani *et al.*, 1998) dentro del envase. En general, las composiciones en gases dentro de un envase en atmósferas modificadas dependen principalmente de factores como la temperatura de almacenamiento, peso de llenado del producto, velocidad de respiración de la verdura y velocidades de transmisión de O₂ y CO₂ a través de las paredes del paquete (Bolin *et al.*, 1991). Todos los materiales utilizados en el envasado en EAM de las verduras analizadas en nuestro estudio presentan alta permeabilidad al O₂ y al CO₂.

Esto, unido a la baja velocidad de respiración de estas verduras (Heimdal *et al.*, 1995; López-Gálvez *et al.*, 1997), puede haber propiciado que la modificación de gases dentro del envase se haya realizado lentamente, existiendo un porcentaje mayor de O₂ que de CO₂ a lo largo de todo el almacenamiento en refrigeración. Este hecho favorecería (como así parece ser según nuestros resultados) el crecimiento de una flora aerobia (*B. cereus*, microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos) frente a un menor crecimiento de una flora anaerobia (*L. monocytogenes* y *C. perfringens*) cuya velocidad de crecimiento estaría ralentizada, de ahí los mayores recuentos microbianos observados en los tres tipos de verduras analizadas en *B. cereus*, microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos (microorganismos todos ellos aerobios) frente al menor crecimiento en bacterias anaerobias (*L. monocytogenes* y *C. perfringens*).

En relación con el recuento en microorganismos psicrófilos (Figura 20) éste aumenta a medida que aumentan los días de almacenamiento, alcanzándose al quinto día valores por encima de 10⁴ UFC/g, siendo los canónigos la verdura que presenta menor crecimiento en microorganismos psicrófilos y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la rúcula y los brotes de espinacas. De media, estas verduras presentan un recuento en microorganismos psicrófilos al final de su fecha de consumo de 1,32 x 10⁴ UFC/g, lo que las situaría en un nivel de calidad “*acceptable*” según el *Reglamento Europeo (CE) n.º 1441/2007*. Estos valores son ligeramente inferiores a los encontrados por algunos autores (Li *et al.*, 2017) al estudiar la calidad microbiológica y seguridad de las “*verduras listas para el consumo*” en los mercados de agricultores de West Virginia y Kentucky (EEUU), donde encuentran valores superiores a 10⁶ UFC/g siendo las espinacas las verduras que contienen la mayor cantidad de población microbiana:

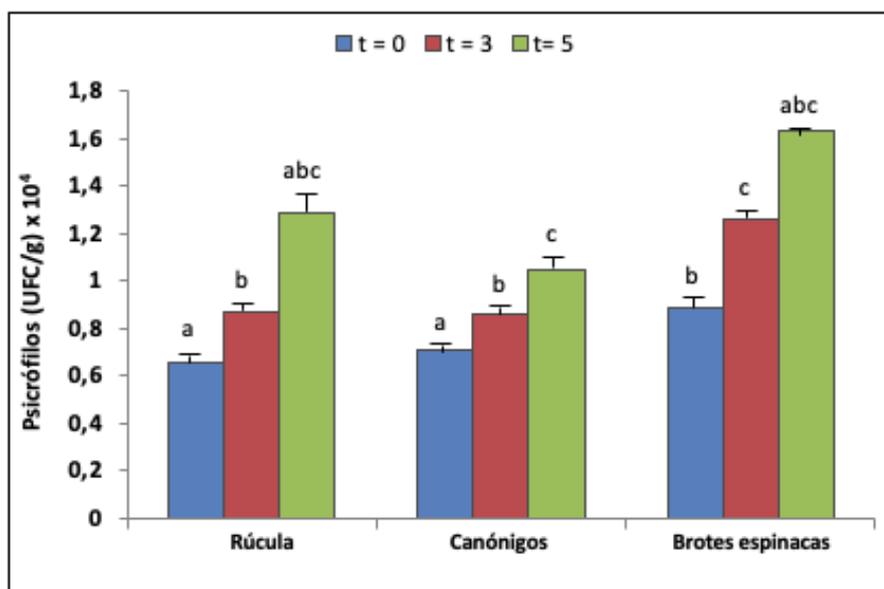


Figura 20. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para microorganismos psicrófilos en verduras de IV Gama con peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p <0,05)*

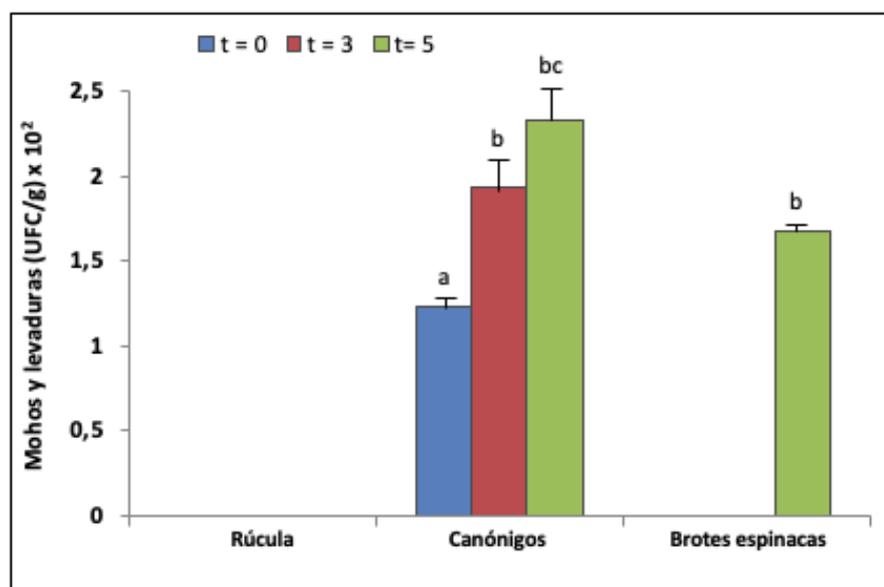


Figura 21. Recuentos microbianos medios medidos como unidades formadoras de colonias (UFC/g) para mohos y levaduras en verduras de IV Gama con peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las distintas verduras (p <0,05)*

En nuestro estudio, los recuentos microbianos encontrados para microorganismos indicadores de la seguridad higiénica de las ensaladas de IV Gama (*L. monocytogenes*, *B. cereus* y *C. perfringens*), así como para microorganismos indicadores de la calidad comercial (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras) son siempre inferiores a los reportados en la literatura científica. Tal vez esto sea debido al estricto control de temperatura (a 4 °C) al que mantuvimos las muestras durante los cinco días de almacenamiento en refrigeración, ya que a pesar del bien documentado beneficio de temperaturas bajas constantes a lo largo de la cadena de almacenamiento de la IV Gama, tanto para la calidad como para la seguridad higiénica, el cumplimiento de un estricto control de temperatura sigue siendo, sin embargo, un desafío para la industria, especialmente para los hipermercados, supermercados y otras tiendas de alimentación.

En otro estudio, ciertos autores (Sant´Ana *et al.*, 2012b) determinaron el potencial de crecimiento de patógenos en nueve tipos de vegetales listos para el consumo, incluidos rúcula, berza, escarola, espinacas, berros, zanahoria rallada, ensalada verde y mezcla para yakisoba almacenadas en refrigeración a 7 °C y a 15 °C. Los resultados mostraron que *L. monocytogenes* pudo crecer más (potencial de crecimiento 0.5 log₁₀) durante el almacenamiento de las hortalizas a 15 °C que *Salmonella*. Los valores de potencial de crecimiento más altos se observaron para estas verduras de IV Gama cuando se almacenaron a 15 °C durante 6 días en hojas de espinacas (crecimiento potencial = 3,3) y en rúcula (potencial de crecimiento = 3,2) que en escarola (potencial de crecimiento = 1,2) y en ensalada verde (potencial de crecimiento = 1,7), para *L. monocytogenes* y *B. cereus*.

En muchos países, las verduras de hoja verde y sus ensaladas listas para consumo se producen a escala industrial prácticamente durante todo el año. Sin embargo, las verduras de hoja verde que se utilizan en las ensaladas de IV Gama retienen gran parte de su microflora autóctona después de un procesamiento mínimo, por lo que los patógenos que forman parte de esta microflora plantean un problema potencial de seguridad alimentaria.

El aumento porcentual general en el crecimiento de cada uno de los microorganismos analizados, y para cada una de las verduras estudiadas a lo largo de los cinco días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C en las verduras de IV Gama con peciolo, aparece recogido en la Tabla 8:

Tabla 8. Promedio de aumento del porcentaje de microorganismos indicadores de seguridad higiénica y de calidad comercial en las verduras de IV Gama con pechito al quinto día de almacenamiento en refrigeración a + 4 °C

MICROORGANISMOS INDICADORES DE SEGURIDAD HIGIÉNICA				MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD COMERCIAL		
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>B. cereus</i>	Mesófilos	Psicrófilos	Mohos y levaduras
Rúcula	+ 11,90 %	+ 13,63 %	+ 42,07 %	+ 39,47 %	+ 20,45 %	-
Canónigos	+ 11,84 %	+ 62,5 %	-	+ 51,66 %	+ 11,97 %	+ 22,36 %
Brotos de espinacas	+ 7,95 %	+ 75,3 %	+ 23,19 %	+ 40,19 %	+ 20,78 %	-

Ciertos autores (Oliveira *et al.*, 2010), al estudiar el efecto de las atmosferas modificadas y de la temperatura de almacenamiento sobre la supervivencia de microorganismos mesófilos y psicrófilos en ensaladas de IV Gama, concluyen que la composición en O₂ y CO₂ de la atmósfera de almacenamiento generada dentro de diferentes envases de lechuga “*lista para consumo*” no depende tanto de la permeabilidad a los gases de los materiales de envasado utilizados como de la temperatura de almacenamiento. Así, demostraron que las poblaciones de mesófilos y psicrotrofos en esas muestras de ensaladas aumentaron de 2.50 a 3.42 unidades logarítmicas al final del período de almacenamiento a 5 °C, mientras que si el almacenamiento se realizaba a 25 °C aumentaba de 3,67 a 5,52 unidades logarítmicas, respectivamente, para los dos grupos de microorganismos. Esto, a su vez, es debido a que la tasa de crecimiento microbiana viene determinada por la velocidad de respiración de las verduras y ésta, a su vez, por la temperatura de almacenamiento.

De este modo, a 25 °C la velocidad de respiración es mayor que a 5 °C, y si la permeabilidad al material de envasado es mayor al O₂ que al CO₂ se genera dentro del envase una atmósfera rica en O₂ que a temperaturas de 25 °C favorece el mayor crecimiento microbiano de flora aerobia (microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos). De ahí, que estos microorganismos se utilicen como indicadores de calidad sobre el sistema de almacenamiento seguido.

Resultados similares obtuvieron otros autores (Abadias *et al.*, 2008) al realizar el recuento microbiano de vegetales precortados de supermercados envasados en atmósferas modificadas, con diferentes tipos de materiales (película I de HDPE y película II de extrusionado de PE/EVOH/PE), y a diferentes temperaturas (5° y 21 °C). El aumento del nivel de CO₂ y la disminución de O₂ a ambas temperaturas en la película I era más lento que los cambios en los gases dentro de los envases paquetes con la película II. Las diferencias entre estos dos tratamientos se atribuyeron a las diferentes permeabilidades de la película, siendo la película I más permeable al oxígeno que la película II. La atmósfera dentro de las películas de los envases almacenados a 21 °C se modificó más rápidamente que dentro de los paquetes almacenados a 5 °C.

Estos dos grupos de microorganismos aumentaron significativamente durante el periodo de almacenamiento en todos los tipos de envases, llegando las poblaciones, al final del periodo de almacenamiento, a valores comprendidos entre 10⁷ y 10¹⁰ UFC/g, siendo siempre la tasa de crecimiento más rápido a altas temperaturas que a temperaturas refrigeradas. Estos resultados indicaron la importancia de la temperatura en determinar la tasa de respiración de las verduras frescas.

Los resultados encontrados por nosotros son inferiores a los reportados por estos autores, ya que en nuestro caso los rangos al finalizar el periodo de almacenamiento oscilan entre 0,92 x 10⁴-1,33 x 10⁴ (para los microorganismos mesófilos) y entre 1,05 x 10⁴-1,63 x 10⁴ (para los microorganismos psicrófilos). En nuestro caso, las verduras siempre se han mantenido a 4 °C y dentro de los microorganismos indicadores de calidad, son los mesófilos los que experimentan mayores porcentajes de crecimiento a lo largo de los 5 días de almacenamiento en refrigeración, especialmente en los canónigos, seguidos de las espinacas y existiendo para las tres verduras analizadas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de crecimiento entre los microorganismos mesófilos y los psicrófilos.

En general, los valores encontrados por nosotros en verduras pecioladas de IV Gama son inferiores a los reportados por otros autores (Santos *et al.*, 2014) al estudiar la evolución microbiana en el interior de envases de verduras listas para el consumo, tales como espinacas, acelgas y lechugas Iceberg, entre otras. Esta diferencia puede ser debida a la diferente naturaleza del material de envasado empleado a la hora de empaquetar estas verduras de IV Gama, ya que en nuestro caso, tanto el papel celofán como el LDPE y el LLDPE presentan una mayor permeabilidad al O₂ que al CO₂, lo que permite crear dentro del envase una atmosfera aerobia que, si bien propicia el crecimiento de microorganismos aerobios, limita en cambio el crecimiento de patógenos anaerobios como *L. monocytogenes* y *C. perfringens*. Por ello, ambos microorganismos son los que presentan un menor potencial de crecimiento y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo de aerobios tales como *B. cereus*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras. Esta naturaleza dentro de los envases, con mayor predominio de O₂ que de CO₂ unido a un estricto control de la temperatura de almacenamiento a 4 °C, pensamos que ha contribuido a que al final del periodo de almacenamiento en refrigeración los recuentos tanto de microorganismos indicadores de calidad higiénica como de calidad comercial, sean inferiores a los encontrados en la literatura científica, ya que bajar la temperatura de almacenamiento se provoca un descenso en la respiración tisular de las verduras, lo que se traduce en un predominio de O₂ y un aumento de CO₂ dentro del tejido y, por tanto, dentro de la atmosfera pasiva que rodea a las verduras en el interior del envase.

En este sentido se pronuncian ciertos autores (Zhang *et al.*, 2007; Martínez-Sánchez *et al.*, 2012) al analizar la calidad microbiológica de lechugas baby-leaf y multi hojas verdes y rojas (como lechuga Lollo Rosso) envasadas en atmosferas modificadas, concluyendo que bajar la temperatura del producto enlentecerá el metabolismo de las hojas, disminuyendo su frecuencia respiratoria y enlenteciendo el crecimiento de microorganismos patógenos anaerobios.

En nuestro estudio, el crecimiento de bacterias aerobias indicadoras de calidad comercial (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras) no fue suprimido por el envase en atmósfera modificada (MAP), aunque la carga microbiana fue algo menor que la que la reportada por algunos autores (Xie *et al.*, 2021), los cuales encuentran valores al final de la vida de comercialización entre 10⁶-10⁸ UFC/g, especialmente en el caso de los microorganismos mesófilos, para ensaladas comercialmente preparadas.

Nosotros hemos encontrado que este crecimiento en microorganismos aerobios indicadores de calidad comercial fue mayor que para los microorganismos patógenos oportunistas como *L. monocytogenes* y *C. perfringens* (indicadores de deficiente calidad higiénica); por ello, concluimos que tanto el papel celofán como el LDPE y el LLDPE son materiales de envasado muy adecuados para IV Gama siempre que haya un estricto control de la temperatura de almacenamiento en refrigeración en torno a los 4-5 °C, hecho éste al que también llegan ciertos autores (Zhou *et al.*, 2022) al estudiar los efectos del tiempo de abuso de la temperatura en la vida útil de las espinacas tiernas listas para el consumo a través de modelos de crecimiento microbiano y su asociación con la calidad sensorial. Estos autores encuentran que la carga bacteriana aeróbica y los recuentos en mohos y levaduras en espinacas listas para consumo fueron un 30 % más bajos cuando se mantienen estos vegetales a 5 °C que cuando se almacenan a temperaturas por encima de 10 °C.

4.2.2. Calidad higiénica de verduras de IV Gama sin peciolo

En la Tabla 9 se recogen los recuentos microbianos encontrados en verduras y vegetales de IV Gama sin peciolo:

Tabla 9. Recuentos microbianos medios medidos en UFC/g (media ± EEM) de los microorganismos indicadores de seguridad higiénica y de calidad comercial objeto de estudio en verduras de IV Gama sin peciolo

VERDURAS DE IV GAMA SIN PECIOLO							
IV Gama	Día	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>C. perfringens</i> (UFC/g) Media ± EEM	<i>B. cereus</i> (UFC/g) Media ± EEM	Mesófilos (UFC/g) Media ± EEM	Psicrófilos (UFC/g) Media ± EEM	Mohos y levaduras (UFC/g) Media ± EEM
Escarola	0	0,50 x 10 ¹ ± 0,02 x 10 ¹	0,40 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	0,14 x 10 ⁴ ± 0,02 x 10 ⁴	0,14 x 10 ⁴ ± 0,01 x 10 ⁴	0,23 x 10 ⁴ ± 0,02 x 10 ⁴	n.d.
	3	0,68 x 10 ¹ ± 0,11 x 10 ¹	0,60 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	0,24 x 10 ⁴ ± 0,01 x 10 ⁴	0,31 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	0,43 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	n.d.
	5	0,80 x 10 ¹ ± 0,02 x 10 ¹	1,00 x 10 ¹ ± 0,40 x 10 ¹	0,56 x 10 ⁴ ± 0,14 x 10 ⁴	0,50 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	0,81 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	n.d.
Lechuga Romana	0	0,60 x 10 ¹ ± 0,03 x 10 ¹	0,20 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,19 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,17 x 10 ⁴ ± 0,02 x 10 ⁴	0,33 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	n.d.
	3	0,70 x 10 ¹ ± 0,04 x 10 ¹	0,60 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	0,44 x 10 ⁴ ± 0,11 x 10 ⁴	0,57 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,71 x 10 ⁴ ± 0,10 x 10 ⁴	n.d.
	5	0,50 x 10 ¹ ± 0,02 x 10 ¹	1,00 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,54 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	0,70 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	0,77 x 10 ⁴ ± 0,07 x 10 ⁴	n.d.
Lechuga Iceberg	0	n.d.	0,20 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,34 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴	0,25 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	0,55 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	1,67 x 10 ² ± 0,58 x 10 ²
	3	n.d.	0,90 x 10 ¹ ± 0,10 x 10 ¹	0,63 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	0,67 x 10 ⁴ ± 0,06 x 10 ⁴	0,75 x 10 ⁴ ± 0,05 x 10 ⁴	2,52 x 10 ² ± 0,51 x 10 ²
	5	n.d.	1,20 x 10 ¹ ± 0,20 x 10 ¹	0,92 x 10 ⁴ ± 0,07 x 10 ⁴	0,83 x 10 ⁴ ± 0,04 x 10 ⁴	1,12 x 10 ⁴ ± 0,11 x 10 ⁴	3,17 x 10 ² ± 0,08 x 10 ²

En general, los recuentos microbianos encontrados en las verduras de IV Gama sin peciolo, para cada uno de los microorganismos analizados, sitúan a estas verduras, al quinto día de su almacenamiento en refrigeración a 4 °C, en un nivel de calidad “*satisfactorio*”. En el caso de microorganismos indicadores de calidad comercial, los mayores recuentos se alcanzan en microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos y sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las tres verduras analizadas. Estos resultados son inferiores a los reportados en la literatura científica por diversos autores (Nagar *et al.*, 2013; Jeddi *et al.*, 2014; Mogren *et al.*, 2018) que encuentran niveles en microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos en lechugas Iceberg, lechuga Romana y otros tipos de lechugas cortadas y envasadas en MAP, muy superiores a los nuestros (con rangos entre 3,3-7,4 x 10⁵ UFC/g) y argumentan que al trocear las diferentes lechugas se producen rupturas celulares y la salida de fluidos hacia el exterior que favorecen el crecimiento microbiano, especialmente en las hojas más internas en comparación con las exteriores. En nuestro caso, no distinguimos entre hojas internas y externas ya que homogeneizamos todas las muestras antes de proceder a su siembra en el medio PCA (para microorganismos mesófilos) y medio King Agar A (para microorganismos psicrófilos).

En cuanto a mohos y levaduras, solo fueron encontrados en la lechuga Iceberg con un valor de $3,17 \times 10^2 \pm 0,08 \times 10^2$ al quinto día de almacenamiento en refrigeración y por debajo de los niveles encontrados en las verduras de IV Gama con peciolo analizadas en el apartado anterior.

Como sucedía con las verduras de IV Gama con peciolo, en las verduras de IV Gama sin peciolo el crecimiento de bacterias mesófilas, psicrófilas, y mohos y levaduras no fue suprimido por el MAP, aunque la carga microbiana fue menor que la reportada por otros autores para ensaladas “*lista para consumo*”. Por ello, en general, el grado de calidad comercial de las tres lechugas analizadas se sitúa en el rango de “satisfactorio”.

En relación con los microorganismos indicadores de seguridad higiénica, los mayores recuentos se han encontrado para *B. cereus* y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a *L. monocytogenes* y *C. perfringens*. En general, estas verduras se caracterizan por tener unos recuentos microbianos especialmente bajos en ambas bacterias patógenas oportunistas (incluso no se ha detectado *Listeria* en lechuga Iceberg), lo que las sitúa en un grado “satisfactorio” en cuanto a seguridad higiénica. A ello debe contribuir, como en la IV Gama con peciolo, la alta permeabilidad al oxígeno de los materiales de envasado utilizados que enlentecen el crecimiento de microorganismos anaerobios en el interior del envase, al predominar en el espacio de cabeza una mayor proporción de O₂ que de CO₂. Esto también contribuirá a que *B. cereus*, bacteria aerobia, presente mayores recuentos microbianos que *L. monocytogenes* y *C. perfringens* (bacterias de naturaleza anaerobia).

Aunque los tejidos intactos y sanos (Martínez-Sánchez *et al.*, 2012) se han descrito como un sustrato deficiente para el crecimiento de microorganismos oportunistas, a diferencia de las superficies dañadas por corte (como sucede en estas tres lechugas analizadas que vienen troceadas) lo que aumenta la disponibilidad de nutrientes celulares proporcionando condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos, hay que tener también en cuenta otros factores. Así, por ejemplo, y como recogen algunos autores (Calónico *et al.*, 2019), un almacenamiento postcosecha inadecuado en cuanto a condiciones abusivas de temperatura de “*espinacas baby*”, unido a inadecuadas condiciones de desinfección a la hora de preparar estas ensaladas de IV Gama, puede reportar altos recuentos microbianos ya que los microorganismos, tanto mesófilos como psicrófilos, encuentran su máximo potencial de crecimiento a temperaturas por encima de 20 °C.

De nuevo, la temperatura es un factor determinante en la calidad y seguridad higiénica de estas ensaladas “*listas para consumo*”, no solo una vez preparadas sino también en todo el trayecto seguido desde la producción primaria hasta la industria agroalimentaria.

Las verduras, una vez recolectadas, mantienen su función metabólica y, por lo tanto, su calidad continúa deteriorándose durante el almacenamiento postcosecha favoreciendo la proliferación microbiana y el deterioro fisiológico de los tejidos vegetales. Las bajas temperaturas ayudan a reducir esta tasa metabólica, lo que también ayuda a mantener la calidad tanto nutritiva y organoléptica como higiénica.

Las muestras analizadas por nosotros son producidas por empresas con una sólida posición en el mercado agroalimentario, lo que los lleva a unos cánones de calidad basados en el Principio de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) que aseguran la calidad de sus productos desde el campo a la mesa del consumidor. Esto, unido a la elección de un envase adecuado, les está garantizando que durante todo el periodo de comercialización y vida útil de estas verduras los recuentos microbianos que hemos encontrado, tanto en los microorganismos indicadores de seguridad higiénica como en los microorganismos indicadores de calidad comercial, estén dentro de rangos aceptables y seguros para el consumo. Pero también tenemos que insistir en la necesidad de que el consumidor respete dos reglas fundamentales para asegurar la calidad de estas ensaladas listas para consumo: no romper la cadena del frío bajo ningún concepto y no consumir estos alimentos pasada su fecha de caducidad:

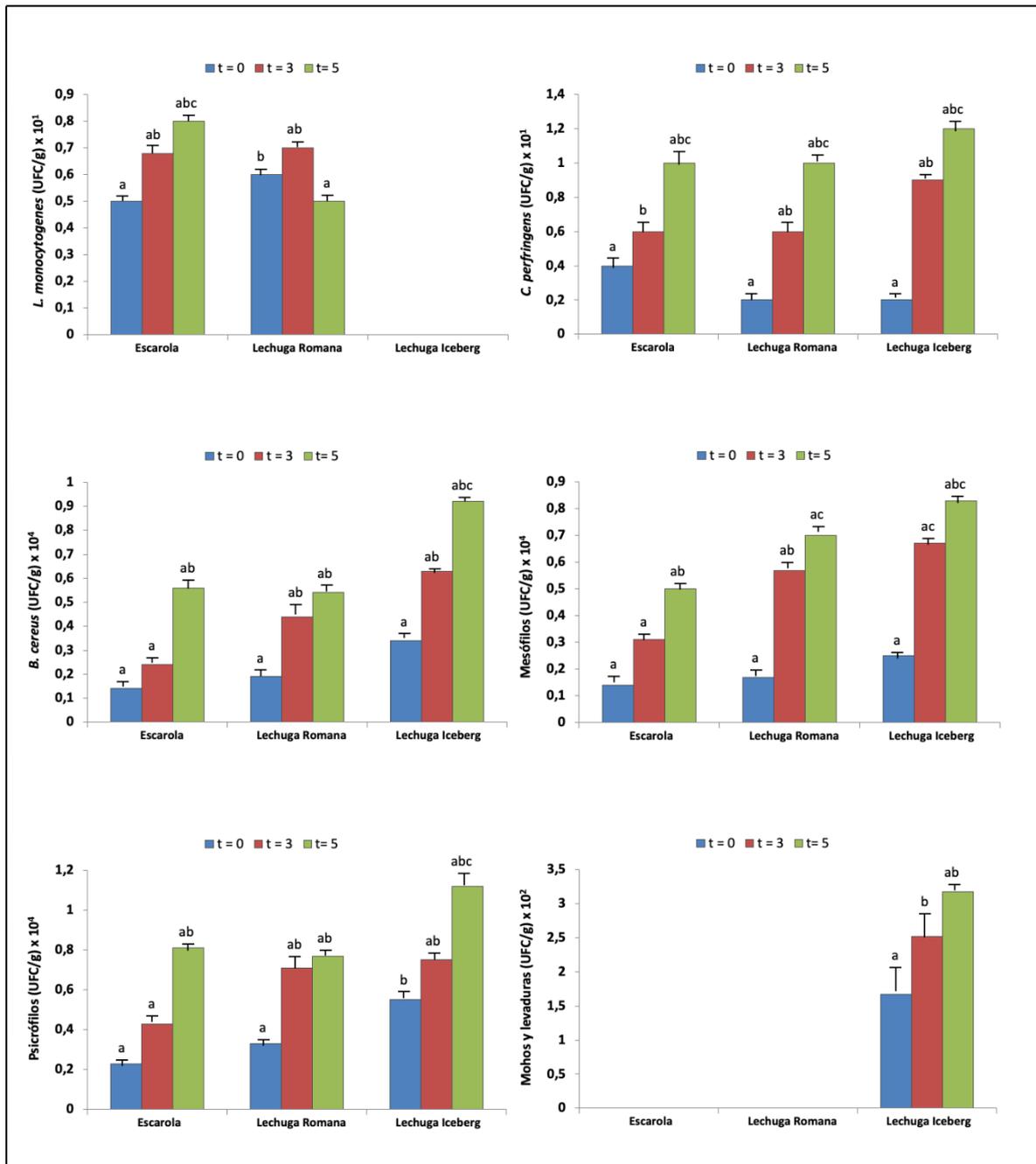


Figura 22. Recuentos microbianos medios medidos como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) en verduras de IV Gama sin peciolo; *diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas entre las verduras analizadas (p < 0,05)*

El consumo de ensaladas de verduras listas para comer entre los consumidores de los países en desarrollo ha aumentado con el cambio en el patrón de estilo de vida. Sin embargo, las enfermedades transmitidas por los alimentos vinculadas a estas ensaladas plantean amenazas de seguridad. Diversos estudios han demostrado la aparición de varios patógenos microbianos que incluyen entre otros a *L. monocytogenes*, coliformes, *Salmonella*, etc., así como a microorganismos responsables de la alteración tales como mohos, levaduras y bacterias aerobias mesófilas en este tipo de ensaladas listas para comer. Para superar estas amenazas a la seguridad, controlar los patógenos microbianos y mejorar la vida útil, se explotan diferentes técnicas tales como envasado en condiciones atmosféricas modificadas, refrigeración, tecnologías de envasado innovadoras como el uso de envases activos, etc. (Mir *et al.*, 2018). Estas nuevas tecnologías van orientadas a reducir la carga microbiana en patógenos tales como *L. monocytogenes*, el cual es un patógeno recurrente en este tipo de alimentos de IV Gama y responsable de numerosos brotes por infecciones alimentarias (listeriosis) enumerados en la última década tanto en Europa como en los EEUU, con una incidencia de entre 0,53 a 0,97 casos por cada 100000 habitantes (Stephan *et al.*, 2015).

Patógenos como *L. monocytogenes* pueden unirse a las hojas de las plantas y/o ser internalizados a través de las hojas o el sistema radicular endófito en los campos de cultivo a través de aguas de riego contaminadas. Asimismo, el uso de utensilios contaminados, materiales de embalaje y condiciones inadecuadas en las plantas de procesamiento de estas ensaladas y durante el almacenamiento pueden ser también causa de la contaminación por *Listeria* (Todd *et al.*, 2011; Faour-Klingbeil *et al.*, 2016).

En la literatura científica hay unanimidad a la hora de escoger a *L. monocytogenes* como un indicador de condiciones favorables existentes para la multiplicación de microorganismos. Este parámetro es útil para indicar aplicaciones deficientes de prácticas higiénicas (BPH) e inadecuado control de temperatura durante el procesamiento, transporte y almacenamiento de las ensaladas de IV Gama. Diversos estudios (Okada *et al.*, 2012; McCollum *et al.*, 2013; Uyttendaele *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2014) muestran una prevalencia muy alta de *Listeria*, con rangos del 14-20 % de las muestras analizadas, fundamentalmente en ensaladas muy manipuladas y sometidas a troceado como lechugas Iceberg, lechugas Romana y lechugas Lollo Rosso o lechuga de hoja roja, señalando las áreas de lavado de las plantas de procesamiento, junto con deficientes prácticas higiénicas en las operaciones de pesado y envasado, como puntuales focos de contaminación.

En los estudios llevados a cabo por estos autores, la contaminación por *L. monocytogenes* en este tipo de ensaladas superan los valores de 10^2 UFC/g considerados como seguros. Estos datos no coinciden con los encontrados por nosotros en este tipo de lechugas, ya que en ninguna de las muestras analizadas llegan a superarse las 10^1 UFC/g. Posiblemente, esto sea debido a las políticas intervencionistas de muchos Estados en los últimos años, entre ellos España, que están intensificando los controles a nivel de la industria alimentaria, ya que la listeriosis es una enfermedad que afecta fundamentalmente a personas inmunodeprimidas (por ejemplo, los ancianos) y en países como España, con una población cada vez más envejecida y más vulnerable a este tipo de infecciones, se hace necesario implantar políticas sanitarias adecuadas para evitar la listeriosis humana.

El aumento porcentual general en el crecimiento de cada uno de los microorganismos analizados, y para cada una de las verduras estudiadas a lo largo de los cinco días de almacenamiento en refrigeración a 4° C en las verduras de IV Gama sin peciolo, aparece recogido en la Tabla 10:

Tabla 10. Promedio de aumento del porcentaje de microorganismos indicadores de seguridad higiénica y de calidad comercial en las verduras de IV Gama sin peciolo al quinto día de almacenamiento en refrigeración a + 4 °C

MICROORGANISMOS INDICADORES DE SEGURIDAD HIGIÉNICA				MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD COMERCIAL		
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>B. cereus</i>	Mesófilos	Psicrófilos	Mohos y levaduras
Escarola	+ 15 %	+ 37,5 %	+ 75 %	+ 64,28 %	+ 63 %	-
Lechuga Romana	-	+ 75 %	+ 46 %	+ 77,94 %	+ 33,33 %	-
Lechuga Iceberg	-	+ 42,65 %	+35,76 %	+ 55,76 %	+ 58 %	+ 22,45 %

Entre los años 2000 y 2008, los cultivos asociados con los brotes enumerados fueron la “lechuga”, la lechuga Iceberg, la rúcula y las espinacas (bebé) no especificadas, mientras que en epidemias más recientes las mezclas para ensaladas (“*mezcla de ensalada RTE*”, “*ensalada mixta precortada*”, “*ensalada embolsada*”, “*ensalada preempaquetada*”) y lechuga Romana estuvieron implicadas (Mogren *et al.*, 2018). Dentro de los patógenos responsables en estas ensaladas de IV Gama aparecen, por este orden, *E. coli* STEC (productora de toxina Shiga), *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *C. perfringens*.

En nuestro estudio, entre los microorganismos indicadores de seguridad higiénica, los que experimentan mayor incremento son *B. cereus* y *C. perfringens* en escarola y lechuga Romana respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al aumento de porcentaje que experimenta *L. monocytogenes*. Por otro lado, entre los microorganismos indicadores de calidad comercial, los que mayores incrementos experimentan son los microorganismos mesófilos, tanto en escarola como en lechuga Romana, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos microorganismos en este aumento del porcentaje a lo largo de los 5 días de almacenamiento en refrigeración.

4.2.3. Influencia del peciolo sobre el crecimiento microbiano en verduras de IV Gama

Al igual que en el apartado de verduras de I Gama, se procedió a comparar los recuentos microbianos entre ambos tipos de verduras (hoja peciolada *vs.* hoja sésil) a fin de ver la influencia que pudiera tener la presencia de peciolo sobre la calidad microbiológica de las verduras de IV Gama. Para ello, se realizó la media de las UFC/g obtenidas en los distintos grupos de verduras estudiados para cada tipo de microorganismos (Tabla 11). Estos valores representan la media aritmética junto con la desviación estándar de los valores obtenidos para cada uno de los microorganismos al primer ($t = 0$), tercer ($t = 3$) y quinto día ($t = 5$) de almacenamiento en refrigeración a ± 4 °C en verduras de IV Gama con y sin peciolo.

En general, las verduras con peciolo presentan recuentos microbianos más altos que las verduras sin peciolo, especialmente en el caso de los microorganismos indicadores de calidad higiénica (*L. monocytogenes*, *B. cereus* y *C. perfringens*) y con diferencias estadísticamente significativas para estos tres microorganismos ($p < 0,05$) entre las verduras peциoladas (rúcula, canónigos y brotes de espinacas) y las verduras sin peciolo (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg). Por el contrario, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las verduras con peciolo y las verduras sin peciolo para el recuento en microorganismos indicadores de la calidad comercial (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras):

Tabla 11. Recuentos medios expresados en UFC/g y error estándar para los microorganismos objeto de estudio en verduras frescas de IV Gama, atendiendo a la presencia o no de peciolo. Las medias con letras diferentes dentro de una fila son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

MICROORGANISMOS (UFC/g)	VERDURAS DE IV GAMA	
	Verduras con peciolo (Media ± EEM) (n = 3)	Verduras sin peciolo (Media ± EEM) (n = 3)
Microorganismos indicadores de seguridad higiénica		
<i>L. monocytogenes</i>	$2,53 \times 10^1 \pm 0,08 \times 10^1$ ^a	$0,42 \times 10^1 \pm 0,07 \times 10^1$ ^b
<i>C. perfringens</i>	$1,76 \times 10^1 \pm 0,21 \times 10^1$ ^a	$0,77 \times 10^1 \pm 0,09 \times 10^1$ ^b
<i>B. cereus</i>	$8,08 \times 10^3 \pm 0,7 \times 10^3$ ^c	$4,44 \times 10^3 \pm 0,60 \times 10^3$ ^d
Microorganismos indicadores de calidad comercial		
Microorganismos mesófilos	$7,50 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$	$4,60 \times 10^3 \pm 0,40 \times 10^3$
Microorganismos psicrófilos	$10,27 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$	$6,33 \times 10^3 \pm 0,50 \times 10^3$
Mohos y levaduras	$7,96 \times 10^1 \pm 0,07 \times 10^2$	$8,18 \times 10^1 \pm 0,13 \times 10^1$

De nuevo estos datos vuelven a coincidir con los reportados en el apartado anterior, al ser las verduras de IV Gama con peciolo, aunque hayan sido desinfectadas por la industria, las que presentan mayores recuentos en microorganismos, algunos de ellos capaces de formar biofilms como *L. monocytogenes* y *B. cereus*. Por ello, sospechamos que los procedimientos de limpieza y desinfección aplicados en el caso de las verduras de IV Gama con peciolo no son suficientes para reducir la carga microbiana a los mismos niveles que presentan las verduras de IV Gama sin peciolo. El hecho de la existencia de esta estructura botánica, capaz de retener agua y nutrientes esenciales para el crecimiento de bacterias formadoras de biofilms, debería de llevar a la industria alimentaria a plantearse que no se pueden utilizar los mismos sistemas de desinfección en IV Gama sin tener en cuenta la presencia del peciolo:

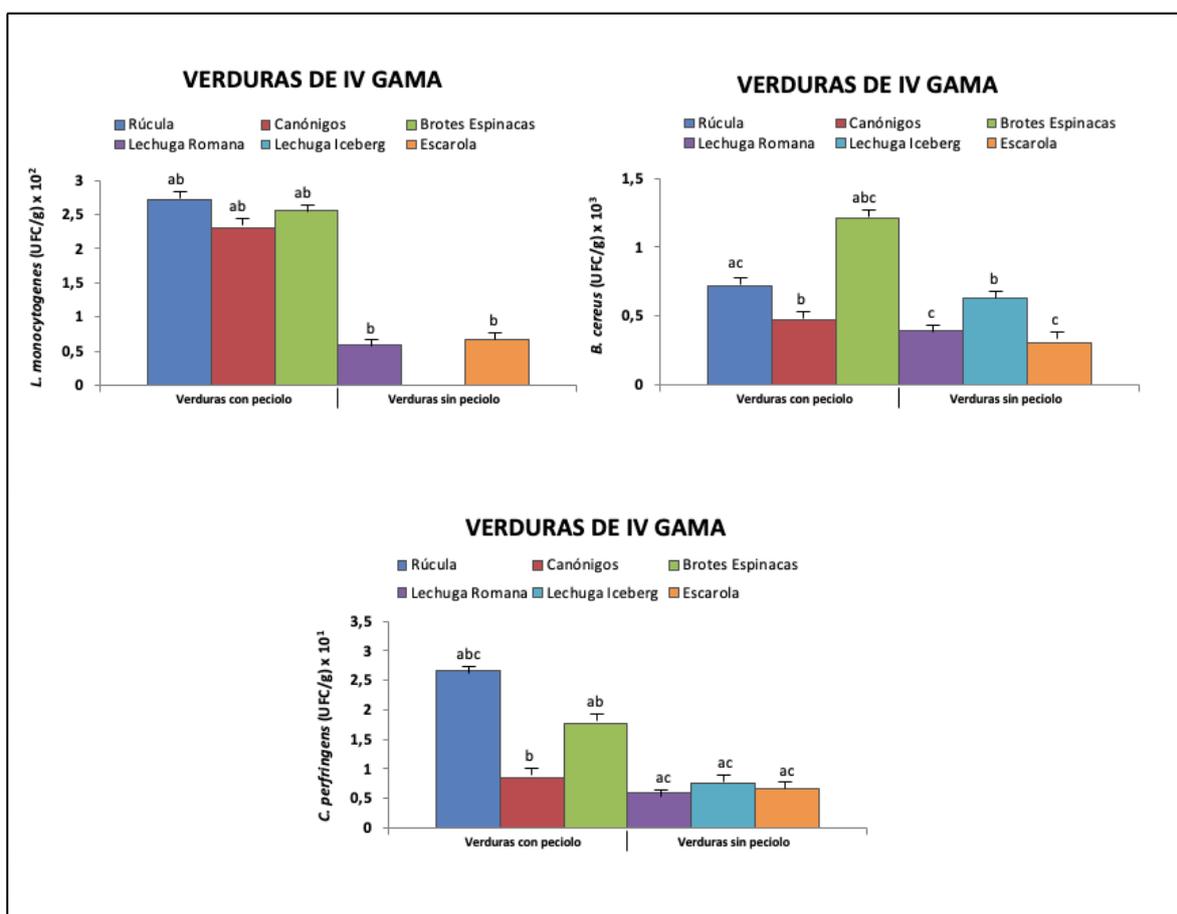


Figura 23. Recuentos microbianos medios medidos como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) para microorganismos indicadores de seguridad higiénica en verduras de IV Gama (pecioladas o sin peciolo); *diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas entre las verduras analizadas (p < 0,05)*

En verduras de IV Gama hay mayor crecimiento microbiano en las verduras pecioladas y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a las verduras sin peciolo, siendo especialmente significativo el crecimiento en *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *C. perfringens* en verduras con peciolo como la rúcula y los brotes de espinacas. Los recuentos más bajos en microorganismos indicadores de seguridad higiénica se encuentran en verduras sésiles como la escarola y la lechuga Romana:

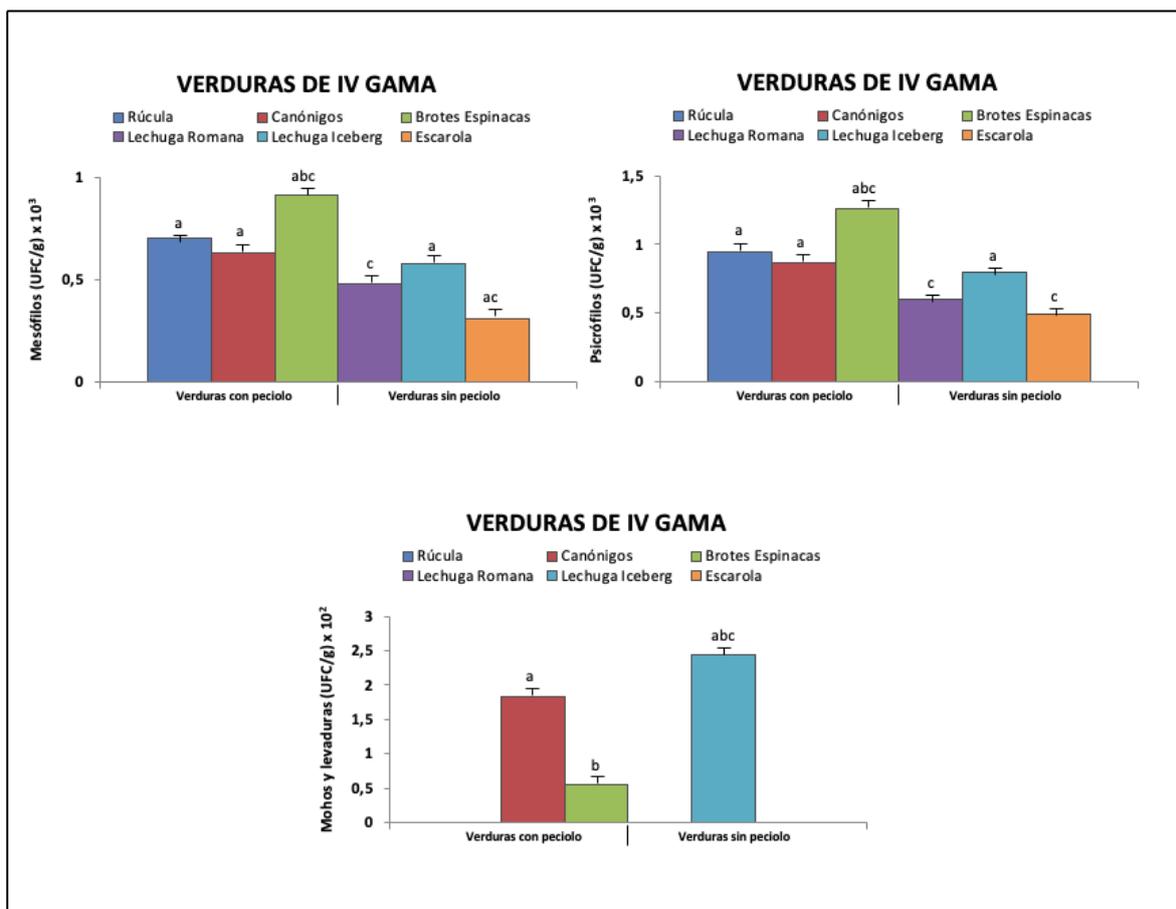


Figura 24. Recuentos microbianos medios medidos como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) para microorganismos indicadores de calidad comercial en verduras de IV Gama (pecioladas o sin peciolo); *diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas entre las verduras analizadas* ($p < 0,05$)

Como en el caso anterior, vuelven a ser las verduras pecioladas las que presentan recuentos más altos en microorganismos indicadores de calidad comercial, especialmente en microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos en rúcula y brotes de espinacas, y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la escarola y la lechuga Romana.

Estos datos corroboran los encontrados al analizar las verduras de I Gama, donde el peciolo aparece como una parte del vegetal determinante de una mayor contaminación microbiana.

En la Tabla 12 se incluye los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) de valores de crecimiento microbiano para las verduras de IV Gama y la presencia o no de peciolo. Como podemos observar, la presencia de peciolo en rúcula, canónigos y brotes de espinacas estuvo correlacionado significativa y positivamente con el crecimiento de *L. monocytogenes* ($p = 0,001$), *B. cereus* ($p = 0,013$) y *C. perfringens* ($p = 0,023$), todos ellos microorganismos indicadores de seguridad higiénica, así como con el crecimiento de microorganismos mesófilos ($p = 0,034$) y microorganismos psicrófilos ($p = 0,044$), indicadores de calidad comercial:

Tabla 12. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significancia (p) entre los valores de recuento microbiano (UFC/g) de microorganismos indicadores de seguridad higiénica y de microorganismos indicadores de calidad comercial y la presencia o no peciolo en las verduras frescas de IV Gama

MICROORGANISMOS	CON PECIOLO		SIN PECIOLO	
	r^a	p	r^a	p
Microorganismos indicadores de seguridad higiénica				
<i>L. monocytogenes</i>	0,793	0,011	0,544	0,059
<i>B. cereus</i>	0,787	0,013	0,228	0,430
<i>C. perfringens</i>	0,710	0,023	0,393	0,366
Microorganismos indicadores de calidad comercial				
Microorganismos mesófilos	0,710	0,034	0,331	0,372
Microorganismos psicrófilos	0,678	0,044	0,500	0,317
Mohos y levaduras	0,523	0,057	0,581	0,061

^a: Se considera una correlación débil cuando el valor de r es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de r está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de r es superior a 0,7

Por el contrario, y como se puede observar, no hubo correlación entre las verduras sésiles estudiadas (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg) y la ausencia de peciolo, tanto en el caso del crecimiento de microorganismos indicadores de seguridad higiénica como en el de microorganismos indicadores de calidad comercial.

5. Conclusiones

1) En general, las verduras pecioladas tanto de I Gama como de IV Gama presentan, respecto a las verduras sin peciolo, recuentos superiores (y con diferencias estadísticamente significativas; $p < 0,05$) tanto en *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus* como en microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, siendo las espinacas y las acelgas las verduras con tasas de contaminación biótica más elevadas, por lo que insistimos en la necesidad de extremar las medidas de desinfección antes del consumo de este tipo de verduras, especialmente en el caso de la ensaladas de I Gama con peciolo.

2) Por otro lado, en las verduras de hoja verde pecioladas de I Gama (grellos, acelgas y espinacas), los recuentos en *L. monocytogenes* y *B. cereus* se encuentran en niveles muy altos, por encima de los considerados higiénicamente seguros, lo que puede convertir a estas verduras en vehículos potenciales de enfermedad (especialmente en poblaciones vulnerables) si no se extreman las medidas de higiene a nivel de la restauración casera y colectiva.

3) En ninguna de las tres variedades de verduras de I Gama sin peciolo, al cabo del quinto día de almacenamiento en refrigeración, llegan a superarse los límites considerados higiénicamente seguros. Solo hay una excepción, *L. monocytogenes*, que sigue presentando recuentos altos aunque menores que en los encontrados en las verduras de hoja verde pecioladas, siendo la lechuga Iceberg la que presenta un mayor crecimiento en este microorganismo y con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto a la escarola y a la lechuga Romana.

4) En general, en las verduras de IV Gama con peciolo, aunque los recuentos microbianos encontrados no exceden los límites máximos para ninguno de los microorganismos analizados permitidos según la Reglamentación Europea, presentan, sin embargo, valores elevados para tratarse de ensaladas que previamente han sido sometidas a un proceso de lavado y desinfección por parte de la industria alimentaria, especialmente en el caso de microorganismos indicadores de seguridad higiénica (*L. monocytogenes*, *B. cereus* y *C. perfringens*) lo que podría convertir a esta ensaladas “listas para consumo” en fuente de enfermedades de transmisión alimentaria, especialmente de listeriosis si se rompe la cadena de frío y/o se consumen pasada la fecha de caducidad indicada en el envase.

5) Al tratarse el peciolo de una estructura delgada, de forma cilíndrica y acanalada, rica en agua y nutrientes, la posibilidad de que microorganismos capaces de formar biofilms (como *L. monocytogenes* y *B. cereus*, entre otros) puedan quedar adheridos sobre la superficie interna de esta canal convierte a esta estructura en una fuente de contaminación microbiana. Esto podría explicar la razón de los mayores recuentos microbianos obtenidos en las verduras pecioladas analizadas, tanto de I Gama como de IV Gama, frente a las verduras sésiles (sin peciolo) como la escarola, la lechuga Romana y la lechuga Iceberg.

6) Los materiales utilizados en el envasado en EAM de las verduras de IV Gama analizadas en nuestro estudio presentan, todos ellos, alta permeabilidad al O₂ y baja al CO₂. Esto, unido a la baja velocidad de respiración de estas verduras, puede haber propiciado que la modificación de gases dentro del envase se haya realizado lentamente, existiendo un porcentaje mayor de O₂ que de CO₂ a lo largo de todo el almacenamiento en refrigeración, lo que ha favorecido el crecimiento de una flora aerobia (*B. cereus*, microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos) frente a un menor crecimiento de una flora anaerobia (*L. monocytogenes* y *C. perfringens*) cuya velocidad de crecimiento estaría ralentizada aunque no eliminada. Por ello, creemos que tanto el papel celofán como el LDPE y el LLDPE son materiales de envasado muy adecuados para IV Gama siempre que haya un estricto control de la temperatura de almacenamiento en refrigeración en torno a los 4-5 °C.

7) A raíz de este trabajo concluimos que, dentro de los factores que favorecen el crecimiento de microorganismos (especialmente de aquéllos como *L. monocytogenes* y *B. cereus* por su capacidad de formar biofilms sobre superficies vivas), los peciolos de las verduras como espinacas, grelos, acelgas, rúcula y canónigos (independientemente de la Gama alimentaria) deberían de ser tenidos en consideración como una parte del vegetal más susceptible a producir una enfermedad de transmisión alimentaria, especialmente si estas verduras y sus peciolos se consumen en preparaciones culinarias sin tratamiento térmico como ensaladas, batidos verdes, etc.

6. Bibliografía

1. Aase, B.; Sundheim, G.; Langsrud, S.; Rørvik, L.M. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *62*, 57-63.
2. Abadias, M.; Usall, J.; Anguera, M.; Solsona, C.; Viñas, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *123*, 121-9
3. Agata, N.; Ohta, M.; Mori, M.; Isobe, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *129*, 17-20.
4. Akbas, M.Y.; Olmez, H. Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut Iceberg lettuce. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 2609-2616.
5. Alexandre, E.M.C.; Brandão, T.R.S.; Silva, C.L.M. Assessment of the impact of hydrogen peroxide solutions on microbial loads and quality factors of red bell peppers, strawberries and watercress. *Food Control* **2012**, *27*, 362-368.
6. Alexandre, E.M.C.; Santos-Pedro, D.M.; Brandão, T.R.S.; Silva, C.L.M. Influence of aqueous ozone, blanching and combined treatments on microbial load of red bell peppers, strawberries and watercress. *J. Food Eng.* **2011**, *105*, 277-282.
7. Alexandre, E.M.C.; Brandão, T.R.S.; Silva, C.L.M. Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. *J. Food Eng.* **2012**, *108*, 417-426.
8. Al-Haddad, K.S.H.; Al-Qassemi, R.A.S.; Robinson, R.K. The use of gaseous ozone and gas packaging to control populations of *Salmonella infantis* and *Pseudomonas aeruginosa* on the skin of chicken portions. *Food Control* **2005**, *16*, 405-410.
9. Allende, A.; Tomás-Barberán, F.A.; Gil, M.I. Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 513-519.
10. Arienzo, A.; Murgia, L.; Fraudentali, I.; Gallo, V.; Angelini, R.; Antonini, G. Microbiological Quality of Ready-to-Eat Leafy Green Salads during Shelf-Life and Home-Refrigeration. *Foods* **2020**, *9*, 1421.

11. Artés, F.; Gómez, P.; Aguayo, E.; Escalona, V.; Artés-Hernández, F. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *51*, 287-296.
12. Artés, F.; Allende, A. Minimal Processing of Fresh Fruit, Vegetables, and Juices. Emerging Technologies for Food Processing (Second Edition), Academic Press **2014**, 583-597.
13. Arvanitoyannis, I.; Dimitrios, A.; Papa, E.A.; Gkagtzis, D.C. Microbial and sensory quality of “Lollo verde” lettuce and rocket salad stored under active atmosphere packaging. *Anaerobe* **2011**, *17*, 307-309.
14. Arvanitoyannis, I. Modified atmosphere and active packaging technologies. CRC Press INC **2012**.
15. Ayala-Zavala, J.F.; González, G.A. Use of additives to preserve the quality of fresh-cut fruits and vegetables. CRC Press. Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing **2010**, 231-254.
16. Barak, J.D.; Kramer, L.C.; Hao, L.Y. Colonization of tomato plants by *Salmonella enterica* is cultivar dependent, and type trichomes are preferred colonization sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 498-504.
17. Baur, S.; Klaiber, R.; Wei, H.; Hammes, W.P.; Carle, R. Effect of temperature and chlorination of pre-washing water on shelf-life and physiological properties of ready-to-use Iceberg lettuce. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2005**, *6*, 171-182.
18. Beltrán, D.; Selma, M.V.; Tudela, J.A.; Gil, M.I. Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biol. Technol.* **2005**, *37*, 37-46.
19. Ben-Yehoshua, S.; Mercier, J. UV irradiation, biological agents, and natural compounds for controlling postharvest decay in fresh fruits and vegetables. In S. Ben-Yehoshua (Ed.), *Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality* **2005**, 265-299. Taylor & Francis Group, LLC.
20. Berger, C.N.; Sodha, S.V.; Shaw, R.K.; Griffin, P.M.; Pink, D.; Hand, P.; Frankel, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 2385-2397.
21. Beuchat, L.R. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review. *Food Safety Unit*, World Health Organisation, WHO/FSF/FOS/98.2, **1998**, 42.

22. Beuchat, L.R.; Brackett, R.E. Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* on Lettuce as Influenced by Shredding, Chlorine Treatment, Modified Atmosphere Packaging and Temperature. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 755-758.
23. Bodbodak, S.; Moshfeghifar, M. Advances in modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Eco-Friendly Technology for Postharvest Produce Quality*, Ed. Elsevier (Academic Press) **2016**, 127-183.
24. Boun, H.R.; Huxsoll, C.C. Control of Minimally Processed Carrot (*Daucus carota*) Surface Discoloration Caused by Abrasion Peeling. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 416-418.
25. Branda, S.S.; Vik, S.; Friedman, L.; Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 20-26.
26. Brandl, M.T.; Amundson, R. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2298-2306.
27. Brummell, D.A.; Harpster, M.H.; Civello, P.M.; Palys, J.M.; Bennett, A.B.; Dunsmuir, P. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* **1999**, *11*, 2203-2216.
28. Calónico, C.; Delfino, V.; Pesavento, G.; Mundo, M.; Lo Nostro, A. Microbiological Quality of Ready-to-eat Salads from Processing Plant to the Consumers. *J. Food. Nutr. Res.* **2019**, *7*, 427-434.
29. Callejón, R.M.; Rodríguez-Naranjo, M.I.; Úbeda, C.; Hornedo-Ortega, R.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European Union: trends and causes. *Foodborne Pathog. Dis.* **2015**, *12*, 32-38.
30. Camacho, S. Ensayos microbiológicos. Ed. Síntesis **2014**.
31. Campbell-Platt, G. Ciencia y tecnología de los alimentos. Ed. Acribia **2016**.
32. Cao, X.L.; Corriveau, J.; Popovic, S. Bisphenol A in Canned Food Products from Canadian Markets. *J. Food Prot.* **2010**, *73*, 1085-1089.
33. Carlin, F. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 177-182.
34. Casp, A. Tecnología de los alimentos de origen vegetal. Ed. Síntesis **2014**.

35. Castro-Ibáñez, I.; Gil, M.I.; Allende, A. Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2017**, *85*, 284-292.
36. Ceuppens, S.; Timmery, S.; Mahillon, J.; Uyttendaele, M.; Boon, N. Small *Bacillus cereus* ATCC 14579 subpopulations are responsible for cytotoxin K production. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *114*, 899-906.
37. Chen, M.; Wu, Q.; Zhang, J.; Yan, Z.; Wang, J. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. *Food Control* **2014**, *38*, 1-7.
38. Chitarra, W.; Decastelli, L.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from growth substrate into leaves of salad plants and basil grown in soil irrigated with contaminated water. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *189*, 139-145.
39. Comisión Europea. Perfil de riesgo sobre la contaminación microbiológica de frutas y verduras consumidas crudas. Informe del Comité Científico de la Alimentación Humana, SCF/CS/FMH/SURF/ **2002**.
40. Cui, X.; Shang, Y.; Shi, Z.; Xin, H.; Cao, W. Physicochemical properties and bactericidal efficiency of neutral and acidic electrolyzed water under different storage conditions. *J. Food Eng.* **2009**, *91*, 582-586.
41. Dainelli, D.; Gontard, N.; Spyropoulos, D.; Zondervan-van den Beuken, E.; Tobback, P. Active and intelligent food packaging: Legal aspects and safety concerns. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 103-112.
42. de Azeredo, H.M.C. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1240-1253.
43. De Giusti, M.; Aurigemma, C.; Marinelli, L.; Tufi, D.; De Medici, D.; Di Pasquale, S.; De Vito, C.; Boccia, A. The evaluation of the Microbiological safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 996-1006.
44. Devajaran, N.; McGarvey, J.A.; Scow, K.; Jones, M.S.; Lee, S.; Samaddar, S.; Schmidt, R.; Tran, T.D.; Karp, D.S. Cascading effects of composts and cover crops on soil chemistry, bacterial communities and the survival of foodborne pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 1564-1577.

45. Dickin, S.K.; Schuster-Wallace, C.J.; Qadir, M.; Pizzacalla, K. A Review of Health Risks and Pathways for Exposure to Wastewater Use in Agriculture. *Environ. Health Perspect.* **2016**, *124*, 900-909.
46. Duncan, T.V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *363*, 1-24.
47. Dunn, C.G. The quaternary ammonium compounds and their uses in the food industry. Academic Press. *Advances in Food Research*, **1949**, *2*, 117-200.
48. Elhariry, H.M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1266-1274.
49. Elhariry, H.M. Biofilm formation by endospore-forming bacilli on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions. *Glob. J. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *3*, 69-78.
50. Ells, T.C.; Hansen, L.T. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *111*, 34-42.
51. Ennos, A.R.; Spatz, H.C.; Speck, T. The functional morphology of the petioles of the banana, *Musa textiles*. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 2085-2093.
52. Erickson, M.C. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2012**, *3*, 283-310.
53. European Food Safety Authority (EFSA). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA J.* **2016**; *14* (7):4524, 1-93.
54. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. *EFSA J.* **2005**, *199*, 1-65.
55. Faisal, T.R.; Abad, E.M.K.; Hristozov, N.; Pasini, D. The Impact of Tissue Morphology, Cross-Section and Turgor Pressure on the Mechanical Properties of the Leaf Petiole in Plants. *J. Bionic Eng.* **2010**, *7*, S11-S23.
56. Fan, K.; Weisenhorn, P.; Gilbert, J.A.; Chu, H. Wheat rhizosphere harbors a less complex and more stable microbial co-occurrence pattern than bulk soil. *Soil Biol. Biochem.* **2018**, *125*, 251-260.

57. Faour-Klingbeil, D.; Murtada, M.; Kuri, V.; Todd, E.C.D. Understanding the routes of contamination of ready-to-eat vegetables in the Middle East. *Food Control* **2016**, *62*, 125-133.
58. Faour-Klingbeil, D.; Todd, E.C.D.; Kuri, V. Microbiological quality of ready-to-eat fresh vegetables and their link to food safety environment and handling practices in restaurants. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2016**, *74*, 224-233.
59. Fernández, A.; Noriega, E.; Thompson, A. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiol.* **2013**, *33*, 24-29.
60. Fernández, A.; Shearer, N.; Wilson, D.R.; Thompson, A. Effect of microbial loading on the efficiency of cold atmospheric gas plasma inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *152*, 175-180.
61. Fernández-Sabé, N.; Cervera, C.; López-Medrano, F.; Llano, M.; Sáez, E.; Len, O.; Fortún, J.; Blanes, M.; Laporta, R.; Torre-Cisneros, J.; Gavalda, J.; Muñoz, P.; Fariñas, M.C.; Aguado, J.M.; Moreno, A.; Carratalà, J. Risk factors, clinical features, and outcomes of listeriosis in solid-organ transplant recipients: a matched case - control study. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 1153-1159.
62. Fisher, I.S.T.; Threlfall, E.J. The Enter-net and Salm-gene databases of food-borne bacterial pathogens causing human infections in Europe and beyond: an international collaboration in surveillance and the development of intervention strategies. *Epidemiol. Infect.* **2005**, *133*, 1-7.
63. Food Protection Training Manual. The New York City Department of Health and Mental Hygiene **2013**.
64. García Iglesias, E.; Cabezas, L.G.; Fernández Nuevo, J.L. Tecnología De Envasado En Atmosferas Protectoras **2006**.
65. Gil, Á.; Artacho, R.; Ruiz, M.D. Tratado de nutrición (3^a Ed). Ed. Médica Panamericana **2017**.
66. Gil, M.; Gorny, J. Guía de seguridad alimentaria para la industria de productos vegetales frescos cortados **2003**.
67. Gómez, P.; Ferrer, M.A.; Fernández Trujillo, J.P.; Calderón, A.; Artés, F.; Egea-Cortines, M.; Weiss, J. Structural changes, chemical composition and antioxidant activity of cherry tomato fruits (cv. Micro-Tom) stored under optimal and chilling conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 1543-1551.

68. Gómez-López, V.M.; Devlieghere, F.; Bonduelle, V.; Debevere, J. Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 460-470.
69. González-Buesa, J.; Page, N.; Kaminsky, C.; Riser, E.T.; Beaudry, R.; Almenar, E. Effect of non-conventional atmospheres and bio-based packaging on the quality and safety of *Listeria monocytogenes*-inoculated fresh-cut celery (*Apium graveolens* L.) during storage. *Postharvest Biol. Technol.* **2014**, *93*, 29-37.
70. Graça, A.; Abadias, M.; Salazar, M.; Nunes, C. The use of electrolyzed water as a disinfectant for minimally processed apples. *Postharvest Biol. Technol.* **2011**, *61*, 172-177.
71. Guerrero, I. Microbiología de los alimentos. Ed. Limusa **2014**.
72. Guerrero-Beltrán, J.A.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Swanson, B.G. High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products. *Food Rev. Int.* **2005**, *21*, 411-425.
73. Guinebretiere, M.H.; Girardin, H.; Dargaignaratz, C.; Carlin, F.; Nguyen-The, C. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *82*, 223-232.
74. Gutiérrez-Rodríguez, E.; Gundersen, A.; Sbodio, A.; Koike, S.; Suslow, T.V. Evaluation of post-contamination survival and persistence of applied attenuated *E. coli* O157:H7 and naturally-contaminating *E. coli* O157:H7 on spinach under field conditions and following postharvest handling. *Food Microbiol.* **2019**, *77*, 173-184.
75. Gu, G.; Ottesen, A.; Bolten, S.; Luo, Y.; Rideout, S.; Nou, X. Microbiome convergence following sanitizer treatment and identification of sanitizer resistant species from spinach and lettuce rinse water. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *318*, 108458.
76. Heimdal, H.; Kühn, B.F.; Poll, L.; Larsen, L.M. Biochemical Changes and Sensory Quality of Shredded and MA-Packaged Iceberg Lettuce. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 1265-1268.
77. Hua, G.H.; Reckhow, D.A. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. *Water Res.* **2007**, *41*, 1667-1678.
78. Huang, Y.R.; Hung, Y.C.; Hsu, S.Y.; Huang, Y.W.; Hwang, D.F. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*, **2008**, *19*, 329-345.

79. Hussain, M.S.; Kwon, M.; Park, E.J.; Seheli, K.; Huque, R.; Oh, D.H. Disinfection of *Bacillus cereus* biofilms on leafy green vegetables with slightly acidic electrolyzed water ultrasound and mild heat. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2019**, *116*, 108582.
80. Hwang, E.S.; Cash, J.N.; Zabik, M.J. Ozone and hydrogen peroxyacetic acid treatment to reduce or remove EBDCs and ETU residues in a solution. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5689-5694.
81. Ingham, S.C.; Fanslau, M.A.; Engel, R.A.; Breuer, J.F.; Breuer, J.E.; Wright, T.H.; Reith-Rozelle, J.K.; Zhu, J. Evaluation of fertilization-to-planting and fertilization-to-harvest intervals for safe use of noncomposted bovine manure in Wisconsin vegetable production. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 1134-1142.
82. Iwu, C.D.; Okoh, A.I. Preharvest Transmission Routes of Fresh Produce Associated Bacterial Pathogens with Outbreak Potentials: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 4407.
83. Jay-Russell, M.T. What is the risk from wild animals in food-borne pathogen contamination of plants? *CAB Rev.* **2013**, *8*, 1-16.
84. Jeddi, M.Z.; Yusenian, M.; Gorji, M.E.; Noori, N.; Pourmand, M.R.; Khaniki, G.R.J. Microbial Evaluation of Fresh, Minimally-processed Vegetables and Bagged Sprouts from Chain Supermarkets. *J. Health Popul. Nutr.* **2014**, *32*, 391-399.
85. Kerry, J.P.; O'Grady, M.N.; Hogan, S.A. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 113-130.
86. Keskinen, L.A.; Burke, A.; Annous, B.A. Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 134-140.
87. Kevany, B.M.; Tieman, D.M.; Taylor, M.G.; Cin, V.D.; Klee, H.J. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant J.* **2007**, *51*, 458-467.
88. Kim, C.; Hung, Y.C.; Brackett, R.E. Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 19-24.

89. Klockow, P.A.; Keener, K.M. Corrigendum to “Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system”. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2010**, *43*, 1471.
90. Kozak, G.K.; MacDonald, D.; Landry, L.; Farber, J.M. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 173-183.
91. Laboissière, L.H.E.S.; Deliza, R.; Barros-Marcellini, A.M.; Rosenthal, A.; Camargo, L.M.A.Q.; Junqueira, R.G. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2007**, *8*, 469-477.
92. Li, K.; Weidhaas, J.; Lemonakis, L.; Khouryieh, H.; Stone, M.; Jones, L.; Shen, C. Microbiological quality and safety of fresh produce in West Virginia and Kentucky farmers’ markets and validation of a post-harvest washing practice with antimicrobials to inactivate *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2017**, *79*, 101-108.
93. Lin, L.; Abdel-Samie, M.; Cui, H. Novel Packaging Systems in Food. Reference Module in Food Science. Ed. Elsevier **2018**.
94. Little, C.L.; Gillespie, I.A. Prepared salads and public health. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1729-1743.
95. López Gálvez, G.; Peiser, G.; Nie, X.; Cantwell, M. Quality changes in packaged salad products during storage. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1997**, *205*, 64-72.
96. Lu, Z.; Yu, Z.; Gao, X.; Lu, F.; Zhang, L. Preservation effects of gamma irradiation on fresh-cut celery. *J. Food Eng.* **2005**, *67*, 347-351.
97. Lubber, P.; Crerar, S.; Dufour, C.; Farber, J.; Datta, A.; Todd, E.C.D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization - Recommendations for improved prevention and control. *Food Control* **2011**, *22*, 1535-1549.
98. Lund, B.M.; O’Brien, S.J. The occurrence and prevention of foodborne Disease in vulnerable people. *Foodborne Pathog. Dis.* **2011**, *8*, 961-973.
99. Macieira, A.; Barbosa, J.; Teixeira, P. Food Safety in Local Farming of Fruits and Vegetables. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9733.

100. Manganaris, G.A.; Vasilakakis, M.; Diamantidis, G.; Mignani, I. Effect of in-season calcium applications on cell wall physicochemical properties of nectarine fruit (*Prunus persica* var. nectarina Ait. Maxim) after harvest or cold storage. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2597-2602.
101. Manvell, P.M.; Ackland, M.R. Rapid detection of microbial growth in vegetable salads at chill and abuse temperatures. *Food Microbiol.* **1986**, *3*, 59-66.
102. Martin-Diana, A.B.; Rico, D.; Barry-Ryan, C.; Frias, J.M.; Mulcahy, J.; Henahan, G.T.M. Comparison of calcium lactate with chlorine as a washing treatment for fresh-cut lettuce and carrots: Quality and nutritional parameters. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 2260-2268.
103. Martínez-Sánchez, A.; Luna, M.C.; Selma, M.V.; Tudela, J.A.; Abad, J.; Gil, M.I. Baby-leaf and multi-leaf of green and red lettuces are suitable raw materials for the fresh-cut industry. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**, *63*, 1-10.
104. Mataix, J. Tratado de Nutrición y Alimentación **2009**.
105. McCollum, J.T.; Cronquist, A.B.; Silk, B.J.; Jackson, K.A.; O'Connor, K.A.; Cosgrove, S.; Gossack, J.P.; Parachini, S.S.; Jain, N.S.; Ettestad, P.; Ibraheem, M.; Cantu, V.; Joshi, M.; DuVernoy, T.; Fogg Jr, N.W.; Gorny, J.R.; Mogen, K.M.; Spires, C.; Teitell, P.; Joseph, L.A.; Tarr, C.L.; Imanishi, M.; Neil, K.P.; Tauxe, R.V.; Mahon, B.E. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 944-953.
106. Miller, F.A.; Silva, C.L.M.; Brandão, T.R.S. A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Eng. Rev.* **2013**, *5*, 77-106.
107. Mir, S.; Shah, M.; Mir, M.; Dar, B.; Greiner, R.; Roohinejad, S. Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. *Food Control* **2018**, *85*, 235-244.
108. Misra, N.N.; Tiwari, B.K.; Raghavarao, K.S.M.S.; Cullen, P.J. Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Eng. Rev.* **2011**, *3*, 159-170.
109. Mogren, L.; Windstam, S.; Boqvist, S.; Vågsholm, I.; Söderqvist, K.; Rosberg, A.K.; Lindén, J.; Mulaosmanovic, E.; Karlsson, M.; Uhlig, E.; Håkansson, A.; Alsanius, B. The Hurdle Approach-A Holistic Concept for Controlling Food Safety Risks Associated With Pathogenic Bacterial Contamination of Leafy Green Vegetables. A Review. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1965.

110. Montville, R.; Schaffner, D. Monte Carlo simulation of pathogen behavior during the sprout production process. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 746-753.
111. Moragas, M.; Válcárcel, S.; Chirapozu, A.; De Pablo, B. Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados (superficies, aguas diferentes de consumo, aire, subproductos) y otros parámetros fisicoquímicos de interés sanitario. Departamento de Salud Gobierno Vasco **2017**, 54.
112. Moreira, M.R.; Ponce, A.G.; del Valle, C.E.; Ansorena, R.; Roura, S.I. Effects of abusive temperatures on the postharvest quality of lettuce leaves: Ascorbic acid loss and microbial growth. *J. Appl. Hort.* **2006**, *8*, 109-113.
113. Morris, C.E.; Monier, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2003**, *41*, 429-453.
114. Nagar, V.; Shashidhar, R.; Bandekar, J.R. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *4*, 745-752.
115. Neher, D.A.; Cutler, A.J.; Weicht, T.R.; Sharma, M.; Millner, P.D. Compost of poultry litter or dairy manure differentially affect survival of enteric bacteria in fields with spinach. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 1910-1922.
116. Nguyen-The, C. Biological hazards in processed fruits and vegetables - Risk factors and impact of processing techniques. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2012**, *49*, 172-177.
117. Niemira, B.A. Cold plasma decontamination of foods. In M.P. Doyle, & T.R. Klaenhammer (Eds.), *Annual review of food science and technology* **2012**, *3*, 125-142. Palo Alto, USA Annual Reviews.
118. Niklas, K.J. A mechanical perspective on foliage leaf form and function. *New Phytol.* **1999**, *143*, 19-31
119. Oey, I.; Lille, M.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 320-328.
120. Okada, Y.; Monden, S.; Igimi, S.; Yamamoto, S. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in imported ready-to-eat foods in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2012**, *74*, 373-375.
121. Okafo, C.N.; Umoh, V.J.; Galadima, M. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. *Sci. Total Environ.* **2003**, *311*, 49-56.

122. Olaimat, A.N.; Holley, R.A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol.* **2012**, *32*, 1-19.
123. Oliveira, M.; Viñas, I.; Usall, J.; Anguera, M.; Abadias, M. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *156*, 133-140.
124. Oliveira, M.; Usall, J.; Solsona, C.; Alegre, I.; Viñas, I.; Abadias, M. Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded “Romaine” lettuce. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 375-380.
125. Ölmez, H.; Kretzschmar, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2009**, *42*, 686-693.
126. Ölmez, H.; Temur, S.D. Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2010**, *43*, 964-970.
127. Oner, M.E.; Walker, P.N.; Demirci, A. Effect of in-package gaseous ozone treatment on shelf life of blanched potato strips during refrigerated storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 406-412.
128. Ortega, E.; Muñoz, E. Alimentación & bebidas (Food & Beverages). Ed. Aranzadi **2018**.
129. Ospina, S.M.; Cartagena, J.R. Modified atmosphere: an alternative for food preservation. *Rev. Lasallista Investig.* **2008**, *5*, 112-123.
130. Palgan, I.; Caminiti, I.M.; Muñoz, A.; Noci, F.; Whyte, P.; Morgan, D.J.; Cronin, D.A.; Lyng, J.G. Effectiveness of high intensity light pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 14-20.
131. Parish, M.E.; Beuchat, L.R.; Suslow, T.V.; Harris, L.J.; Garrett, E.H.; Farber, J.N.; Busta, F.F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, *2*, 161-173.
132. Park, C.M.; Beuchat, L.R. Evaluation of sanitizers for killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and naturally occurring microorganisms on cantaloupes, honeydew melons, and asparagus. *Dairy Food Environ. Sanit.* **1999**, *19*, 842-847.

- 133.Pascual, A.; Llorca, I.; Canut, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, S29-S35.
- 134.Patel, J.; Sharma, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *139*, 41-47.
- 135.Pataro, G.; Muñoz, A.; Palgan, I.; Noci, F.; Ferrari, G.; Lyng, J.G. Bacterial inactivation in fruit juices using a continuous flow pulsed light (PL) system. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1642-1648.
- 136.Pirovani, M.E.; Güemes, D.R.; Piagentini, A.M.; Di Pentima, J.H. Storage quality of minimally processed cabbage packaged in plastic films. *J. Food Qual.* **1997**, *20*, 381-389.
- 137.Prakash, A.; Inthajak, P.; Huibregtse, H.; Caporaso, F.; Foley, D.M. Effects of low-dose gamma irradiation and conventional treatments on shelf life and quality characteristics of diced celery. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1070-1075.
- 138.Rahman, S.M.E.; Jin, Y.G.; Oh, D.H. Combination treatment of alkaline electrolyzed water and citric acid with mild heat to ensure microbial safety, shelf-life and sensory quality of shredded carrots. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 484-491.
- 139.Ramos, B.; Miller, F.A.; Brandão, T.R.S.; Teixeira, P.; Silva, C.L.M. Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innov. Food Sci.* **2013**, *20*, 1-15.
- 140.Ramos-Villaruel, A.Y.; Aron-Maftei, N.; Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. Influence of spectral distribution on bacterial inactivation and quality changes of fresh-cut watermelon treated with intense light pulses. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**, *69*, 32-39.
- 141.Randazzo, C.L.; Pitino, I.; Scifo, G.O.; Caggia, C. Biopreservation of minimally processed Iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control* **2009**, *20*, 756-763.
- 142.Ray, B.; Bhunia, A. Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. Ed. McGraw-Hill **2010**.
- 143.Real Decreto 168/1985, de 6 de febrero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre Condiciones Generales de Almacenamiento Frigorífico de Alimentos y Productos Alimentarios. *Boletín Oficial del Estado*, 06 de febrero de **1985**, núm. 39, 3733-3737.

144. Real Decreto 176/2013, de 8 de marzo, por el que se derogan total o parcialmente determinadas reglamentaciones técnico-sanitarias y normas de calidad referidas a productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado*, 08 de marzo de **2013**, núm. 76, 24494-24505.
145. Reglamento Delegado (UE) n.º 1062/2014 de La Comisión, de 4 de agosto de 2014, relativo al programa de trabajo para el examen sistemático de todas las sustancias activas existentes contenidas en los biocidas que se mencionan en el Reglamento (UE) n.º 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. L 294, de 04 de agosto de **2014**, 1-34.
146. Reglamento Delegado (UE) n.º 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y al uso de los biocidas. *Diario oficial de la Unión Europea*, núm. L 167, de 22 de mayo de **2012**, 1-123.
168. Reglamento (CE) n.º 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. L 322, de 7 de diciembre de **2007**, 12-29.
147. Rekhy, R.; McConchie, R. Promoting consumption of fruit and vegetables for better health. Have campaigns delivered on the goals?. *Appetite*, **2014**, 79, 113-123.
148. Restuccia, D.; Spizzirri, U.G.; Parisi, O.I.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Iemma, F., Puoci, F.; Vinci, G.; Picci, N. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control* **2010**, 21, 1425-1435.
149. Rico, D.; Martín-Diana, A.B.; Barat, J.M.; Barry-Ryan, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, 18, 373-386.
150. Rico, D.; Martín-Diana, A.B.; Barry-Ryan, C.; Frías, J.M.; Henahan, G.T.M.; Barat, J.M. Use of neutral electrolysed water (EW) for quality maintenance and shelf-life extension of minimally processed lettuce. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2008**, 9, 37-48.
151. Rivero, G.A.; Torres, H.A.; Rolston, K.V.I.; Kontoyannis, D.P. *Listeria monocytogenes* infection in patients with cancer. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, 47, 393-398.

152. Robertson, G.L. Food Packaging: Principles and Practice **2013**.
153. Rodgers, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *12*, 276-284.
154. Rodgers, S. Novel applications of live bacteria in food services: Probiotics and protective cultures. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 188-197.
155. Rodríguez-Aguilera, R.; Oliveira, J.C.; Montanez, J.C.; Mahajan, P.V. Gas exchange dynamics in modified atmosphere packaging of soft cheese. *J. Food Eng.* **2009**, *95*, 438-445.
156. Rosa, C.; Sapata, M.; Guerra, M.M. Chemical and sensory characteristics and microbiological safety of fresh finely chopped parsley packed in modified atmosphere. *Food Control* **2007**, *18*, 1008-1012.
157. Rossmore, H.W. Disinfection, sterilization and preservation. In: S. S. Block, Ed., *Nitrogen compounds* (5^a edición) **2001**. Lippincott Williams & Wilkins.
158. Roy, N.; Saha, N.; Kitano, T.; Saha, P. Biodegradation of PVP-CMC hydrogel film: A useful food packaging material. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 346-353.
159. Ryu, J.H.; Kim, H.; Beuchat, L.R. Spore formation by *Bacillus cereus* in broth as affected by temperature, nutrient availability, and manganese. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 1734-1738.
160. Safdar, A.; Papadopoulos, E.B.; Armstrong, D. Listeriosis in recipients of allogeneic blood and marrow transplantation: thirteen year review of Disease characteristics, treatment outcomes and a new association with human cytomegalovirus infection. *Bone Marrow Transplant.* **2002**, *29*, 913-916.
161. Saftner, R.A.; Bai, J.H.; Abbott, J.A.; Lee, Y.S. Sanitary dips with calcium propionate, calcium chloride, or a calcium amino acid chelate maintain quality and shelf stability of fresh-cut honeydew chunks. *Postharvest Biol. Technol.* **2003**, *29*, 257-269.
162. Sagoo, S.K.; Little, C.L.; Mitchell, R.T. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *6*, 434-439.
163. Sagong, H.G.; Lee, S.Y.; Chang, P.S.; Heu, S.; Ryu, S.; Choi, Y.J.; Kang, D.H. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 287-292.

- 164.Sant´Ana, A.S.; Barbosa, M.S.; Destro, M.T.; Landgraf, M.; Franco, B.D.G.M. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperatura conditions during shelf-life. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 52-58.
- 165.Sant´Ana, A.S.; Igarashi, M.C.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Franco, B.D. Prevalence, populations and pheno-and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *155*, 1-9.
- 166.Santos, M.I.; Cavaco, A.; Gouveia, J.; Novais, M.R.; Nogueira, P.J.; Pedroso, L.; Ferreira, M.A.S.S. Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control* **2012**, *23*, 275-281.
- 167.Santos, J.; Oliva-Teles, M.T.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M.B.P.P. Multi-elemental analysis of ready-to-eat “baby leaf” vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *151*, 311-316.
- 168.Sapers, G.M.; Jones, D.M. Improved sanitizing treatments for fresh tomatoes. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 252-256.
- 169.Saxena, A.; Bawa, A.S.; Raju, P.S. Use of modified atmosphere packaging to extend shelf-life of minimally processed jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) bulbs. *J. Food Eng.* **2008**, *87*, 455-466.
- 170.Schlüter, O.; Ehlbeck, J.; Hertel, C.; Habermeyer, M.; Roth, A.; Engel, K.H.; Holzhauser, T.; Knorr, D.; Eisenbrand, G. Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 920-927.
- 171.Schlüter, O.; Foerster, J.; Geyer, M.; Knorr, D.; Herppich, W. Characterization of high-hydrostatic-pressure effects on fresh produce using chlorophyll fluorescence image analysis. *Food Bioproc. Tech.* **2009**, *2*, 291-299.
- 172.Selma, M.V.; Allende, A.; López-Gálvez, F.; Conesa, M.A.; Gil, M.I. Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 809-814.
- 173.Settanni, L.; Corsetti, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *121*, 123-138.
- 174.Sharma, R.K.; Agrawal, M.; Marshall, F.M. Heavy metals in vegetables collected from production and market sites of a tropical urban area of India. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 583-591.

175. Shepherd, M.W.; Liang, P.; Jiang, X.; Doyle, M.P.; Erickson, M.C. Microbiological analysis of compost produced on South Carolina poultry farms. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 2067-2076.
176. Sinde, E.; Carballo, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* **2000**, *17*, 439-447.
177. Singh, A.; Walia, D.; Batra, N. Fresh-Cut Fruits: Microbial Degradation and Preservation. *Microbial Contamination and Food Degradation*. Ed. Elsevier **2018**.
178. Singla, R.; Ganguli, A.; Ghosh, M. An effective combined treatment using malic acid and ozone inhibits *Shigella* spp. on sprouts. *Food Control* **2011**, *22*, 1032-1039.
179. Sokunrotanak, S.; Park, S.Y.; Jahid, I.K.; Ha, S.D. Reduction effect of the selected chemical and physical treatments to reduce *L. monocytogenes* biofilms formed on lettuce and cabbage. *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 484-491.
180. Soliva-Fortuny, R.C.; Martin-Belloso, O. New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14*, 341-353.
181. Solomon, E.B.; Sharma, M. Microbial Attachment and Limitations of Decontamination Methodologies. In: Spers, G. M., Solomon, E. B., Matthews, K. R., editors. *The Produce Contamination Problem: Causes and Solutions*. New York, N.Y.: Academic Press **2009**, 21-45.
182. Stephan, R.; Althaus, D.; Kiefer, S.; Lehner, A.; Hatz, C.; Schmutz, C.; Jost, M.; Gerber, N.; Baumgartner, A.; Hächler, H.; Mäusezahl-Feuz, M. Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013-2014. *Food Control* **2015**, *57*, 14-17.
183. Storelli, M.M.; Barone, G.; Cuttone, G.; Giungato, D.; Garofalo, R. Occurrence of toxic metals (Hg, Cd and Pb) in fresh and canned tuna: Public health implications. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 3167-3170.
184. Surdu, I.; Vătuuiu, D.; Jurcoane, S.; Olteanu, M.; Vătuuiu, I. The antimicrobial activity of neutral electrolyzed water against germs and fungi from feedstuffs, eggshells and laying hen house. *Rom. Biotechnol. lett.* **2018**, *23*, 13607-13614.

185. Suruchi, K.; Pankaj, K. Assessment of Heavy Metal Contamination in Different Vegetables Grown in and Around Urban Areas. *Res. J. Environ. Toxicol.* **2011**, 162-179.
186. Szczech, M.; Kowalska, B.; Smolińska, U.; Maciorowski, R.; Oskiera, M. Michalska, A. Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, 286, 155-161.
187. Takeshita, K.; Shibato, J.; Sameshima, T.; Fukunaga, S.; Isobe, S.; Arihara, K.; Itoh, M. Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 85, 151-158.
188. To, M.S.; Favrin, S.; Romanova, N.; Griffiths, M.W. Post daptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 5258-5264.
189. Todd, E.C.V.; Notermans, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2011**, 22, 1484-1490.
190. Trias, R.; Badosa, E.; Montesinos, E.; Bañeras, L. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* **2008a**, 127, 91-98.
191. Trias, R.; Bañeras, L.; Badosa, E.; Montesinos, E. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2008b**, 123, 50-60.
192. Uyttendaele, M.; Ceuppens, S.; El-Tahan, F. Microbiological safety of strawberries and lettuce for domestic consumption in Egypt. *J. Food. Process. Preserv.* **2014**, 5, 308.
193. Vicente, A.R.; Pineda, C.; Lemoine, L.; Civello, P.M.; Martínez, G.A.; Chaves, A.R. UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharvest Biol. Technol.* **2005**, 35, 69-78.
194. Villalón-Mir, M. Tratado de higiene y seguridad alimentaria en restauración. Editorial Técnica Avicam **2016**.
195. Villegas, A. Preelaboración y conservación de vegetales y setas. Maquinaria, equipos básicos, materias primas y regeneración de alimentos. Ed. Ideaspropias **2014**.
196. Viswanathan, P.; Kaur, R. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2001**, 203, 205-213.

197. Wadamori Y.; Gooneratne, R.; Hussain, M.A. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 1396-1403.
198. Wang, R.X.; Nian, W.F.; Wu, H.Y.; Feng, H.Q.; Zhang, K.; Zhang, J.; Zhu, W.D.; Becker, K.H.; Fang, J. Atmospheric-pressure cold plasma treatment of contaminated fresh fruit and vegetable slices: Inactivation and physiochemical properties evaluation. *Eur. Phys. J. D.* **2012**, *66*, 1-7.
199. Warriner, K.; Huber, A.; Namvar, A.; Fan, W.; Dunfield, K. Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Adv. Food Nutr. Res.* **2009**, *57*, 155-208.
200. Weiss, J.; Egea-Cortines, M. Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as marker to study cold acclimation. *J. Appl. Genet.* **2009**, *50*, 311-319.
201. Weissinger, W.R.; Chantarapanont, W.; Beuchat, L.R. Survival and growth of *Salmonella* Baildon in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *62*, 123-131.
202. Willocx, F. Evolution of microbial and visual quality of minimally processed foods: a case study on the product life cycle of cut endive. Doctoral thesis. Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium.
203. Xie, Y.; Brecht, J.K.; Abraham, C.E.; Bornhorst, E.R.; Luo, Y.; Monge, A.L.; Vorst, K.; Brown, W. Improving temperature management and retaining quality of fresh-cut leafy greens by retrofitting open refrigerated retail display cases with doors. *J. Food. Eng.* **2020**, *292*, 110271.
204. Yam, K.L.; Lee, D.S. Design of modified atmosphere packaging for fresh produce. *Active Food Packaging*. (Ed) Boston, MA: Springer US, **1995**, 55-73.
205. Zagory, D.; Kader, A.A. Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technol.* **1988**, *42*, 70-77.
206. Zhang, F.Z.; Wagstaff, C.; Rae, A.M.; Sihota, A.K.; Keevil, C.W.; Rothwell, S.D.; Clarkson, G.J.J.; Michelmore, R.W.; Truco, M.J.; Dixon, M.S.; Taylor, G. QTLs for shelf life in lettuce co-locate with those for leaf biophysical properties but not with those for leaf developmental traits. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 1433-1449.

207. Zhou, B.; Luo, Y.; Huang, L.; Fonseca, J.M.; Yan, H.; Huang, J. Determining effects of temperature abuse timing on shelf life of RTE baby spinach through microbial growth models and its association with sensory quality. *Food Control* **2022**, *133*, 108639.
208. Zhuang, R.Y.; Beuchat, L.R. Effectiveness of trisodium phosphate for killing *Salmonella* Montevideo on tomatoes. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *22*, 97-100.

CAPÍTULO III

**INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE DIFERENTES MINERALES
EN HIERBAS AROMÁTICAS DESHIDRATADAS EN EL
CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y OTROS
PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA**

1. Introducción

Los seres vivos están compuestos por elementos químicos que constituyen la materia orgánica (carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno) y por otros que forman parte de esa materia, en pequeñas cantidades, y que son los minerales. Éstos se necesitan en muy pequeñas cantidades pero, aun así, son esenciales para el organismo y han de ser aportados por la dieta (Mataix, 2013).

Los minerales se clasifican según las cantidades que son necesarias para los organismos:

- **Elementos principales o macrominerales:** su ingesta es superior a los 100 mg/día. Destacan el calcio, fósforo, magnesio, sodio, cloro, potasio y azufre. El sodio, el potasio y el cloro son conocidos también como electrolitos (Mataix, 2013).

- **Elementos traza o microminerales:** su ingesta es bastante inferior a 100 mg/día (normalmente $\mu\text{g}/\text{día}$). En este grupo se incluyen el cinc, cobalto, cobre, cromo, flúor, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y yodo. Existen otros elementos traza cuyo papel fisiológico es desconocido aunque se han utilizado de forma terapéutica; son el arsénico, boro, cadmio, níquel, silicio, titanio y vanadio (Mataix, 2013).

Se encuentran de forma muy diversa en el organismo y sus funciones son variadas, ya que intervienen en la regulación enzimática de los procesos metabólicos, contribuyen al mantenimiento de la constancia de los líquidos corporales intra y extracelulares, facilitan el transporte de compuestos esenciales (como la glucosa) (Navarro-Alarcón *et al.*, 2021) a través de la membrana y algunos actúan como formadores de estructuras (huesos y dientes) (Mataix, 2013).

En este capítulo, se describe **la influencia del contenido de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio** presentes en hierbas aromáticas en el crecimiento de *L. monocytogenes* y otros patógenos de transmisión alimentaria.

El **hierro** es el elemento traza más abundante en el organismo e indispensable para la vida de organismos superiores, ya que forma el núcleo de la hemoglobina y la mioglobina (proteínas de transporte y almacenamiento del oxígeno); además, forma parte de gran cantidad de enzimas (generalmente oxidativas). En el organismo, el hierro se encuentra a una concentración de 40-50 mg/kg de peso formando parte de moléculas de hemoglobina (60-70 %), otras hemo proteínas como la mioglobina (10 %) y, el resto, en depósitos unido a la ferritina. Sólo un 1 % se une a la transferrina (a pesar de ello, constituye el pool dinámico más importante) (Muñoz *et al.*, 2005).

El hierro es un oligoelemento mineral necesario para una amplia variedad de funciones biológicas, siendo uno de los nutrientes más investigados y mejor conocidos. Produce la deficiencia nutricional más importante del mundo (anemia), que puede ser prevenida. El mayor riesgo de deficiencia se produce en menores de dos años, adolescentes, embarazadas adolescentes y adultas y personas mayores (Braunstein, 2020). Las recomendaciones son de 8 mg/día en hombres, 18 mg/día en mujeres en edad fértil y 8 mg/día en mujeres menopáusicas (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2002). Las fuentes principales son hígado, vacuno, morcilla, pollo, huevos, leche, arroz, patatas y legumbres.

Respecto al **cinc**, el vocablo proviene del alemán “*Zink*”. Su esencialidad en seres humanos se descubre en la década de los 60 debido a estudios en niños de baja altura, con anemia ferropénica y retardo en la madurez sexual (Irán, Egipto y EEUU). En el organismo la cantidad de cinc es de 2-3 g, acumulándose rápidamente en hígado, páncreas, bazo, riñones y, especialmente, en la glándula prostática del hombre y en el ojo. En hueso y músculo es relativamente elevado pero no se encuentra en equilibrio rápido con el resto del organismo (Moreno, 2000). Las recomendaciones de cinc oscilan entre 3 y 11 mg/día (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2002). Las principales fuente alimentarias son el hígado, carne y ostras crudas.

Por otro lado, la esencialidad del **cobre** en seres humanos se descubre en la década de los 60 (Perú y Chile). La cantidad en el organismo es de 50-100 mg, repartidos entre el músculo (40 %) y el hígado, cerebro, corazón y riñones (60 %). Las recomendaciones oscilan entre 260 y 900 µg/día (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2002). Las fuentes alimentarias son de origen animal (a excepción de la leche), mariscos, vísceras, carnes, frutos secos, etc. En frutas y verduras hay bajo contenido.

En cuanto al **calcio**, es el elemento mineral más abundante en el organismo (1.200 g), representando el 2 % del peso total del cuerpo. Se distribuye formando parte del tejido óseo y los dientes en forma de hidroxapatita (99 %) y de tejidos blandos y fluidos corporales (1 %) (Martínez de Victoria, 2016). Las recomendaciones son de 1.000 mg/día (0-70 años) y 1.200 mg/día (> 70 años) en hombres y 1.000 mg/día (0-50 años) y 1.200 mg/día (> 50 años) en mujeres (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 1998). Las fuentes alimentarias principales son la leche y derivados lácteos, pescados, harinas integrales, frutos secos y legumbres.

Por último, el **magnesio** es el segundo catión del medio intracelular en abundancia y está considerado, al igual que el calcio, como un mineral mayoritario implicado en el metabolismo óseo. Se distribuye formando parte de músculo y tejidos blandos (40 %), de fluidos extracelulares (1 %) y el resto en el esqueleto (Moreno, 2000). Las recomendaciones oscilan entre 240 y 420 mg/día para hombres y 240-320 mg/día para mujeres (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 1998). Las fuentes alimentarias principales son cereales integrales, frutos secos, vegetales verdes (espinaca, acelga, achicoria, lechuga, escarola, etc., ya que es componente de la clorofila), leche (alta contribución a la ingesta total), carne, pescado y frutas (estos tres últimos confieren un bajo aporte). En cuanto a su biodisponibilidad, existen estudios que apuntan hacia la afectación de la absorción de magnesio por presencia de calcio y fósforo en la dieta (Moreno, 2000).

1.1. Hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas

Las hierbas aromáticas son componentes minoritarios, en cuanto a su consumo, en la dieta diaria (Seddigi *et al.*, 2016) (1,5 g/día en los países europeos; Bukva *et al.*, 2019). Su uso tradicional está asociado a la condimentación de preparaciones culinarias para facilitar sabores, aromas y/o colores deseables, siendo los principales determinantes de la calidad sensorial de los alimentos (Seddigi *et al.*, 2016; Bukva *et al.*, 2019). Otro uso extendido de estas hierbas, aumentando la cantidad añadida a los alimentos, es el enmascaramiento de sabores indeseables cuando han sido sometidos a un estado de conservación inadecuado. Las hierbas aromáticas también se han utilizado, por su contenido en aceites esenciales y compuestos polifenólicos antioxidantes, en la medicina tradicional (Seddigi *et al.*, 2016; Arantes *et al.*, 2017; Farshchi *et al.*, 2018; Ferricioni *et al.*, 2019), y como conservantes naturales de alimentos debido a la acción antimicrobiana y antifúngica de los aceites esenciales que las componen (Hinneburg *et al.*, 2005; Embuscado *et al.*, 2015; Bassanetti *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2019; Weisany *et al.*, 2019; Mohapatra *et al.*, 2020). En los últimos años, los extractos etanólicos de romero al 1 % en envases activos se han propuesto como componentes de una película protectora de proteína de suero biodegradable, ya que presentan actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (Andrade *et al.*, 2018).

A pesar de ello, la baja solubilidad, la biodisponibilidad y la alta volatilidad de los aceites esenciales son limitaciones importantes para su aplicación en los alimentos como agentes antibacterianos (Bassanetti *et al.*, 2017).

En los últimos años, numerosos estudios han relacionado los compuestos bioactivos presentes en estas hierbas aromáticas, especialmente en sus aceites esenciales, con un efecto preventivo frente a diversas patologías relacionadas con el estrés oxidativo, indicando su efecto antiinflamatorio, antidiabético y antihipertensivo (Srinivasan *et al.*, 2005). En este sentido, algunos autores (Papageorgiou *et al.*, 2003) refieren un aumento de la capacidad antioxidante y, por tanto, un retraso en la oxidación de lípidos en los tejidos del pavo tras la incorporación de aceite de orégano en la dieta (200 mg/kg de dieta). En cuanto a los aceites esenciales de albahaca, otros investigadores indican que éstos tienen actividades antioxidantes y antifúngicas, y que éstas son máximas en los aceites esenciales obtenidos a concentraciones de 0,04 mg/l de abono de cobre (Nawaz *et al.*, 2017) y 0,095 mg/l de abono de cinc (Hanif *et al.*, 2017).

Otros investigadores se refieren a los aceites esenciales de orégano como una alternativa al hidroxitolueno butilado para prolongar la vida útil de los productos cárnicos envasados, como la carne picada (Cantú-Valdéz *et al.*, 2020).

El efecto antioxidante de los aceites esenciales de romero contra la oxidación inducida por el hierro se ha observado en el músculo longissimus dorsi de cerdo homogeneizado con una respuesta dependiente de la dosis (Zhou *et al.*, 2019). Por lo tanto, las hierbas aromáticas, como fuente de antioxidantes fenólicos que minimizan el enranciamiento oxidativo y aumentan la vida útil de los alimentos, pueden satisfacer la necesidad de la industria alimentaria de contar con productos naturales y de etiqueta limpia (Shah *et al.*, 2014). En los últimos años, se ha estudiado el uso de partículas de óxido de nano-cinc sintetizadas utilizando extractos de clavo como agentes antimicrobianos (Mohapatra *et al.*, 2020).

Se han realizado numerosos estudios sobre las hierbas aromáticas en relación con su contenido en metales pesados, debido a su capacidad para concentrar los metales pesados procedentes de las tierras de cultivo contaminadas; por tanto, pueden ser una fuente de metales traza tóxicos en el cuerpo humano (Seddigi *et al.*, 2016).

La acumulación de elementos en las plantas hasta alcanzar niveles tóxicos depende de las variedades de plantas y de las condiciones ambientales y climáticas en las que se cultivan (Pohl *et al.*, 2016; Cervera-Mata *et al.*, 2020). Es necesario conocer el origen geográfico de los alimentos (en particular de las hierbas) para garantizar la salud del consumidor final (Potortì *et al.*, 2020).

Los metales analizados en este estudio, hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio son elementos esenciales relacionados con funciones importantes en los sistemas biológicos y en el cuerpo humano, siempre que su ingesta no supere los límites máximos establecidos por *The National Academies of Sciences, Engineering and Medicine* (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2002), en cuyo caso podrían asociarse a efectos tóxicos (Di Bella *et al.*, 2015). Sin embargo, dada la baja ingesta dietética diaria de hierbas aromáticas (0,8-1,5 g/día), es difícil que éstas contribuyan a alcanzar niveles tóxicos, como se indica para el hierro determinado en especias de plantas aromáticas que crecen en suelos de una mina abandonada en Roalgar, en el suroeste de Portugal (Sabina *et al.*, 2019). El hierro, y el cinc y el cobre, son cofactores de las enzimas anti-oxidantes catalasa y superóxido dismutasa, respectivamente. Sin embargo, altos niveles de cobre y hierro libres en el organismo actúan como prooxidantes (Symeonidis *et al.*, 2012), dando lugar a patologías como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, esclerosis múltiple, etc. (Sabina *et al.*, 2019).

Es sabido que los microorganismos en general, y los patógenos alimentarios en particular, requieren para su óptimo desarrollo un adecuado aporte de elementos esenciales, y que el hierro específicamente es uno de los estimuladores del crecimiento microbiano, como se ha indicado para *L. monocytogenes* (Lechowicz *et al.*, 2015) y en general para el desarrollo de cualquier microorganismo patógeno (Symeonidis *et al.*, 2012), al actuar como factor de crecimiento. Sin embargo, se ha indicado que las nanoaleaciones de plata-cobre sintetizadas microbiológicamente tienen efectos antibacterianos contra, entre otros, *L. monocytogenes* a concentraciones de 0.01 g/l (Mohammadi *et al.*, 2018), o, como las nanopartículas de cobre, aumentan la actividad antifúngica de los aceites esenciales de tomillo (Weisany *et al.*, 2019).

Por otro lado, el papel del calcio y el magnesio en el crecimiento microbiano se ha documentado sobre todo mediante experimentos *in vitro* en relación con las formulaciones de los medios y, en parte, como constituyentes de los envases activos antibacterianos:

- **Nanopartículas de óxido de cinc y magnesio:** cuando se reforzó un envase activo antibacteriano con nanopartículas de óxido de cinc y magnesio, se comprobó una mayor duración de las muestras de salmón ahumado en frío contra *L. monocytogenes* (Vizzini *et al.*, 2020).

- **Iones de magnesio:** mitigan la formación de biopelículas de especies de *Bacillus* (Oknin *et al.*, 2015).

- **Películas de clorofilina-gelatina de sodio soluble en agua:** que se observó que redujeron el crecimiento de *L. monocytogenes* en salchichas cocidas inoculadas con este microorganismo (López-Carballo *et al.*, 2008).

- **Polvos de óxido de magnesio y óxido de calcio:** que se ha visto que presentan actividades antimicrobianas contra los hongos utilizados en el estudio (Sawai *et al.*, 2004).

- **Compuestos de carboximetil quitosano/óxido de magnesio:** que han mostrado una gran actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, que podría utilizarse en el envasado de alimentos (Wang *et al.*, 2020).

- **Iones Mg²⁺ y el Ca²⁺:** que cuando están presentes en altas concentraciones en los alimentos, contrarrestan el efecto conservador de la enterocina LR/6, limitando su potencial antibacteriano (Kumar *et al.*, 2011). Otro estudio (Lenz *et al.*, 2014) indicó que el contenido de Ca²⁺ confiere a las esporas de tres cepas de *C. botulinum* una gran resistencia al calor y a la presión hidrostática, mientras que los cationes Mg²⁺ parecen tener un efecto contrario. Por último, otros autores informaron de que cuando se añadieron iones de calcio y magnesio al medio, *B. cereus* fue erradicado (Bandara *et al.*, 2012).

- **Nitrato de calcio:** que en el caso de *C. perfringens*, algunos autores informaron de que el nitrato de calcio suprimía la esporulación y la producción de enterotoxinas (Yasugi *et al.*, 2016).

Por todo ello, en este estudio se pretende determinar los niveles de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en cinco de las hierbas aromáticas deshidratadas más utilizadas en la Dieta Mediterránea, tanto para la elaboración de platos salados como dulces y cuyo consumo está muy extendido entre la población del arco mediterráneo (tomillo, romero, orégano, clavo y albahaca). Al mismo tiempo, se analizará la relación de estas hierbas aromáticas deshidratadas con los niveles de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio determinando el crecimiento microbiano de seis grupos de los patógenos alimentarios más comunes:

- *L. monocytogenes*.
- *C. perfringens*.
- *B. cereus*.
- **Microorganismos mesófilos.**
- **Microorganismos psicrófilos.**
- **Mohos y levaduras.**

La finalidad es conocer si los niveles de los elementos esenciales estudiados en las hierbas aromáticas deshidratadas indicadas están relacionados con el crecimiento de estos microorganismos. Para ello, se tendrá en cuenta el sistema de comercialización utilizado a nivel de consumo y de restauración (venta a granel, envases de vidrio y envases de tereftalato de polietileno (PET)).

En este sentido, y respecto al PET, cabe recordar que el envasado en atmósfera modificada (EAM) es una técnica de conservación indirecta de los alimentos que se diseñó inicialmente para preservar la calidad de los productos frescos (Kirtil *et al.*, 2016). La finalidad que se persigue es conseguir que el crecimiento microbiano y las reacciones de deterioro químico de los alimentos se mantengan en niveles mínimos; para ello, se modifica la composición de gases en el envase. Los envases de atmósfera modificada (EAM) pueden ser *activos*, cuando el desplazamiento de gases en el envase se sustituye por una mezcla de gases deseada, y *pasivos*, cuando el producto se envasa con un determinado tipo de film y la atmósfera deseada dentro del envase se desarrolla de forma natural como consecuencia de la respiración de los productos y la difusión de los gases a través del film (Flores *et al.*, 2020).

Las hierbas aromáticas se han asociado tradicionalmente con un efecto antimicrobiano, lo que se explica por su contenido en aceites esenciales para los cuales se han desarrollado múltiples estudios que ponen de manifiesto específicamente este efecto. Sin embargo, no se ha realizado con frecuencia la comparación de la capacidad conservadora de las hierbas descritas en este estudio cuando se añaden a alimentos no sometidos a tratamiento térmico final. Además, no se ha comprobado si algunas de ellas actúan directamente como vehículo de los patógenos transmitidos por los alimentos.

Por tanto, en el presente estudio, uno de los objetivos principales es obtener datos que permitan asesorar a la industria alimentaria, e incluso a los establecimientos de restauración y a los propios consumidores, sobre qué hierbas aromáticas deshidratadas son las más aconsejables para su uso como conservantes y condimentos alimentarios, y cómo los niveles de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio presentes en las mismas, pueden influir en el desarrollo de los microorganismos objeto de estudio.

2. Objetivos

En consecuencia, en este estudio se pretende:

- **Determinar las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en cinco especias de uso común en España:** tomillo, romero, orégano, albahaca y clavo.

- **Determinar si los niveles de estos minerales influyen en los recuentos microbianos de patógenos alimentarios presentes en estas especias:**

- *L. monocytogenes.*
- *C. perfringens.*
- *B. cereus.*
- **Microorganismos mesófilos.**
- **Microorganismos psicrófilos.**
- **Mohos y levaduras.**

- **Estudiar la influencia del sistema de comercialización utilizado en los recuentos microbianos de los referidos microorganismos cuando las especias deshidratadas se mezclan con los medios de cultivo y su posible correlación con las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio presentes:**

- **A granel.**
- **Vidrio.**
- **Envases de tereftalato de polietileno (PET).**

El objetivo final es, por tanto, **determinar si el contenido de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en las especias puede influir en su potencial uso como conservantes de alimentos crudos** o, por el contrario, **están positivamente relacionados con el crecimiento microbiano** de los microorganismos en función del sistema de comercialización utilizado.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestreo de hierbas aromáticas deshidratadas

Como ya se ha descrito en el apartado 3.1. del Capítulo I, Las muestras analizadas fueron tomillo, romero, clavo, orégano y albahaca deshidratados (n = 75) comercializados a granel (n = 25), y envasados en tarros de cristal (n = 25) o en tarros de PET (n = 25) que fueron recogidos en diferentes establecimientos comerciales de España, asépticamente en bolsas estériles, antes del análisis microbiológico en el mismo día. El 78% de las muestras recogidas eran de origen europeo; el 22% restante eran de origen desconocido pero vendidas en establecimientos españoles.

Las muestras a granel se recogieron en herbolarios, donde las hierbas secas se exponen al público en cestas o cajas sin ningún sistema de envasado y a veces en puestos junto a la carretera. Esto supone una gran manipulación y un posible peligro de contaminación, tanto ambiental como por parte de los propios consumidores, que se acercan a las cestas para olerlas y a veces incluso tocarlas con las manos.

Las muestras envasadas en vidrio y PET se recogieron en supermercados, se envasaron y se cerraron herméticamente para evitar la manipulación por parte de los usuarios y consumidores que acuden a estos centros de alimentación. Hemos elegido los envases de vidrio y PET por ser materiales con altas propiedades de barrera frente a los gases y vapores en general. Con ello pretendemos ver la diferencia en cuanto a la calidad microbiana de los alimentos entre las hierbas sin ningún tipo de envase que se venden a granel, y las hierbas envasadas que han sido previamente tratadas por la industria alimentaria, para asegurar su calidad higiénica. El envase es una garantía de esa calidad, ya que actúa como barrera que impide el paso de microorganismos del entorno, así como de ciertos gases (como el vapor de agua) que pueden favorecer el desarrollo microbiano.

3.2. Análisis de los minerales objeto de estudio en muestras de hierbas aromáticas deshidratadas

Para la determinación del contenido de los minerales analizados en el presente estudio, 300 miligramos de cada una de las muestras de hierbas aromáticas consideradas se mineralizaron mediante con HNO₃ (66 %) y HClO₄ (60 %) concentrados de calidad suprapura para análisis (Merck, Darmstadt, Alemania) en un bloque de mineralización multiplaza termostático (Selecta, Barcelona, España). La mineralización se llevó a cabo en dos etapas:

- **Primera etapa:** se añadieron 4 ml de HNO₃ calentando a 60 °C durante 60 minutos, 90 °C durante 60 minutos y 120 °C, durante 120 minutos adicionales.
- **Segunda etapa:** se adicionaron 3 ml de una mezcla de HNO₃-HClO₄ (4:1) calentando a 90 °C durante 60 minutos, 120 °C durante 60 minutos y 130 °C durante 90 minutos.

La muestra mineralizada finalmente obtenida se diluyó a 10 ml con agua de grado reactivo (agua Milli-Q obtenida con el sistema R015 Milli-Q, Waters, Medford, MA, USA) para obtener la solución para el análisis; en el caso del calcio y el magnesio, se realizó una dilución adicional (1/500) con agua bidestilada como paso previo a la medición de calcio y magnesio por espectrometría de absorción atómica de llama. La determinación de las concentraciones totales de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en las muestras de hierbas aromáticas se realizó con un equipo de espectrofotometría de absorción atómica con atomización a la llama (AAS) (Varian SpectraA, 140, Mulgrave, Australia). Las curvas de calibración se prepararon previamente diluyendo soluciones madre de 1.000 mg/l en HNO₃ al 1 % para los elementos analizados (Merck, Darmstadt, Alemania).

Los parámetros analíticos del método tales como la exactitud y precisión de los procedimientos de medición de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio (n = 10) se verificaron mediante el uso del patrón de referencia estándar con un contenido certificado en estos elementos “*Citrus leaves powder n° 1515*” del *National Institute for Standards and Technology* (NIST) (Gaithersburg, MD, USA).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las concentraciones medias de los elementos determinadas en el patrón certificado referido y las concentraciones certificadas ($84,7 \pm 2,20$ vs. $83,1 \pm 3,00$ para el hierro; $12,5 \pm 0,68$ vs. $12,7 \pm 0,85$ para el cinc; $5,19 \pm 0,43$ vs. $5,48 \pm 0,35$ para el cobre; $15,2 \pm 0,10$ vs. $14,9 \pm 0,32$ para el calcio y $2,71 \pm 0,12$ vs. $2,82 \pm 0,40$ $\mu\text{g/g}$ para el magnesio). Además, la exactitud de los métodos se probó sobre la base de experimentos de recuperación, después de la digestión completa de muestras de hierbas aromáticas previa adición de cantidades crecientes y diferentes de los elementos desde las soluciones estándar (Cervera-Mata *et al.*, 2019; Vizzini *et al.*, 2020). Las recuperaciones calculadas para los elementos estudiados estuvieron comprendidas entre el 96 % y el 101,3 % para hierro, cinc y cobre y entre el 97 % y 100,2 % para calcio y magnesio. Los límites de detección (LOD) del método para los elementos analizados (0,28, 3,2, 0,80, 87 y 16 ng/ml, para el hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio respectivamente) se calcularon como se informó previamente (Cervera-Mata *et al.*, 2019). Para ello se determinaron las concentraciones de estos elementos medidas en 10 blancos, calculándose el límite de detección como el valor correspondiente a 3 veces el valor de la desviación estándar de esas 10 medidas de los 10 blancos considerados. La concentración presente ($\mu\text{g/ml}$) en las muestras de las hierbas aromáticas estudiadas se determinó mediante el método de calibración lineal. A tal efecto se correlacionaron las medidas de absorbancia con las concentraciones correspondientes para cada una de las disoluciones patrón de las rectas de calibrado, elaboradas para cada uno de los elementos estudiados. Cada elemento se analizó por triplicado en cada una de las muestras de hierbas aromáticas consideradas en el presente estudio.

3.3. Métodos de análisis microbiológico

Descrito en el apartado 3.2. del Capítulo I

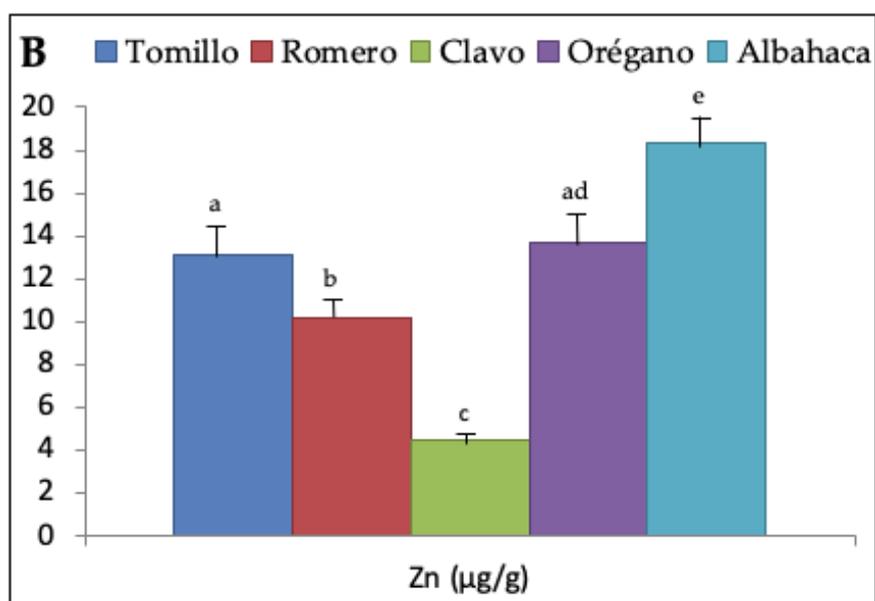
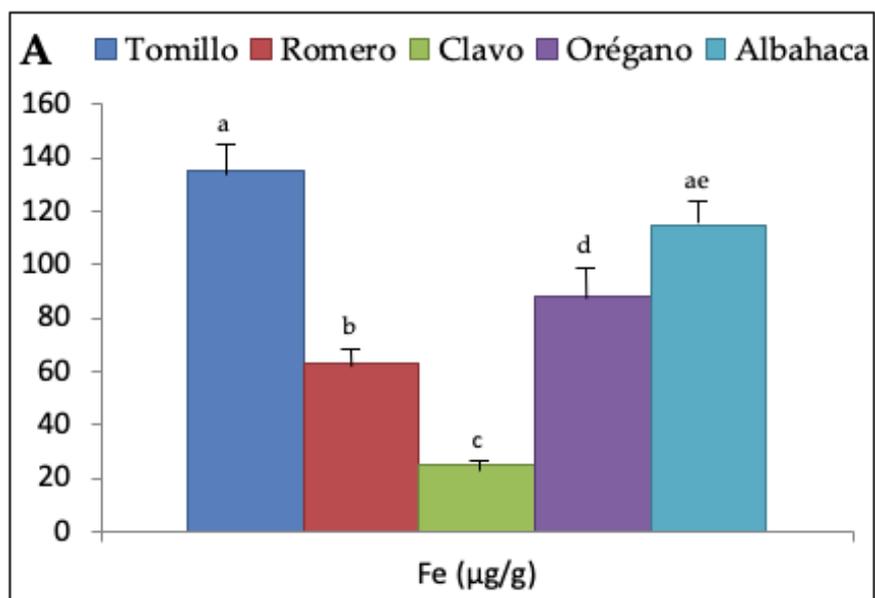
3.4. Tratamiento estadístico

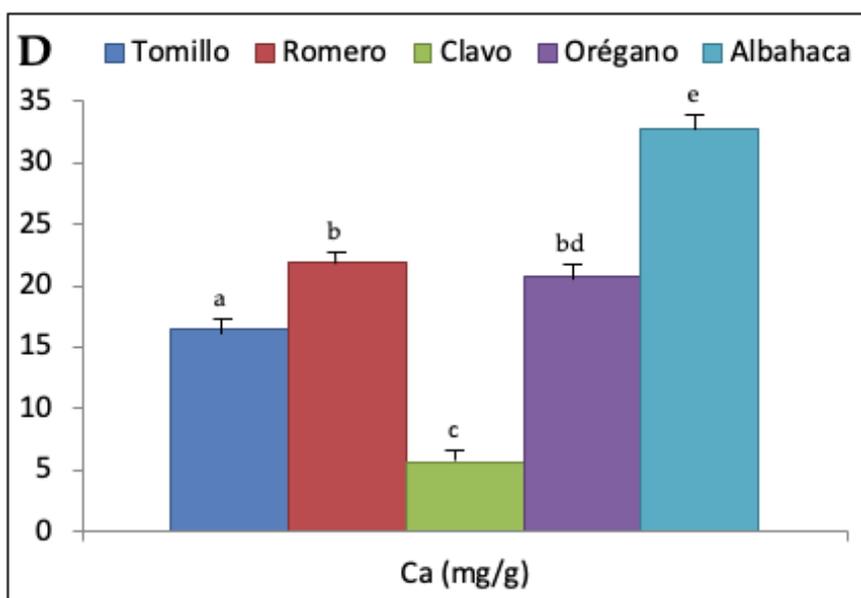
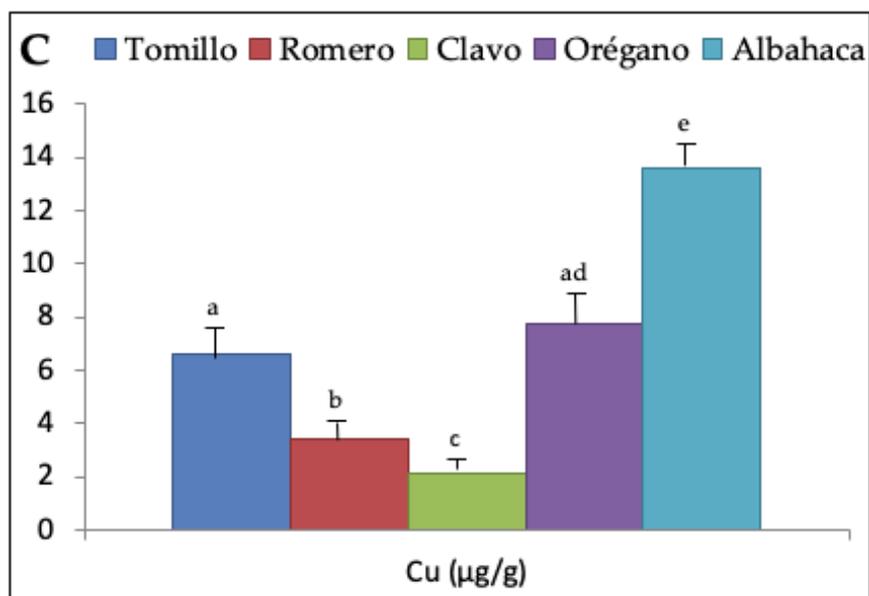
Como paso previo al análisis estadístico de los resultados obtenidos, se comprobó la existencia previa o no de homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene y la distribución normal de los datos con el test de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el test ANOVA para analizar los datos paramétricos, cuando existía homogeneidad de la varianza ($p > 0,05$) y distribución normal de los resultados ($p > 0,05$), y el test de Kruskal-Wallis para analizar los datos no paramétricos, al no cumplirse alguno de los dos requisitos anteriormente indicados. Las correlaciones lineales entre las concentraciones determinadas de los elementos analizados y el crecimiento microbiano medido en las hierbas aromáticas deshidratadas se evaluaron calculando el coeficiente de correlación de Pearson, en condiciones paramétricas (para datos con distribución normal) o la correlación lineal de Spearman, en condiciones no paramétricas (para datos sin distribución normal). El nivel de significación se fijó en el 5 % ($p < 0,05$) en todas las pruebas. Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS 22.0 para Windows (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, EE.UU.).

4. Resultados y discusión

4.1. Concentraciones medias de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas

El contenido de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio varía según la hierba aromática deshidratada y se encuentra representado conjuntamente con sus desviaciones estándar sobre la media (Figura 1A, 1B, 1C, 1D y 1E):





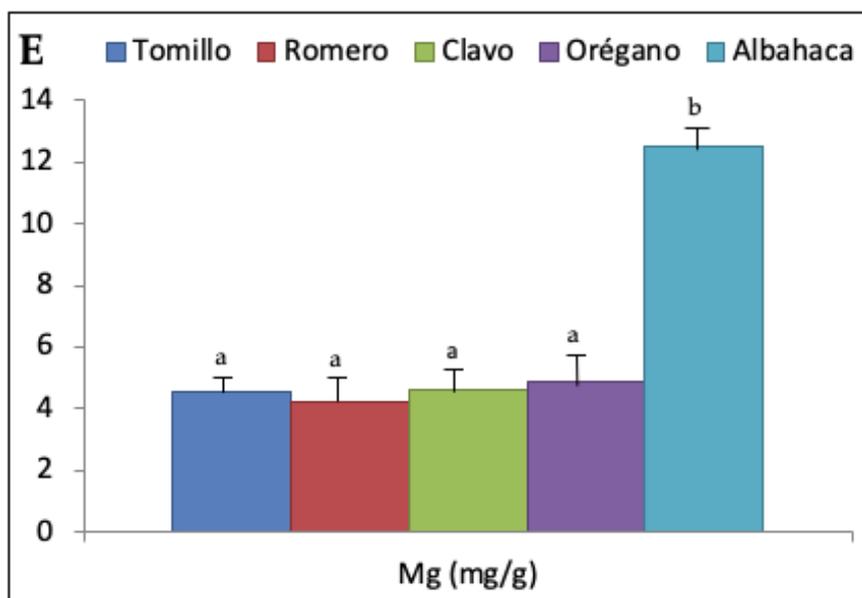


Figura 1. Concentraciones medias de hierro (A), cinc (B), cobre (C) ($\mu\text{g/g}$), calcio (D) y magnesio (E) (mg/g) medidas en hierbas aromáticas deshidratadas; *diferentes superíndices indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,001$)*

Asimismo, en las Tablas 1 y 2, también se incluyen los niveles medios de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas, valores que, a su vez, se comparan con lo encontrado por otros autores en hierbas aromáticas semejantes en otros países:

Tabla 1: Concentraciones medias de Fe, Zn y Cu ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de hierbas deshidratadas medidas en el presente estudio en comparación con las determinadas por otros investigadores

HIERBAS AROMÁTICAS	Fe \pm EEM	Zn \pm EEM	Cu \pm EEM	REFERENCIAS
Tomillo	857 \pm 57,9	-	-	Bukva <i>et al.</i> , 2008
Tomillo	41 \pm 11	330 \pm 67	26 \pm 4,1	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Tomillo	112 \pm 13	17 \pm 1,7	1,9 \pm 0,64	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Tomillo	440 \pm 1,4	22 \pm 2,3	6,1 \pm 1,9	Kara, 2009
Tomillo	203 \pm 1,2	5,4 \pm 1,6	6,6 \pm 0,32	Shim <i>et al.</i> , 2019
Tomillo	135 \pm 11	13 \pm 0,75	6,6 \pm 0,75	Presente estudio
Romero	118 \pm 16,6	-	-	Bukva <i>et al.</i> , 2008
Romero	n.d. ^a	41 \pm 7,6	84 \pm 14	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Romero	735 \pm 39	31 \pm 3,2	3,0 \pm 0,02	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Romero	173 \pm 3,2	9,0 \pm 0,30	5,0 \pm 1,0	Abou-Arab <i>et al.</i> , 2000
Romero	432	52	8,5	Bua <i>et al.</i> , 2016
Romero	63 \pm 7,6	10 \pm 0,23	3,4 \pm 0,16	Presente estudio
Clavo	90 \pm 6,0	6,3 \pm 0,90	3,2 \pm 0,10	Seddigi <i>et al.</i> , 2016
Clavo	65 \pm 3,6	14 \pm 1,7	1,1 \pm 0,02	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Clavo	25 \pm 5,9 ^c	4,5 \pm 0,19 ^c	2,2 \pm 0,11 ^c	Presente estudio
Orégano	918 \pm 44	-	-	Bukva <i>et al.</i> , 2008
Orégano	n.d.	31 \pm 8,5	85 \pm 2,7	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Orégano	240 \pm 217	59 \pm 6,8	8,4 \pm 6,5	Sabina <i>et al.</i> ; 2019
Orégano	198 \pm 2,4	9,0 \pm 0,40	3,0 \pm 1,0	Abou-Arab <i>et al.</i> , 2000
Orégano	88 \pm 6,4	14 \pm 0,46	7,7 \pm 0,36	Presente estudio
Albahaca	112 \pm 65,1	-	-	Bukva <i>et al.</i> , 2008
Albahaca	251 \pm 38	43 \pm 1,4	7,6 \pm 0,06	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Albahaca	448 \pm 12	46 \pm 1,5	4,8 \pm 0,15	Shim <i>et al.</i> , 2019
Albahaca	390 \pm 14	16 \pm 0,20	11 \pm 0,30	Abou-Arab <i>et al.</i> , 2000
Albahaca	671 \pm 20	35 \pm 4,1	6,8 \pm 1,5	Ejaz <i>et al.</i> , 2018
Albahaca	305	89	138	Akthar <i>et al.</i> , 2014
Albahaca	115 \pm 7,6	18 \pm 0,48	14 \pm 0,42	Presente estudio

^a No detectado

Tabla 2: Concentraciones medias de Ca y Mg (mg/g peso seco) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de hierbas deshidratadas medidas en el presente estudio en comparación con las determinadas por otros investigadores

HIERBAS AROMÁTICAS	Ca ± EEM	Mg ± EEM	REFERENCIAS
Tomillo	9,58 ± 2,66	1,53 ± 0,144	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Tomillo	7,76 ± 6,8	2,11 ± 6,2	Kara, 2009
Tomillo	3,15 ± 0,12	0,47 ± 0,01	Zengin <i>et al.</i> , 2008
Tomillo	874 ± 70,3	380 ± 73,3	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Tomillo	823 ± 135	134 ± 32,2	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Tomillo	16,5 ± 1,21	4,55 ± 0,207	Presente estudio
Romero	8,60 ± 1,91	2,41 ± 0,264	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Romero	306 ± 43,8	36,8 ± 3,40	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Romero	297 ± 34,5	120 ± 17,8	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Romero	21,9 ± 0,846	4,20 ± 0,457	Presente estudio
Clavo	6,50 ± 0,789	2,89 ± 0,122	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Clavo	5,58 ± 0,315	4,59 ± 0,356	Presente estudio
Orégano	12,7 ± 2,19	3,09 ± 1,11	Sabina <i>et al.</i> , 2019
Orégano	422 ± 69,5	55,0 ± 6,10	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Orégano	793 ± 62,3	355 ± 20,0	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Orégano	20,7 ± 1,16	4,90 ± 0,349	Presente estudio
Albahaca	26,7	-	Obiajunwa <i>et al.</i> , 2002
Albahaca	5,56 ± 1,71	0,53 ± 0,01	Zengin <i>et al.</i> , 2008
Albahaca	16,5 ± 2,96	3,13 ± 0,443	Özcan <i>et al.</i> , 2008
Albahaca	32,7 ± 1,17	12,5 ± 0,561	Presente estudio

EEM: Error estándar de la media

4.1.1. Concentraciones medias de hierro en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización

En relación con los niveles medios de hierro (Tabla 1, Figura 1A), aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre los del tomillo y la albahaca ($p > 0,05$), son significativamente superiores ($p < 0,001$) a los del resto de hierbas aromáticas deshidratadas. Por su parte, la concentración media de hierro medida en el orégano fue significativamente mayor que la del romero, y la de éste y el orégano, a su vez, respecto a la del clavo ($p < 0,001$). El sistema de comercialización (envase de vidrio o PET, o venta a granel) influyó significativamente en el contenido de hierro de las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas consideradas en conjunto ($p < 0,05$; Tabla 2). En concreto, los niveles determinados en las hierbas comerciales envasadas en PET fueron significativamente menores ($p < 0,01$).

4.1.2. Concentraciones medias de cinc y cobre en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización

Específicamente, las concentraciones medias de cinc y cobre fueron significativamente diferentes entre todas las hierbas aromáticas deshidratadas ($p < 0,001$), con la excepción del tomillo y el orégano. Específicamente, el nivel medio más alto se encontró en la albahaca, que fue significativamente más alto que el del tomillo y el orégano; éstos, a su vez, fueron significativamente más altos que el nivel medido en el romero, y este último fue más alto que el determinado en el clavo ($p < 0,001$). En general, las concentraciones medias más altas de cinc y cobre se encontraron en la albahaca y las más bajas en el clavo (Figuras 1B y 1C). Sin embargo, el sistema de comercialización (envase de vidrio o PET, o venta a granel) no influye en el contenido de cinc y cobre en las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas consideradas conjuntamente ($p > 0,05$; Tabla 3):

Tabla 3. Concentraciones medias de Fe, Zn y Cu ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización [(a granel, o en envase de vidrio o tereftalato de polietileno (PET))]

SISTEMAS DE ENVASADO	Fe \pm EEM	Zn \pm EEM	Cu \pm EEM
A granel	90 \pm 8,7 ^b	12 \pm 0,72 ^a	8,5 \pm 0,69 ^a
Vidrio	90 \pm 8,0 ^b	12 \pm 1,0 ^a	5,5 \pm 0,70 ^a
PET	53 \pm 9,8 ^a	12 \pm 0,95 ^a	5,6 \pm 0,72 ^a

^{a,b}: Concentraciones medias de hierro, cinc y cobre con diferentes superíndices expresan la existencia de diferencias estadísticas ($p < 0,01$)

4.1.3. Concentraciones medias de calcio y magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización

En referencia al **calcio**, los niveles medios de calcio fueron estadísticamente diferentes entre las hierbas aromáticas deshidratadas ($p < 0,05$). En concreto, el mayor contenido medio de calcio se determinó en la albahaca, que fue estadísticamente superior al romero y al orégano, que fueron estadísticamente superiores al tomillo, y este último fue estadísticamente superior al clavo ($p < 0,001$).

En cuanto al **magnesio**, en el presente estudio se han determinado niveles medios similares para todas las hierbas aromáticas deshidratadas, con la excepción de la albahaca, donde se midieron concentraciones significativamente más altas ($p < 0,001$).

Los niveles medios más altos de calcio y magnesio, como se puede observar en las Figuras 1D y 1E, se determinaron en la albahaca, y los más bajos en el clavo, pero sólo para el calcio.

En cuanto al sistema de envasado (envases de vidrio o PET) o la venta a granel, no afectaron al nivel de calcio en las hierbas aromáticas deshidratadas ($p > 0,05$). Sin embargo, las muestras de hierbas comercializadas en PET presentaron un nivel medio de magnesio significativamente menor que el encontrado en las vendidas a granel ($p < 0,01$). Esta significación estadística en la concentración de magnesio de las muestras comercializadas en PET, frente a las que se venden a granel, se debe probablemente a la acumulación de polvo o suciedad en las muestras comercializadas a granel o incluso a las diferencias en el contenido de magnesio entre los distintos tipos de hierbas aromáticas deshidratadas estudiadas:

Tabla 4: Concentraciones medias de calcio y magnesio (mg/g peso seco) en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización (a granel, en PET o en vidrio)

SISTEMAS DE ENVASADO	Ca ± EEM	Mg ± EEM
A granel	17,3 ± 1,32 ^a	6,53 ± 0,517 ^b
Vidrio	18,9 ± 1,91 ^a	6,34 ± 0,787 ^{ab}
PET	21,3 ± 2,18 ^a	5,10 ± 0,494 ^a

^{a,b}: Concentraciones medias de calcio y magnesio con diferentes superíndices expresan la existencia de diferencias estadísticas ($p < 0,01$)

4.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio y el crecimiento microbiano de microorganismos patógenos en hierbas aromáticas deshidratadas

En cuanto a la correlación lineal bivariada entre las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en las hierbas aromáticas deshidratadas y el crecimiento microbiano de los seis grupos de patógenos alimentarios considerados en el estudio (*L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras), se utilizó el método no paramétrico de Spearman, ya que no se observó una distribución normal de los valores de crecimiento microbiano analizados mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$) para ninguno de los seis grupos de microorganismos analizados. La siguiente tabla (Tabla 5) muestra los valores de los coeficientes de correlación lineal (r) y los correspondientes niveles de significación (p) para el hierro, cinc y cobre:

Tabla 5. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre las concentraciones medidas de Fe, Zn y Cu en hierbas aromáticas deshidratadas y los valores de recuento microbiano (UFC/g) de los microorganismos objeto de estudio

MICROORGANISMOS	Fe		Zn		Cu	
	r	p	r	p	r	p
<i>L. monocytogenes</i>	0,427	0,001	0,264	0,012	0,559	0,001
<i>C. perfringens</i>	0,655	0,001	0,632	0,001	0,775	0,001
<i>B. cereus</i>	0,356	0,001	0,253	0,017	0,428	0,001
Microorganismos mesófilos	0,097	0,377	0,204	0,055	0,383	0,001
Microorganismos psicrófilos	0,375	0,001	0,267	0,011	0,546	0,001
Mohos y levaduras	0,201	0,065	0,125	0,242	0,435	0,001

Se puede observar que la tasa de crecimiento de *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* y los microorganismos psicrófilos aumentó, lo que indica que se correlacionó de forma lineal y significativa con las concentraciones de hierro, cinc y cobre en las hierbas aromáticas deshidratadas ($p < 0,05$). Esto podría estar asociado a un posible efecto estimulante del crecimiento microbiano en los cuatro grupos de microorganismos patógenos alimentarios indicados, ejercido por los minerales antioxidantes estudiados (hierro, cinc y cobre). Además, el crecimiento de microorganismos mesófilos y de mohos y levaduras también aumentó significativamente con las concentraciones de cobre medidas en las hierbas aromáticas deshidratadas ($p < 0,001$).

La siguiente tabla (Tabla 6) muestra los valores de los coeficientes de correlación lineal (r) y los correspondientes niveles de significación (p) para el calcio y el magnesio:

Tabla 6. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre los niveles medidos de calcio y magnesio (mg/g de peso seco) en hierbas aromáticas deshidratadas y los valores de recuento microbiano (UFC/g) de los microorganismos objeto de estudio

MICROORGANISMOS	CALCIO		MAGNESIO	
	r^a	p	r^a	p
<i>L. monocytogenes</i>	0,265	0,007	0,198	0,054
<i>C. perfringens</i>	0,385	0,001	0,579	0,001
<i>B. cereus</i>	0,182	0,067	0,303	0,003
Microorganismos mesófilos	0,387	0,001	0,318	0,002
Microorganismos psicrófilos	0,245	0,013	0,192	0,063
Mohos y levaduras	0,405	0,001	0,024	0,817

^a: Se considera una correlación débil cuando el valor r es inferior a 0,4; una correlación moderada cuando el valor r está entre 0,5 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor r es superior a 0,7

Se puede observar que el recuento microbiano de *B. cereus*, *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras transmitidos por los alimentos, que se consideran presentes en las hierbas aromáticas deshidratadas, aumentó significativamente con las concentraciones de calcio (correlación débil; $r < 0,4$ con la excepción de los mohos y las levaduras para los que se encontró una correlación moderada; $p < 0,05$).

Estas concentraciones de calcio en las hierbas aromáticas deshidratadas posiblemente darían un efecto potenciador a los recuentos microbianos para los microorganismos patógenos alimentarios, como también se informó anteriormente en la descripción del hierro, cinc y cobre (García-Galdeano *et al.*, 2020).

El recuento microbiano de *C. perfringens* y *B. cereus* en todos los sistemas de comercialización utilizados, a excepción de los encontrados para *B. cereus* cuando estas hierbas aromáticas deshidratadas se comercializaron en vidrio ($p > 0,05$), aumentó significativamente con el contenido de calcio medido en las especias.

En cuanto al magnesio, los recuentos microbianos de *B. cereus*, *C. perfringens* y de microorganismos mesófilos aumentaron significativamente con las concentraciones de magnesio (correlación débil; $r < 0,4$ con la excepción de la de *C. perfringens* para la que se encontró una correlación moderada; $p < 0,05$).

4.3. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio y el crecimiento microbiano de microorganismos patógenos en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización

Como se ha descrito en el punto 4.1.2., el sistema de comercialización (envase de vidrio o PET, o venta a granel) no influye en el contenido de cinc y cobre en las hierbas aromáticas analizadas consideradas conjuntamente, por lo cual no se ha considerado la realización de una tabla de correlación lineal bivariada entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre y el crecimiento microbiano de microorganismos patógenos en hierbas aromáticas deshidratadas según el sistema de comercialización.

La siguiente tabla (Tabla 7) muestra los valores de los coeficientes de correlación lineal (r) y los correspondientes niveles de significación (p) entre los niveles de calcio y magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas en función del sistema de comercialización y los valores de recuento microbiano:

Tabla 7. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p : entre paréntesis) entre los niveles de calcio y magnesio medidos (mg/g de peso seco) en hierbas aromáticas deshidratadas en función del sistema de comercialización y los valores de recuento microbiano (UFC/g) de los microorganismos objeto de estudio

MICROORGANISMOS	CALCIO			MAGNESIO		
	A granel	Vidrio	PET	A granel	Vidrio	PET
<i>L. monocytogenes</i>	0,289 (0,063)	-0,174 (0,341)	0,676 ^a (0,001)	0,163 (0,280)	-0,076 (0,683)	0,669 ^a (0,001)
<i>C. perfringens</i>	0,385 ^a (0,012)	0,724 ^a (0,000)	0,818 ^a (0,000)	0,306 ^a (0,039)	0,414 ^a (0,013)	0,478 ^a (0,028)
<i>B. cereus</i>	0,345 ^a (0,025)	0,038 (0,837)	0,764 ^a (0,000)	0,174 (0,247)	-0,123 (0,480)	0,450 ^a (0,041)
Microorganismos mesófilos	0,352 ^a 0,022	0,477 ^a (0,006)	0,132 (0,569)	0,228 (0,128)	0,044 (0,800)	0,470 ^a (0,032)
Microorganismos psicrófilos	0,246 (0,111)	0,376 ^a (0,034)	0,654 ^a (0,001)	0,643 ^a (0,000)	0,257 (0,136)	0,330 (0,145)
Mohos y levaduras	0,232 (0,139)	-0,092 (0,617)	0,679 ^a (0,001)	0,353 ^a (0,016)	0,291 ^a (0,000)	0,685 ^a (0,001)

^a: Se considera una correlación débil cuando el valor r es inferior a 0,4; una correlación moderada cuando el valor r está entre 0,5 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor r es superior a 0,7

El crecimiento de *L. monocytogenes* aumentó significativamente con los niveles de calcio y magnesio (como correlación moderada para ambos minerales), sólo cuando las hierbas aromáticas deshidratadas se comercializaron en PET. Sin embargo, para los otros sistemas de comercialización (a granel y en envases de vidrio), no se encontró ninguna correlación lineal ($p > 0,05$) entre el recuento de este microorganismo y las concentraciones de calcio y magnesio presentes en estas hierbas (Tabla 7).

Para *C. perfringens*, se observó, en relación con los niveles de magnesio, una débil correlación lineal positiva con el crecimiento de *C. perfringens* para los tres sistemas de comercialización utilizados (granel, PET y vidrio) en las hierbas aromáticas deshidratadas estudiadas (Tabla 7).

Para *B. cereus*, el recuento microbiano aumentó débil pero significativamente con las concentraciones de magnesio sólo para las hierbas aromáticas deshidratadas comercializadas en PET ($p < 0,05$) (Tabla 7).

El crecimiento de **microorganismos mesófilos** y los niveles de calcio en las hierbas aromáticas deshidratadas estaban correlacionados de forma positiva y lineal significativa ($p < 0,05$) cuando las especias se comercializaban a granel y en vidrio (como correlación débil para ambos sistemas de comercialización). En cambio, para los niveles de magnesio, sólo se encontró una correlación lineal positiva con el crecimiento de estos microorganismos cuando las hierbas aromáticas deshidratadas se comercializaron en PET (como correlación moderada) (Tabla 7).

Para los **microorganismos psicrofílos**, sus recuentos se relacionaron lineal y positivamente con las concentraciones de calcio en las hierbas aromáticas deshidratadas cuando se comercializaron en PET (como correlación moderada) y en vidrio (como correlación débil), y con las concentraciones de magnesio cuando se comercializaron a granel (como correlación moderada) (Tabla 7).

En el caso del crecimiento de **mohos y levaduras**, el PET apareció como el sistema de comercialización en el que se produjo de nuevo una relación positiva y lineal entre las concentraciones de calcio y magnesio medidas (como correlación moderada para ambos minerales) y el crecimiento microbiano. Además, los recuentos de mohos y levaduras también aumentaron significativamente con las concentraciones de magnesio en las hierbas aromáticas deshidratadas cuando se comercializaron a granel y en vidrio (como correlación débil para ambos sistemas de comercialización) ($p < 0,05$).

Por el contrario, las concentraciones de calcio no aumentaron con el crecimiento de mohos y levaduras cuando las hierbas aromáticas deshidratadas se comercializaron a granel y en vidrio ($p > 0,05$) (Tabla 7).

Como se ha indicado anteriormente, las concentraciones presentes de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio dependen de la hierba aromática deshidratada considerada (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D y 1E). Para el hierro, cinc y cobre se encuentran valores medios más altos en la albahaca y valores medios más bajos en el clavo (Figura 1A, 1B, 1C), lo que lleva a establecer que los **niveles de cinc y cobre** en orden decreciente es el siguiente: albahaca > orégano, similar al de tomillo > romero > clavo. Para las concentraciones medias de cinc y cobre, similar a lo que se obtiene en el presente estudio, otros autores también encontraron concentraciones más altas y más bajas en la albahaca y el clavo, respectivamente (Özcan *et al.*, 2008).

En relación a los niveles de cinc, otros autores informaron de concentraciones en el orden de tomillo > romero > orégano (Potortì *et al.*, 2020).

Para los niveles de cobre, otros investigadores (Potortì *et al.*, 2020) indican en orden descendente concentraciones medias mayores para el orégano > romero > tomillo.

Para el hierro, las concentraciones medias determinadas en nuestro estudio, en orden descendente, fue la siguiente: tomillo > albahaca > orégano > romero > clavo. Otros investigadores (Potortì *et al.*, 2020) también encontraron mayores concentraciones de hierro en el tomillo que en el orégano; sin embargo, otros (Bukva *et al.*, 2019) informaron de concentraciones de hierro en el siguiente orden descendente: orégano > romero > albahaca.

Para el calcio y el magnesio se encuentran valores medios más altos en la albahaca y valores medios más bajos en el clavo en el calcio y en el romero para el magnesio (Figuras 1D y 1E).

En cuanto al **contenido medio de calcio**, las concentraciones medias, de menor a mayor, fueron: clavo < tomillo < orégano y romero < albahaca.

En cuanto al contenido medio de magnesio, las concentraciones medias, de mayor a menor, fueron: albahaca > orégano, tomillo, clavo y romero.

Al comparar los resultados encontrados en las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas en este estudio con los determinados por otros autores en otros países y localidades, se observó una gran variabilidad en los niveles de estos minerales (calcio y magnesio). Por lo tanto, la concentración media de calcio y magnesio presente en las hierbas aromáticas deshidratadas está influenciada por las condiciones climáticas y edáficas de los suelos de cultivo particulares de la zona geográfica de origen, así como por el tipo de especia, el clima y las prácticas agrícolas (Tokalioğlu, 2012).

Como se muestra en la Tabla 1, al comparar los hallazgos obtenidos en este estudio con los determinados en diferentes estudios realizados por otros investigadores en otros lugares, se observa una gran variabilidad en la concentración de hierro, cinc y cobre en las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas. Los resultados muestran que las concentraciones de estos minerales en las hierbas aromáticas deshidratadas dependen de su origen geográfico, ya que el suelo y las condiciones climáticas específicas de esa zona (Pohl *et al.*, 2016) determinan la cantidad final de hierro, cinc y cobre presentes en las estas hierbas.

En el caso específico del hierro, las concentraciones medias determinadas en nuestro estudio son considerablemente menores en romero, clavo, orégano y albahaca que en los estudios realizados por otros autores (Tabla 1); en el caso del tomillo, sólo en dos de los cinco trabajos de investigación incluidos, las concentraciones medidas determinadas fueron inferiores a las medidas en nuestro estudio.

En relación a los niveles de cinc encontrados en nuestro estudio, en comparación con los indicados por otros autores en la Tabla 1, en el tomillo, el romero, el orégano y la albahaca en todos los estudios, a excepción de uno, se recogieron niveles superiores a los determinados por nosotros; en el caso del clavo, los dos estudios considerados (Özcan *et al.*, 2008; Seddigi *et al.*, 2016) recogieron concentraciones medias considerablemente superiores a las medidas en nuestro estudio.

En referencia a los niveles de cobre, las concentraciones medias determinadas en nuestro estudio son similares a las medidas en dos de los estudios incluidos en la Tabla 1 para el tomillo y el romero, y es destacable que en la albahaca son superiores a las determinadas en los cuatro estudios diferentes incluidos (Tabla 1).

Por lo tanto, globalmente en nuestro estudio, las concentraciones medias de cinc e hierro determinadas en las hierbas aromáticas deshidratadas consideradas son bajas, inferiores a las medidas por otros autores, y cumplen con las normas de seguridad, como otros autores (Seddigi *et al.*, 2016) afirmaron para el clavo, entre otras hierbas y especias.

Se han correlacionado los niveles de los metales evaluados en las hierbas aromáticas deshidratadas consideradas. Se ha observado que las concentraciones de cinc se correlacionan lineal y significativamente con las de hierro ($r = 0,666$, $p < 0,001$) y cobre ($r = 0,733$, $p < 0,001$), así como las de hierro con cobre ($r = 0,667$, $p < 0,001$). Del mismo modo, en algunas hierbas e infusiones, otros autores (Kara, 2009) encontraron correlaciones lineales y positivas entre el cinc y el hierro y el cobre, así como entre el hierro y el cobre.

Según diversos investigadores (Seddigi *et al.*, 2016; Ejaz *et al.*, 2018; Sabina *et al.*, 2019), la absorción de elementos potencialmente tóxicos por parte de las plantas (como las hierbas aromáticas), especialmente por la presencia de altas concentraciones en los suelos de origen (lo que podría ocurrir para el hierro, el cinc y el cobre), es una importante vía por la que pueden entrar en la cadena alimentaria, lo que puede llevar a la bioacumulación en estas hierbas y, tras el consumo humano, provocar efectos tóxicos.

En este sentido, otros investigadores indican que un exceso de hierro actuaría como prooxidante y podría ser tóxico para las células, promoviendo la generación de radicales libres que dañan sus membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos (Sabina *et al.*, 2019). Sin embargo, los bajos niveles medios de hierro, cinc y cobre en las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas no constituyen, en principio, un riesgo de efectos tóxicos de estos metales para el ser humano.

Por el contrario, como elementos esenciales (como se referirá más adelante), su ingesta diaria en la dieta no cubre más del 1,6 % de la ingesta dietética diaria recomendada para hombres y mujeres adultos sanos (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2002). Otros autores (Ortega-Ramírez *et al.*, 2014; Adeyinka *et al.*, 2015; Potortì *et al.*, 2020) señalan que algunos metales pesados están presentes en las especias y plantas aromáticas en diversas concentraciones, debido al uso de agua de riego contaminada, a la adición de fertilizantes y herbicidas al suelo para cultivar, y a la deposición aérea en el follaje de las plantas de los contaminantes ambientales derivados del uso de combustibles fósiles y de las actividades industriales.

Dado el carácter esencial de estos elementos, se ha estimado que un hombre y una mujer adultos y sanos podrían obtener un cierto porcentaje de su respectiva ingesta diaria recomendada, según lo establecido por el Instituto de Medicina, a través de su dieta diaria (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2002). Teniendo en cuenta las concentraciones medias determinadas para hierro, cinc y cobre en todas las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas, con valores de $82,6 \pm 5,67$, $11,95 \pm 0,509$, $6,85 \pm 0,487$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente, y el hecho de que la ingesta media diaria estimada es muy baja (1,5 g/día), la ingesta diaria sería de 0,124, 0,018 y 0,010 mg/día, lo que supone el 1,55 %, 0,164 % y 1,13 % de la ingesta dietética recomendada para un hombre adulto sano, y 0,689 %, 0,212 % y 1,13 % de la ingesta dietética recomendada para una mujer adulta sana, respectivamente (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 2002). Otros autores (Potortì *et al.*, 2020) también informaron de que la ingesta de elementos esenciales (como el hierro, el cinc y el cobre) a través de las especias y hierbas aromáticas de Sicilia (Italia) y Mahdia (Túnez) era pequeña.

En nuestro estudio, se ha comprobado que el crecimiento de *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* y microorganismos psicrófilos aumenta con las concentraciones de hierro, cinc y cobre en las hierbas aromáticas deshidratadas consideradas (Tabla 3). Además, se comprobó que la albahaca tiene las mayores concentraciones de hierro, cinc y cobre (Figura 1A, 1B y 1C). Por todo ello, además de la posible mayor contaminación de la albahaca por microorganismos y su acción como vehículo del medio de cultivo microbiano, no se puede obviar la posibilidad de que el mayor contenido de hierro, cinc y cobre en esta hierba aromática pudiera actuar como factor de crecimiento de los microorganismos patógenos alimentarios analizados.

Las concentraciones más bajas de hierro, cinc y cobre se encontraron en el clavo (Figura 1A, 1B y 1C), hierba aromática en la que no hubo crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus*. Además, en el clavo el desarrollo de microorganismos psicrófilos fue menor que en el tomillo y la albahaca, el crecimiento de microorganismos mesófilos fue menor que en la albahaca, y el desarrollo de mohos y levaduras fue menor que en el romero y la albahaca. Por todo ello, además de la menor contaminación microbiana del clavo, no se puede descartar la posibilidad de que el menor contenido de hierro, cinc y cobre en esta hierba aromática pudiera disminuir el desarrollo y riesgo de estos microorganismos patógenos alimentarios, ya que la hierba no presenta niveles adecuados de hierro, cinc y cobre para promover su crecimiento.

Para aclarar este aspecto, deberían planificarse futuros estudios en los que se añadan cantidades crecientes de hierro, cinc y cobre al medio de cultivo, junto con las diferentes hierbas aromáticas deshidratadas, para evaluar en qué medida esto está relacionado con un mayor crecimiento microbiano. Esto permitiría determinar la cantidad de estos minerales a añadir al medio de cultivo para ejercer un efecto estimulante del crecimiento.

Para el calcio y el magnesio, los niveles medios determinados en hierbas aromáticas deshidratadas como el tomillo, el romero y el orégano en supermercados y vendedores ambulantes del sureste de España, son considerablemente más bajos (entre 20 y 40 veces más bajos) que los indicados en las mismas hierbas aromáticas deshidratadas de los mercados locales de Sicilia (Italia) y Mahdia (Túnez) (Zengin *et al.*, 2008) (Tabla 2). Sin embargo, los niveles medios de calcio y magnesio en las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas en este estudio son superiores a los medidos por otros autores en otras zonas, como se muestra en la Tabla 2.

En relación con la posible influencia del sistema de comercialización de las hierbas aromáticas deshidratadas en las concentraciones de calcio y magnesio presentes, se ha observado que las concentraciones determinadas en las hierbas aromáticas deshidratadas comercializadas en PET fueron inferiores a las comercializadas a granel sólo para el magnesio (Tabla 4). Este hallazgo, tal y como se ha indicado anteriormente, se debe probablemente a la acumulación de polvo o suciedad en las muestras comercializadas a granel o incluso a las diferencias en el contenido de magnesio entre los diferentes tipos de hierbas aromáticas deshidratadas estudiadas.

También se ha estimado la ingesta diaria de calcio y magnesio como elementos esenciales de las hierbas aromáticas deshidratadas estudiadas teniendo en cuenta la concentración media actual de $18,7 \pm 0,99$ y $6,20 \pm 0,37$ mg/g (peso seco: DW), respectivamente, y la cantidad media consumida en Europa de 0,78 g/persona/día (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, 2013). Por tanto, la ingesta media diaria sería de $14,6 \pm 0,77$ y $4,84 \pm 0,29$ mg/día (DW), respectivamente. Teniendo en cuenta las ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población adulta sana (mujeres y hombres de 31 a 50 años) para la población norteamericana (Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, 1998) fijadas en 1.000 mg/día para el calcio (en hombres y mujeres), y en 420 (en hombres) y 320 mg/día (en mujeres) para el magnesio, el porcentaje de cobertura de las IDR por parte de las especias sería de $1,46 \pm 0,08$ %, y de $1,15 \pm 0,07$ y $1,51 \pm 0,09$ % para el calcio y el magnesio, respectivamente. Como se puede observar, las hierbas aromáticas deshidratadas son malas fuentes de calcio y magnesio, probablemente debido a su baja ingesta en la dieta diaria, como también indicaron otros investigadores (Potorti *et al.*, 2020).

Los niveles de calcio se relacionaron lineal y positivamente con el contenido de magnesio en hierbas aromáticas deshidratadas estudiadas ($r = 0,447$, $p < 0,001$). Estudios previos indicaron que las concentraciones de calcio presentes en diferentes grupos de alimentos (carnes y derivados, legumbres, cereales, frutos secos, frutas, verduras, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, productos lácteos, agua de bebida y otros alimentos; Jodral-Segado *et al.*, 2003) se correlacionaron lineal y positivamente con las de magnesio, a excepción del presente en los productos de la pesca, lo que refleja la existencia de una relación positiva entre ambos elementos en los alimentos, como hemos comprobado adicionalmente en las hierbas aromáticas deshidratadas.

En este estudio se ha observado cómo la albahaca es la hierba aromática deshidratada que presenta mayores niveles de calcio y magnesio, como también han encontrado otros (Özcan *et al.*, 2008; Zengin *et al.*, 2008) (Tabla 4). Además, para los niveles de calcio, se ha encontrado que se establece una débil correlación lineal positiva con el crecimiento de *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras. Los niveles de magnesio también se correlacionaron positiva y principalmente de forma débil con los recuentos microbianos de *B. cereus*, *C. perfringens* y los microorganismos mesófilos aerobios. En consecuencia, la albahaca es la hierba aromática deshidratada que sufre una mayor contaminación y desarrollo microbiano (García-Galdeano *et al.*, 2020) cuando se añade al medio de cultivo, lo que podría estar relacionado con el hecho de que el calcio y el magnesio podrían actuar posiblemente como factores de crecimiento para algunos de los microorganismos patógenos alimentarios determinados, lo que debería comprobarse en futuros estudios.

Para el calcio, como otros autores también encontraron (Özcan *et al.*, 2008), los niveles más bajos se determinaron en el clavo (Figura 1D), siendo la hierba aromática deshidratada en la que se observó el menor crecimiento de microorganismos (de hecho, no hubo recuento microbiano de *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus*; García-Galdeano *et al.*, 2020). Asimismo, el desarrollo de microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras fue inferior al establecido en la albahaca (García-Galdeano *et al.*, 2020). Por lo tanto, se puede destacar que el menor contenido de calcio determinado en el clavo podría estar relacionado con el menor desarrollo de estos microorganismos patógenos de origen alimentario, cuando esta hierba aromática, ya contaminada con ellos, fue mezclada previamente con sus medios de cultivo.

Al relacionar el **contenido de calcio y el magnesio con el crecimiento microbiano y los sistemas de envasado**, se encuentra que, en el PET y para ambos minerales, hay una correlación lineal positiva y significativa entre todos los microorganismos objeto de estudio (con la excepción de los microorganismos mesófilos para el calcio y los microorganismos psicrófilos para el magnesio). El hecho de que el aumento de los niveles de calcio y magnesio incrementara significativamente el crecimiento de *C. perfringens*, *B. cereus* y de gran parte del resto de microorganismos (*L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras) para las hierbas aromáticas deshidratadas envasadas en PET podría deberse a las características de permeabilidad al medio de este plástico en relación con los gases.

En este sentido, esta característica permitiría la creación de un sistema de atmósfera modificada pasiva de forma natural que equilibrara el oxígeno y el dióxido de carbono en el interior de estos envases de PET, favoreciendo el crecimiento de determinados microorganismos. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Drake *et al.*, 2005) quienes concluyeron que el efecto que las atmósferas modificadas podrían tener sobre el crecimiento microbiano es en gran medida desconocido, ya que depende en gran medida de las propiedades de barrera de los materiales utilizados. En general, las bacterias Gram negativas son más sensibles al CO₂ que las Gram positivas. Sin embargo, en aquellos envases en los que se consigue una atmósfera equilibrada entre las concentraciones de O₂ y CO₂ durante el almacenamiento, el crecimiento de los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos no se vería inhibido de la forma esperada (Brody *et al.*, 2003), ya que el propio envase crea una atmósfera pasiva debido a su permeabilidad a estos gases, lo que coincide con los resultados de este estudio.

Lo indicado con anterioridad explicaría por qué en este estudio *C. perfringens* y *B. cereus* pudieron sobrevivir bien dentro de los envases de PET, al igual que cuatro de los restantes microorganismos estudiados, actuando el calcio y el magnesio presentes en las hierbas aromáticas deshidratadas como otro factor estimulante del crecimiento bacteriano, además de la atmósfera creada dentro de los envases de PET. Los resultados obtenidos en este estudio estarían también en consonancia con los reportados por otros investigadores (Miranda *et al.*, 2014), quienes encontraron que *C. perfringens* y *B. cereus* podían sobrevivir bien dentro de los envases de polipropileno. Estos autores afirmaron que la concentración de oxígeno en el interior de los envases de polipropileno destinados a contener frutos secos alcanzó el equilibrio con el oxígeno exterior durante el almacenamiento, creando una atmósfera pasiva modificada en su interior, ya que el polipropileno es un plástico semipermeable con características de permeabilidad al O₂ y al CO₂ similares a las del PET (Miranda *et al.*, 2014).

Los alimentos con baja actividad de agua, como las hierbas aromáticas deshidratadas, son susceptibles de ser atacados por mohos y levaduras que pueden crecer en ausencia de O₂ y resistir altas concentraciones de CO₂. La misma situación se daría en el caso de los microorganismos anaerobios como *C. perfringens*.

Esto podría explicar por qué se ha encontrado una correlación lineal positiva entre el crecimiento de *C. perfringens* y el contenido de calcio y magnesio en las hierbas, así como entre el crecimiento de mohos y levaduras y los niveles de magnesio en las muestras envasadas en vidrio, ya que el vidrio es un material impermeable al oxígeno (Balzarotti *et al.*, 2015). Como el vidrio es un material de alta barrera, se utiliza para envasar alimentos en los que hay que evitar la transferencia de materia gaseosa en forma de vapores y olores desde el interior del envase al exterior. Se sabe que las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas se utilizan en la cocina tradicional como condimentos por su potencial odorífero y aromatizante debido a los aceites esenciales presentes en su composición, lo que haría del vidrio un material de envasado ideal frente a otros materiales con propiedades de barrera medias como el PET.

En general, cuando las hierbas aromáticas deshidratadas se envasaron en vidrio, se observa que no hay una correlación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los contenidos de calcio y magnesio y el crecimiento microbiano para *L. monocytogenes* (microorganismo anaerobio) y *B. cereus* (microorganismo aerobio). El crecimiento de los microorganismos mesófilos y de los microorganismos psicrófilos en las hierbas fue positivo, lineal y se correlacionó significativamente con los niveles de calcio en el vidrio ($p < 0,05$), pero no con el contenido de magnesio ($p > 0,05$). Sin embargo, el grado de crecimiento de todos los microorganismos estudiados fue menor en las hierbas envasadas en vidrio que en PET.

No existe literatura científica que relacione el crecimiento microbiano de las hierbas aromáticas deshidratadas con el contenido mineral (calcio y magnesio) y los sistemas de comercialización. Por ello, con este estudio y el descrito anteriormente para el hierro, cinc y cobre (García-Galdeano *et al.*, 2020), se destaca la importancia de elegir el sistema de envasado más adecuado que genere el menor impacto sobre las hierbas aromáticas deshidratadas durante todo su ciclo de vida, no sólo desde el punto de vista organoléptico sino también de la calidad higiénica. Esta elección tiene que estar relacionada con las características específicas de las barreras de los envases frente a gases alterantes como el O₂ y el CO₂, y los contenidos de calcio y magnesio en las hierbas que podrían actuar como factores de crecimiento microbiano.

Por el contrario, otros estudios han informado de que el calcio y el magnesio añadidos como cationes o como diferentes sales ejercieron un efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* (Oknin *et al.*, 2015; Vizzini *et al.*, 2020), hongos (Sawai *et al.*, 2004), especies de *Bacillus* (López-Carballo *et al.*, 2008; Bandara *et al.*, 2012) y *C. perfringens* (Yasugi *et al.*, 2016) cuando se utilizaron como componentes de nanopartículas o envases activos, aumentando la vida útil de diferentes alimentos. Sin embargo, en este estudio, el efecto estimulante fue realizado por el calcio y el magnesio presentes en las hierbas aromáticas deshidratadas directamente sobre el crecimiento microbiano de los microorganismos patógenos de origen alimentario también existentes en ellas. En consecuencia, en el futuro deberían realizarse más estudios para descubrir el mejor material de envasado para las hierbas aromáticas deshidratadas. Esto permitiría hacer frente al crecimiento de los microorganismos patógenos alimentarios descritos para garantizar finalmente la calidad higiénica y sanitaria de estos productos y proteger la salud del consumidor.

5. Conclusiones

1) El contenido de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio varía según la hierba aromática deshidratada.

2) Los niveles medios de hierro determinados en el tomillo y la albahaca son similares, y superiores, a los de las demás hierbas aromáticas deshidratadas. Las concentraciones medias más altas se encontraron en la albahaca para el cinc y el cobre, y en el tomillo y la albahaca para el hierro, y las más bajas en el clavo para estos tres minerales analizados.

3) Las concentraciones medias de cinc y cobre fueron diferentes entre todas las hierbas aromáticas deshidratadas, con la excepción del tomillo y el orégano. Los niveles medios más altos de cinc y cobre se encontraron en la albahaca, seguidos de los presentes en tomillo y orégano, romero y clavo.

4) El contenido de calcio difería entre todas las hierbas aromáticas deshidratadas, excepto el orégano y el romero. Las concentraciones más bajas se midieron en el clavo.

5) En cuanto al magnesio, sólo fueron diferentes las concentraciones medias determinadas en la albahaca.

6) Las medias más altas de calcio y magnesio se determinaron en la albahaca.

7) Las concentraciones de calcio y magnesio presentes en las hierbas aromáticas deshidratadas podían estimular el crecimiento de la mayoría de los microorganismos patógenos de origen alimentario estudiados.

8) Los niveles de hierro determinados en las hierbas aromáticas deshidratadas comercializadas en PET fueron inferiores a las comercializadas en vidrio o a granel. El sistema de comercialización (envase de vidrio o PET, o venta a granel) no influye en el contenido de cinc y cobre en las hierbas aromáticas deshidratadas analizadas.

9) Los recuentos microbianos de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras aumentaron moderadamente con las concentraciones de calcio y magnesio presentes en las hierbas aromáticas deshidratadas envasadas en PET, a excepción de los microorganismos mesófilos y psicrófilos, respectivamente.

Esta relación entre los niveles de calcio y magnesio, y el crecimiento microbiano para la mayoría de los microorganismos alimentarios estudiados, fue especialmente significativa cuando se utilizó el PET frente al vidrio como material de envasado para las hierbas aromáticas deshidratadas. El crecimiento de *C. perfringens* y *B. cereus* aumentó fuertemente con los niveles de calcio y moderadamente con los de magnesio presentes en las hierbas aromáticas deshidratadas envasadas en PET.

10) Las concentraciones de hierro, cinc y cobre se correlacionaron positivamente con el crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* y microorganismos psicrófilos ($p < 0,05$) por lo que podrían actuar como factor de crecimiento de los patógenos transmitidos por los alimentos.

11) Los contenidos de calcio y magnesio en las hierbas aromáticas deshidratadas se correlacionaron lineal y positivamente.

6. Bibliografía

1. Abou-Arab, A.A.K.; Abou Donia, M.A. Heavy metals in egyptian spices and medicinal plants and the effect of processing on their levels. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2300-2304.
2. Adeyinka, A.; Richard, F. Application of phytochemical extracts and essential oils in food products. *J. Int. J. Biotechnol. Food Sci.* **2015**, *3*, 31-35.
3. Akthar, M.; Degaga, B.; Azam, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Biol. Sci. Pharm. Res.* **2014**, *2*, 1-7.
4. Andrade, M.; Ribeiro-Santos, R.; Costa Bonito, M.C.; Saraiva, M.; Sanchez-Silva, A. Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *92*, 497-508.
5. Arantes, S.; Picarra, A.; Candeias, F.; Caldeira, A.T.; Martins, M.R.; Teixeira, D. Antioxidant activity and cholinesterase inhibition studies of four flavouring herbs from Alentejo. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 2183-2187.
6. Balzarotti, S.; Maviglia, B.; Biassoni, F.; Ciceri, M. Glass vs. Plastic: Affective Judgments of Food Packages After Visual and Haptic Exploration. *Procedia Manuf.* **2015**, *3*, 2251-2258.
7. Bandara, N.; Jo, J.; Ryu, S.; Kim, K.P. Bacteriophages BCP1-1 and BCP8-2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented foods. *Food Microbiol.* **2012**, *31*, 9-16.
8. Bassanetti, I.; Carcelli, M.; Buschini, A.; Montalbano, S.; Leonardi, G.; Pelagatti, P.; Tosi, G.; Massi, P.; Fiorentini, L.; Rogolino, D. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control* **2017**, *73*, 606-612.
9. Braunstein, E.M. Anemia ferropénica **2020**.
10. Brody, A.L. Modified Atmosphere Packaging. In *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*; Heldman, D.R., Moraru, C., Eds.; Taylor & Francis: New York, NY, USA, **2003**, 666-670.
11. Bua, D.G.; Annuario, G.; Albergamo, A.; Cicero, N.; Dugo, G. Heavy metals in aromatic spices by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **2016**, *9*, 210-216.

12. Bukva, M.; Kapo, D.; Huseinbašić, N.; Gojak-Salimović, S.; Huremović, J. Iron content in fruits, vegetables, herbs and spices samples marketed in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. *Kem. Ind.* **2019**, *68*, 281-287.
13. Cantú-Valdéz, J.A.; Gutiérrrez-Soto, G.; Hernández-Martínez, C.A.; Sinagawa-García, S.R.; Quintero-Ramos, A.; Hume, M.E.; Herrera-Balandrano, D.D.; Méndez-Zamora, G. Mexican oregano essential oils as alternatives to butylated hydroxytoluene to improve the shelf life of ground beef. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 4555-4564.
14. Cervera-Mata, A.; Navarro-Alarcón, M.; Delgado, G.; Pastoriza, S.; Montilla-Gómez, J.; Llopis, J.; Sánchez-González, C.; Rufián-Henares, J.A. Spent coffee grounds improve the nutritional value in elements of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and are an ecological alternative to inorganic fertilizers. *Food Chem.* **2019**, *282*, 1-8.
15. Di Bella, G.; Potortì, A.G.; Lo Turco, V.; Bua, D.; Licata, P.; Cicero, N.; Dugo, G. Trace elements in *Thunnus thynnus* from Mediterranean sea and benefit-risk assessment for consumers. *Food Add. Contam. Part B-Surveill.* **2015**, *8*, 175-181.
16. Drake, S.; Elfving, D.; Visser, D.; Drake, S. Quality of modified atmosphere packaged “bartlett” pears as influenced by time and type of storage. *J. Food Process. Preserv.* **2005**, *28*, 348-358.
17. Ejaz, M.; Arfat, Y.A.; Mulla, M.; Ahmed, J. Zinc oxide nanorods/clove essential oil incorporated Type B gelatin composite films and its applicability for shrimp packaging. *Food Packag. Shelf Life* **2018**, *15*, 113-121.
18. Embuscado, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - a mini review. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 811-819.
19. Flores, M.; González, E.; Escalona, V. Uso de atmósferas modificadas en los productos de IV Gama. *Centro de Estudios Postcosecha (CEPOC)*. Universidad de Chile, **2020**, *6*.
20. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) **2013**.
21. Farshchi, H.K.; Azizi, M.; Jaafari, M.R.; Nemati, S.H.; Fotovat, A. Green synthesis of iron nanoparticles by rosemary extract and cytotoxicity effect evaluation on cancer cell lines. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *16*, 54-62.

22. Ferriccioni, N.; Mateucci, R.; Zangrando, A.; Santana, S.; Campos, C.A. Effect of decontamination treatment on the quality of dehydrated thyme, coriander, and mustard. *Food Sci. Technol. Int.* **2019**, *25*, 579-587.
23. García-Galdeano, J.M.; Villalón-Mir, M.; Medina-Martínez, J.; Vázquez-Foronda, L.M.; Zamora-Bustillos, J.G.; Agil, A.; Moor-Davie, S.M.F.; Navarro-Alarcón, M. Zn, Cu, and Fe Concentrations in Dehydrated Herbs (Thyme, Rosemary, Cloves, Oregano, and Basil) and the Correlation with the Microbial Counts of *Listeria monocytogenes* and Other Foodborne Pathogens. *Foods* **2020**, *9*, 1658.
24. Hanif, M.A.; Nawaza, H.; Ayub, M.A.; Tabassum, N.; Kanwal, N.; Rashid, N.; Saleem, M.; Ahmad, M. Evaluation of the effects of Zinc on the chemical composition and biological activity of basil essential oil by using Raman spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *96*, 91-101.
25. Hinneburg, I.; Dorman, H.J.D.; Hiltunen, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* **2005**, *97*, 122–129.
26. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients*, **2002**.
27. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: A Risk Assessment Model for Establishing Upper Intake Levels for Nutrients, Nutrition Reviews. Washington (DC): National Academies Press (US); **1998**.
28. Jodral-Segado, A.M.; Navarro-Alarcón, M.; López-García de la Serrana, H.; López-Martínez, M.C. Magnesium and calcium contents in foods from SE Spain: Influencing factors and estimation of daily dietary intakes. *Sci. Total Environ.* **2003**, *312*, 47-58.
29. Kara, D. Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chem.* **2009**, *114*, 347-354.
30. Kirtil, E.; Kilercioğlu, M.; Oztop, M. Modified Atmosphere Packaging of Foods. *Reference Module in Food Science*, **2016**, 1-6.
31. Kumar, M.; Srivastava, S. Effect of calcium and magnesium on the antimicrobial action of enterocin LR/6 produced by *Enterococcus faecium* LR/6. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 572-575.

32. Lechowicz, J.; Krawczyk-Balska, A. An update on the transport and metabolism of iron in *Listeria monocytogenes*: the role of proteins involved in pathogenicity. *Biometals* **2015**, *28*, 587-603.
33. Lenz, C.A.; Vogel, R.F. Effect of sporulation medium and its divalent cation content on the heat and high pressure resistance of *Clostridium botulinum* type E spores. *Food Microbiol.* **2014**, *44*, 156-167.
34. López-Carballo, G.; Hernández-Muñoz, P.; Gavara, R.; Ocio, M.J. Photoactivated chlorophyllin-based gelatin films and coatings to prevent microbial contamination of food products. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *126*, 65-70.
35. Martínez, L.; Bastida, P.; Castillo, J.; Ros, G.; Nieto, G. Green alternatives to synthetic antioxidants, antimicrobials, nitrates, and nitrites in clean label Spanish chorizo. *Antioxidants* **2019**, *8*, 184.
36. Martínez de Victoria, E. Calcium, essential for health', *Nutrición Hospitalaria*, **2016**, *33*, 26-31.
37. Mataix, J. Nutrición para educadores. Fundación Universitaria Iberoamericana. Ed. Díaz de Santos **2013**.
38. Miranda, G.; Berna, À.; González, R.; Mulet, A. The storage of dried apricots: The effect of packaging and temperature on the changes of texture and moisture. *J. Food Process. Preserv.* **2014**, *38*, 565-572.
39. Mohammadi, S.; Jazani, N.H.; Kouhkan, M.; Babaganjeh, L. Antibacterial effects of microbial synthesized silver-copper nanoalloys on *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Listeria monocytogenes* and *Brucella abortus*. *Iran. J. Microbiol.* **2018**, *10*, 171-179.
40. Mohapatra, S.; Leelavathi, L.; Meignana, A.I.; Arumugham, I.; Pradeep, K.R.; Rajeshkumar, S. Assessment of antimicrobial efficacy of zinc oxide nanoparticles synthesized using clove and cinnamon formulation against oral pathogens - An in vitro study. *J. Evol. Med. Dental Sci.* **2020**, *9*, 2034-2039.
41. Moreno, R. Nutrición y Dietética para Tecnólogos de Alimentos. Ed. Díaz de Santos **2000**.
42. Muñoz, M.; Campos, A.; García, J.A.; Ramírez, G. Fisiopatología del metabolismo del hierro: implicaciones diagnósticas y terapéuticas. *Nefrología* **2005**, *XXV* (1), 11.

43. Navarro-Alarcón, M.; Gil-Hernández, F.; Sánchez-González, C.; Llopis, J.; Villalón-Mir, M.; Olmedo, P.; Alarcón-Guijo, P.; Salagre, D.; Gaona, L.; Paredes, M.; Agil, A. Melatonin improves levels of Zn and Cu in the muscle of diabetic obese rats. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1535.
44. Nawaz, H.; Hanif, M.A.; Ayub, M.A.; Ishtiaq, F.; Kanwal, N.; Rashid, N.; Saleem, M.; Ahmad, M. Raman spectroscopy for the evaluation of the effects of different concentrations of Copper on the chemical composition and biological activity of basil essential oil. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectr.* **2017**, *185*, 130-138.
45. Obiajunwa, E.I.; Adebajo, A.C.; Omobuwajo, O.R. Essential and trace element of some Nigerian medicinal plants. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2002**, *252*, 473-476.
46. Oknin, H.; Steinberg, D.; Shemesh, M. Magnesium ions mitigate biofilm formation of *Bacillus* species via downregulation of matrix genes expression. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 907.
47. Ortega-Ramírez, L.A.; Rodríguez-García, I.; Leyva, J.M.; Cruz-Valenzuela, M.R.; Silva-Espinoza, B.A.; González-Aguilar, G.A.; Siddiqui, M.W.; Ayala-Zavala, J.F. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, R129-R137.
48. Özcan, M.M.; Akbulut, M. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. *Food Chem.* **2008**, *106*, 852-858.
49. Papageorgiou, G.; Botsoglou, N.; Govaris, A.; Giannenas, I.; Iliadis, S.; Botsoglou, E. Effect of dietary oregano oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2003**, *87*, 324-335.
50. Pohl, P.; Dzimitrowicz, A.; Jedryczko, D.; Szymczycha-Madeja, A.; Welna, M.; Jamroz, P. The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *130*, 326-335.
51. Potortì, A.G.; Bua, G.D.; Lo Turco, V.; Ben Tekaya, A.B.; Beltifa, A.; Ben Mansour, H.; Dugo, G.; Di Bella, G. Major, minor and trace element concentrations in spices and aromatic herbs from Sicily (Italy) and Mahdia (Tunisia) by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chem.* **2020**, *313*, 126094.

52. Sabina, R.O.; Santos, E.S.; Abreu, M.M. Accumulation of Mn and Fe in aromatic plant species from the abandoned Rosalgar Mine and their potential risk to human health. *Appl. Geochem.* **2019**, *104*, 42-50.
53. Sawai, J.; Yoshikawa, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 803-809.
54. Seddigi, Z.S.; Kandhro, G.A.; Shah, F.; Danish, E.; Soylak, M. Assessment of metal contents in spices and herbs from Saudi Arabia. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, *32*, 260-269.
55. Shim, J.; Cho, T.; Leem, D.; Cho, Y.; Lee, C. Heavy metals in spices commonly consumed in Republic of Korea. *Food Addit. Contam. Part B-Surveill.* **2019**, *12*, 52-58.
56. Srinivasan, K. Plant foods in the management of diabetes mellitus: Spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2005**, *56*, 399-414.
57. Symeonidis, A.; Marangos, M. Iron and microbial growth. In: Insight and control of infectious; Priti, R., Ed. InTech: Rijeka, Croatia **2012**, 289-330.
58. Tokalioğlu, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chem.* **2012**, *134*, 2504-2508.
59. Vizzini, P.; Beltrame, E.; Zanet, V.; Vidic, J.; Manzano, M. Development and evaluation of qPCR detection method and Zn-MgO/alginate active packaging for controlling *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked salmon. *Foods* **2020**, *9*, 1353.
60. Wang, Y.; Cen, C.; Chen, J.; Fu, L. MgO/carboxymethyl chitosan nanocomposite improves thermal stability, waterproof and antibacterial performance for food packaging. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *236*, 116078.
61. Weisany, W.; Samadi, S.; Amini, J.; Hossaini, S.; Yousefi, S.; Maggi, F. Enhancement of the antifungal activity of thyme and dill essential oils against *Colletotrichum nymphaeae* by nano-encapsulation with copper NPs. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *132*, 213-225.
62. Yasugi, M.; Otsuka, K.; Miyake, M. Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strain NCTC8239. *Microbiol. Immunol.* **2016**, *60*, 657-668.

63. Zengin, M.; Özcan, M.M.; Çetin, Ü.; Gezin, S. Mineral contents of some aromatic plants, their growth soils and infusions. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 581-589.
64. Zhou, F.B.; Jongberg, S.; Zhao, M.M.; Sun, W.Z.; Skibsted, L.H. Antioxidant efficiency and mechanisms of green tea, rosemary or mate extracts in porcine Longissimus dorsi subjected to iron-induced oxidative stress. *Food Chem.* **2019**, *298*, 125030.

CAPITULO IV

**INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE DIFERENTES MINERALES,
EN HIERBAS AROMÁTICAS FRESCAS Y VERDURAS FRESCAS,
EN EL CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y
OTROS PATÓGENOS DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA**

1. Introducción

Como ya hemos expuesto en capítulos anteriores, las verduras frescas cortadas son productos saludables mínimamente procesados que han despertado el interés del consumidor gracias a su comodidad y al creciente interés por llevar una dieta equilibrada (Santos *et al.*, 2014). Una nutrición óptima ha de proporcionar la cantidad necesaria de nutrientes (carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y minerales) y también promover la salud, mejorar el bienestar y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades (presencia de compuestos antioxidantes) (Viuda-Martos *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2012). Las hortalizas mínimamente procesadas, también denominadas productos listos para su uso (ready-to-eat, RTE), cortados o precortados, son frutas y hortalizas crudas que han sido lavadas, peladas, cortadas en rodajas, picadas o desmenuzadas antes de ser envasadas para su consumo (Barry-Ryan *et al.*, 1998). También se definen como aquellos sometidos a algunas técnicas de procesamiento de menor magnitud que el enlatado o la congelación pero que, sin embargo, añaden valor al producto antes de su distribución y consumo (King *et al.*, 1989). La comercialización de frutas y hortalizas mínimamente procesadas se ve limitada por su corta vida útil y el rápido deterioro de sus componentes debido al daño de los tejidos como resultado del procesamiento, por ejemplo, el lavado o el corte, y el crecimiento microbiano (Watada *et al.*, 1999). En los últimos años, el uso de compuestos fisiológicamente activos (Physiologically Active Compounds, PAC) ha despertado el interés de los consumidores y de la industria (minerales, probióticos, etc.) (Alzamora *et al.*, 2005).

Actualmente, no cabe duda de que la Dieta Mediterránea es muy equilibrada y saludable, siendo las verduras una parte fundamental de la misma. El consumo de verduras aporta grandes beneficios a la salud del ser humano, tales como un óptimo crecimiento y desarrollo de los niños, una vida más prolongada, mejor salud mental, salud cardiovascular, menor riesgo de padecer cáncer, menor riesgo de obesidad, menor riesgo de sufrir diabetes, mejor salud intestinal y una mejora de la inmunidad (Cámara *et al.*, 2011). Sin embargo, cada vez es más evidente que las frutas y hortalizas, y en particular las verduras de hoja verde que se consumen crudas, son importantes vehículos de transmisión de patógenos humanos que tradicionalmente se asociaban a los alimentos de origen animal (Berger *et al.*, 2010).

Las verduras frescas son una parte importante de una dieta equilibrada y las verduras de IV Gama mínimamente procesadas son una opción que puede adaptarse fácilmente al acelerado estilo de vida de los consumidores actuales (Tomás-Callejas *et al.*, 2011). La industria de la IV Gama está en continua evolución y persigue nuevas variedades e innovaciones para satisfacer las expectativas del consumidor en términos de comodidad, frescura, nuevos sabores y calidad (Martínez-Sánchez *et al.*, 2012).

Las verduras proporcionan importantes fitoquímicos como fibra, vitaminas, antioxidantes y minerales. Puesto que los minerales tienen funciones esenciales en el metabolismo humano, se ha considerado la posibilidad de enriquecer productos de consumo fresco, como muchas hortalizas, aumentando el contenido de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio, entre otros minerales (Buturi *et al.*, 2021).

Algunos autores (Bosiacki *et al.*, 2009) determinaron el contenido de hierro, cinc y cobre, entre otros minerales, en las partes comestibles de algunas hortalizas frescas vendidas en los mercados de Poznan (Polonia). **Para el hierro**, la mayor concentración se encontró en las hojas de puerro y la menor en los frutos de tomate y pepino; **para el cobre** la mayor concentración se encontró en las raíces de apio y la menor en las hojas de col; **respecto al cinc**, el mayor contenido se encontró en las hojas de lechuga y el menor en los frutos de tomate.

Respecto al **calcio** y al **magnesio**, el orégano, por ejemplo, es una especie vegetal bien adaptada a las condiciones de la tierra seca y a los suelos calcáreos. Tiene una alta concentración de calcio en la hoja en comparación con la mayoría de las otras especies de plantas donde la concentración es menor (Jefferies *et al.*, 1964, Bergmann, 1992). Aunque, el orégano se adapta bien a un amplio rango de condiciones de crecimiento y suelos, los desórdenes nutricionales causados por la deficiencia de calcio y magnesio pueden ser comunes, especialmente en suelos ácidos donde su disponibilidad se reduce significativamente (White *et al.*, 2003). Mientras que los síntomas severos de la deficiencia de calcio y magnesio pueden no encontrarse frecuentemente, se sabe que la deficiencia de estos minerales, incluso sin la aparición de ningún síntoma foliar visible, puede limitar significativamente el rendimiento del cultivo (Marschner, 1995).

Por otro lado, las hierbas aromáticas frescas de IV Gama se están convirtiendo en una opción de éxito dentro del mercado de la IV Gama, principalmente por su intenso sabor y comodidad. Son mínimamente procesadas (lavadas, cortadas y envasadas a temperaturas de refrigeración) para garantizar la seguridad y el mantenimiento de su frescura, ternura y uniformidad del color verde durante más tiempo (Barrett *et al.*, 2010). La seguridad microbiológica es de vital importancia, constituyendo uno de los parámetros de calidad más estudiados en estos productos (Jacxsens *et al.*, 2003; Caleb *et al.*, 2013). Sin embargo, la calidad nutricional también está ganando la atención de los consumidores que ahora están favoreciendo los productos alimenticios saludables y convenientes (Fan *et al.*, 2008; Alarcón-Flores *et al.*, 2014).

Las hierbas aromáticas frescas mínimamente procesadas y envasadas individualmente no tuvieron el éxito inicial reportado para otros productos frescos, debido a la alta perecibilidad de estas hojas (Luo *et al.*, 2004). Sin embargo, las hierbas aromáticas frescas tienen claras ventajas sobre el producto seco, ya que conservan más aroma (Curchet *et al.*, 2014). El procesamiento mínimo aumenta la tasa de respiración de los vegetales, lo que puede conducir a una aparición más rápida de los signos de senescencia en las hojas recién cortadas y, en consecuencia, a la pérdida de calidad (Martínez-Sánchez *et al.*, 2008; Junqueira-Gonçalves *et al.*, 2012).

2. Objetivos

En consecuencia, en este estudio se pretende:

- **Determinar las concentraciones de hierro, cinc, cobre calcio y magnesio en hierbas aromáticas frescas de uso común en España:** tomillo, romero, albahaca, eneldo y cilantro.

- **Determinar las concentraciones de hierro, cinc, cobre calcio y magnesio en verduras frescas, con y sin peciolo, de uso común en España:**

- **Con peciolo:** espinacas, acelgas y apio.
- **Sin peciolo:** escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg.

- **Determinar si los niveles de estos minerales influyen en los recuentos microbianos de patógenos alimentarios presentes en estas hierbas aromáticas frescas y verduras frescas:**

- *L. monocytogenes*.
- Microorganismos mesófilos.
- Microorganismos psicrófilos.
- Mohos y levaduras.

- **Estudiar las posibles correlaciones entre la presencia de peciolo en verduras frescas y su contenido en minerales con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios:** es decir, si el peciolo puede actuar como reservorio mineral y promover así el crecimiento de microorganismos patógenos alimentarios.

El objetivo es determinar si el contenido de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en hierbas aromáticas frescas y verduras frescas (con y sin peciolo) puede influir en su potencial uso como conservantes de alimentos crudos o, por el contrario, están positivamente relacionados con el crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras.

3. Materiales y métodos

3.1. Muestreo de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas

En relación con las hierbas aromáticas frescas, se analizaron muestras de tomillo, romero, albahaca, cilantro y eneldo (n = 18), todas ellas correspondientes a la IV Gama alimentaria. Como ya se ha expuesto en el Capítulo II, los productos de IV Gama son aquellos vegetales, frutas y hortalizas frescos que no han sufrido tratamiento térmico, pero han sido preparados, lavados y envasados en atmósferas modificadas para aumentar su tiempo de vida útil. Previo a su envasado, además, pueden haber sido troceados, cortados o sometidos a cualquier otra operación relativa a la integridad física del producto. Por tanto, son los que están listos para su consumo o su cocinado y destinados a ser consumidos por humanos (Carreres, 2006; Aguerri, 2014).

Las muestras de verduras analizadas fueron varias, presentando algunas de ellas una estructura que permite la unión de la hoja al tallo y que contribuye la orientación de la hoja hacia el sol. Este apéndice, como ya se ha expuesto en el Capítulo II, se conoce como peciolo, y se presenta en las muestras de espinacas, acelgas y apio analizadas en este apartado. Además, se incluyeron la escarola, la lechuga Romana y la lechuga Iceberg como verduras sin peciolo. En conclusión, las verduras analizadas fueron espinacas, escarola, lechuga Romana, lechuga Iceberg, acelgas y apio ($n = 36$), de las que una mitad correspondió a muestras de la I Gama y la otra mitad a muestras de la IV Gama. Las muestras se adquirieron en diferentes supermercados y pequeños comercios de España.

3.2. Análisis elemental de los minerales objeto de estudio en muestras de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas

Descrito en el apartado 3.2. del Capítulo III.

3.3. Métodos de análisis microbiológico

Descrito en el apartado 3.2. del Capítulo I.

3.4. Tratamiento estadístico

El estudio estadístico de los datos se realizó mediante el ANOVA o el test de Kruskal-Wallis. También se realizaron correlaciones lineales entre los niveles de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio y los recuentos microbianos comprobados en las hierbas aromáticas frescas y las verduras frescas, mediante los test de Pearson y Spearman. El nivel de significación se fijó en el 5 % ($p < 0,05$). Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS 22.0 para Windows (IBM SPSS Inc., Nueva York, NY, EE.UU.).

4. Resultados y discusión

4.1. Concentraciones de los minerales objeto de estudio en hierbas aromáticas frescas

En este apartado se estudia la concentración de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en tomillo, romero, albahaca, eneldo y cilantro.

4.1.1. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según el tipo de hierba aromática fresca

Las concentraciones de los minerales que han sido determinados en el presente estudio (hierro, cinc y cobre) varían en función de la hierba aromática de la que se trate (Tabla 1, Figuras 1, 2 y 3).

El nivel medio de **hierro** (Figura 1) más alto se obtuvo en el tomillo seguido del romero, no habiendo diferencias significativas entre ambos ($p > 0,05$). A su vez, éstos fueron significativamente más elevados que los de la albahaca, cilantro y eneldo ($p < 0,05$). Sin embargo no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones medias de hierro en albahaca, cilantro y eneldo ($p > 0,05$).

En el caso del **cinc** (Figura 2), se determinaron contenidos medios para la albahaca y el romero significativamente superiores con respecto al cilantro y eneldo ($p < 0,05$). Además, el eneldo fue la hierba aromática fresca que presentó concentraciones de cinc significativamente inferiores respecto a las restantes hierbas aromáticas, incluido el tomillo y cilantro ($p < 0,05$).

Para el **cobre** (Figura 3), los niveles medios en el eneldo fueron significativamente inferiores con respecto a las demás especias, tal y como ha sucedido en el también en el caso del cinc ($p < 0,05$). No se ha apreciado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de cobre presentes en albahaca, romero, tomillo y cilantro ($p > 0,05$):

Tabla 1. Concentraciones medias de Fe, Zn y Cu ($\mu\text{g/g}$) y error estándar sobre la media (EEM) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas

ESPECIAS FRESCAS	Fe \pm EEM	Zn \pm EEM	Cu \pm EEM
Tomillo	87,00 \pm 13,00 ^{bc}	5,20 \pm 1,40 ^{abc}	2,60 \pm 0,30 ^{abc}
Romero	75,80 \pm 10,40 ^b	5,80 \pm 0,80 ^{ab}	2,70 \pm 0,30 ^{ab}
Albahaca	39,50 \pm 10,40 ^a	7,20 \pm 0,50 ^a	3,50 \pm 0,90 ^a
Eneldo	19,60 \pm 1,00 ^{ad}	1,80 \pm 0,10 ^d	1,20 \pm 0,10 ^d
Cilantro	32,90 \pm 2,10 ^{ae}	3,60 \pm 0,30 ^{ce}	2,50 \pm 0,40 ^{abcde}

^{abcde} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

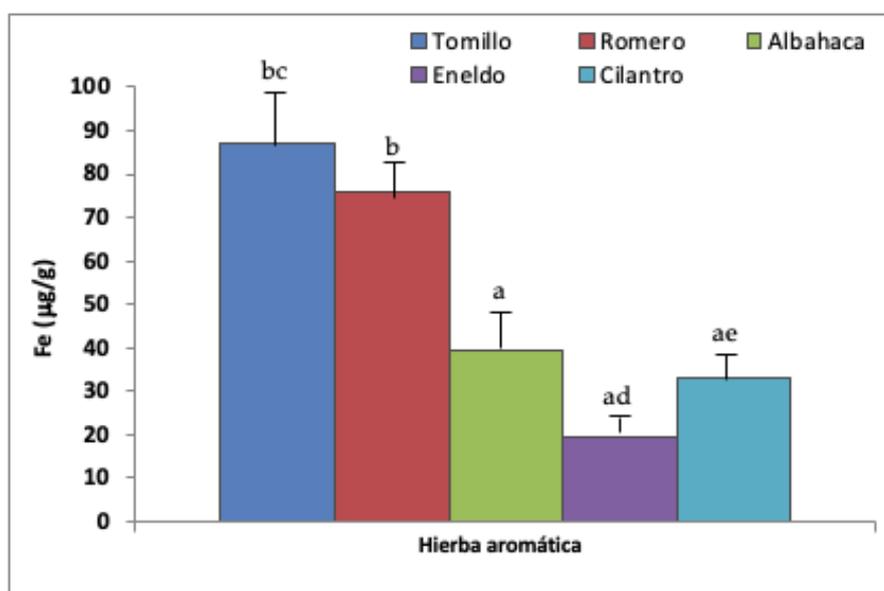


Figura 1. Concentraciones medias de Fe ($\mu\text{g/g}$) medidas en hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

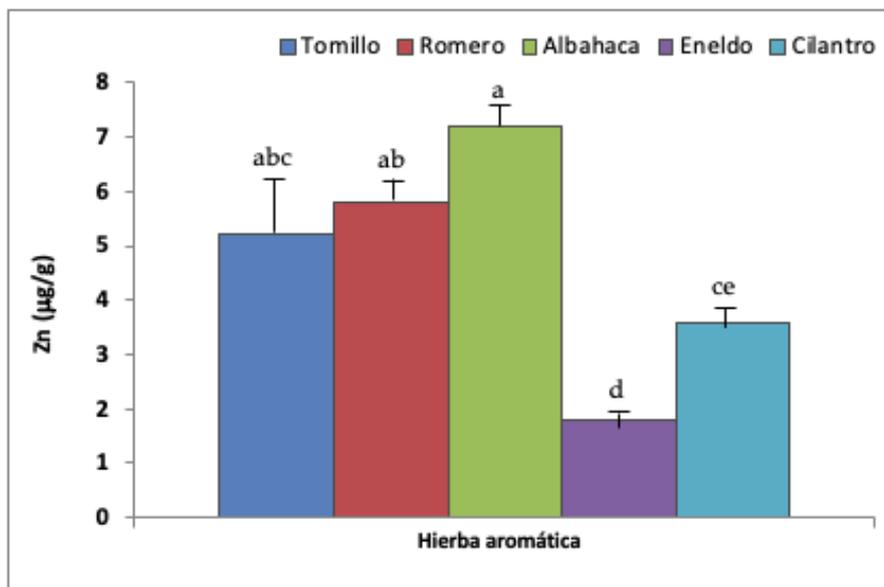


Figura 2. Concentraciones medias de Zn ($\mu\text{g/g}$) medidas en hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

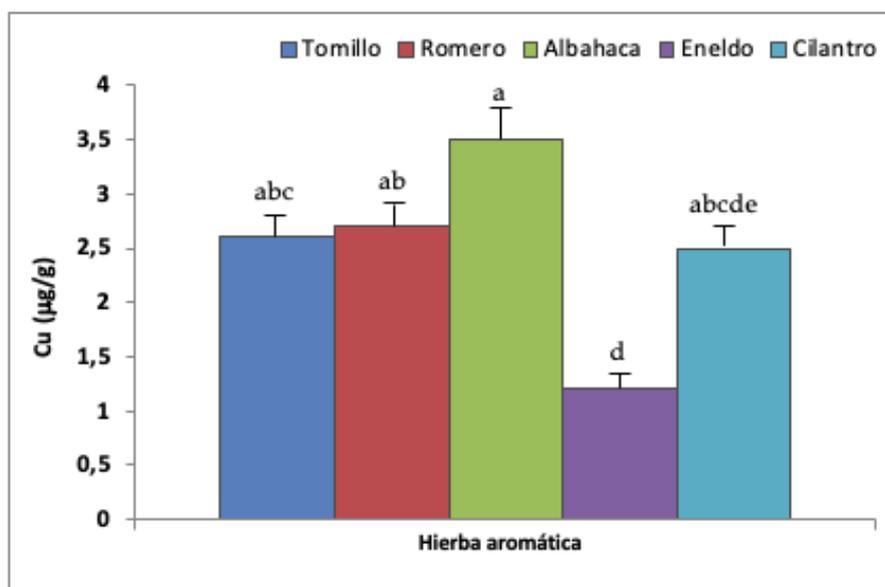


Figura 3. Concentraciones medias de Cu ($\mu\text{g/g}$) medidas en hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

4.1.2. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según el tipo de hierba aromática fresca

Según podemos apreciar, las concentraciones medias de calcio y magnesio son diferentes atendiendo al tipo de hierba aromática fresca considerada (Tabla 2, Figuras 4 y 5).

Para el **calcio**, la concentración media determinada en el romero fresco fue significativamente superior a las encontradas en las hierbas aromáticas frescas restantes analizadas (albahaca, tomillo, eneldo y cilantro; $p < 0,05$). En la albahaca fresca, las concentraciones de calcio fueron significativamente superiores a las de tomillo y cilantro ($p > 0,05$).

Sin embargo, para el **magnesio** los niveles más elevados han correspondido al tomillo, que presentó niveles significativamente superiores respecto al resto de hierbas aromáticas frescas ($p < 0,05$). En el caso concreto de la albahaca fresca, sus concentraciones de magnesio no fueron significativamente diferentes de las del romero, eneldo y cilantro ($p > 0,05$):

Tabla 2. Concentraciones medias de Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas

ESPECIAS FRESCAS	Ca \pm EEM	Mg \pm EEM
Tomillo	1.665 \pm 122 ^c	1.579 \pm 92 ^c
Romero	4.886 \pm 853 ^b	1.193 \pm 354 ^{ab}
Albahaca	2.501 \pm 229 ^a	1.080 \pm 316 ^a
Eneldo	2.065 \pm 138 ^{acd}	998 \pm 72 ^{abd}
Cilantro	1.271 \pm 173 ^{cde}	1.089 \pm 169 ^{abcde}

^{abcde} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

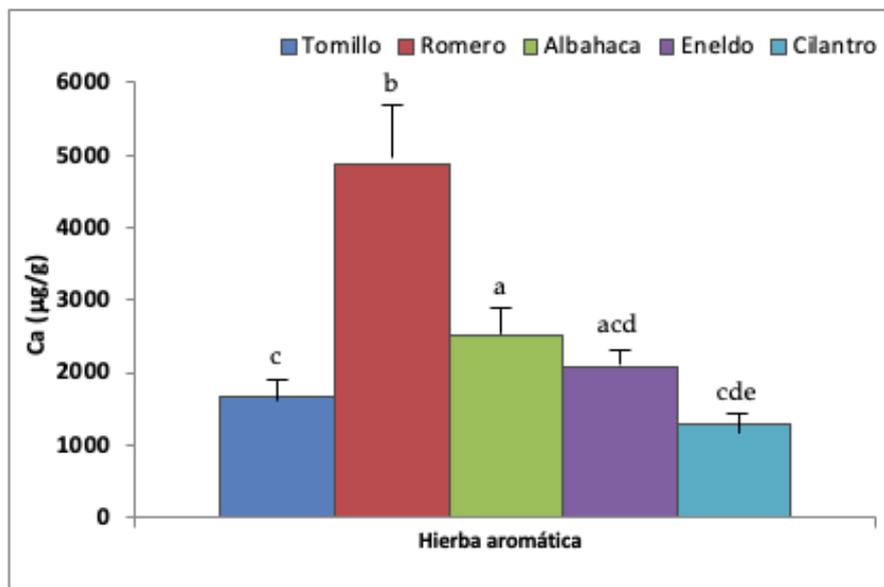


Figura 4. Concentraciones medias de Ca ($\mu\text{g/g}$) medidas en hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

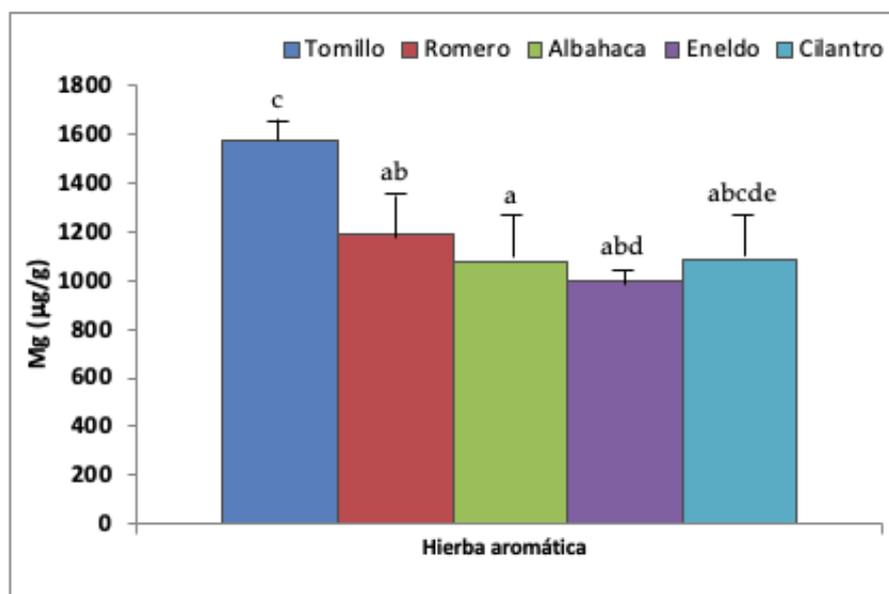


Figura 5. Concentraciones medias de Mg ($\mu\text{g/g}$) medidas en hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

4.2. Concentraciones de los minerales objeto de estudio en verduras frescas

En este apartado se estudia la concentración de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en espinacas, escarola, lechuga Romana, lechuga Iceberg, acelgas y apio.

4.2.1. Concentraciones de hierro, cinc y cobre en verduras frescas

4.2.1.1. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según el tipo de verdura fresca

En las verduras frescas, también se han observado diferencias en el contenido medio en minerales (hierro, cinc y cobre) presentes en las mismas (Tabla 3, Figuras 6, 7 y 8).

El contenido medio de **hierro** determinado en las espinacas ha sido significativamente superior al de las muestras restantes ($p < 0,05$) (Figura 6). Cabe destacar que a las espinacas le siguen las acelgas, siendo el contenido de hierro de estas últimas significativamente superior al de lechuga Iceberg y Romana, y escarola ($p < 0,05$). La lechuga Romana y la lechuga Iceberg presentaron los niveles de hierro más bajos, que fueron además significativamente inferiores a los medidos en la escarola ($p < 0,05$).

En la Figura 7 se observa como las acelgas, seguidas de las espinacas, son las verduras que presentan un mayor contenido medio de **cinc**, no existiendo diferencias significativas entre ambas ($p > 0,05$), pero manifestando concentraciones significativamente superiores respecto a las verduras frescas restantes ($p < 0,05$). A su vez, en la escarola se midieron cantidades de cinc significativamente mayores a los determinados en la lechuga Romana y la lechuga Iceberg ($p < 0,05$).

En el caso del contenido medio de **cobre** en las verduras frescas (Figura 8), cabe mencionar que, como en el cinc, las acelgas, seguidas de las espinacas, son las verduras que presentan un mayor contenido medio de cobre, no habiendo diferencias significativas entre ambas ($p > 0,05$), pero manifestando concentraciones significativamente superiores respecto a las verduras frescas restantes ($p < 0,05$). Por otro lado, la lechuga Romana y la lechuga Iceberg presentaron los niveles de cobre significativamente más bajos respecto a las demás verduras frescas ($p < 0,05$):

Tabla 3. Concentraciones medias de Fe, Zn y Cu ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas medidas en el presente estudio ($p < 0,05$)

VERDURAS FRESCAS	Fe \pm EEM	Zn \pm EEM	Cu \pm EEM
Espinacas	33,60 \pm 3,70 ^a	4,90 \pm 0,50 ^a	1,70 \pm 0,10 ^a
Escarola	3,60 \pm 0,20 ^b	2,00 \pm 0,10 ^b	0,80 \pm 0,10 ^b
Lechuga Romana	2,20 \pm 0,30 ^c	1,40 \pm 0,10 ^c	0,30 \pm 0,10 ^c
Lechuga Iceberg	1,90 \pm 0,20 ^{cd}	1,30 \pm 0,10 ^{cd}	0,30 \pm 0,10 ^{cd}
Acelgas	10,20 \pm 1,00 ^e	5,30 \pm 0,10 ^{ae}	2,00 \pm 0,20 ^{ae}
Apio	6,00 \pm 2,20 ^{bcdef}	2,00 \pm 0,40 ^{bcdf}	0,70 \pm 0,10 ^{bf}

^{abcdef} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

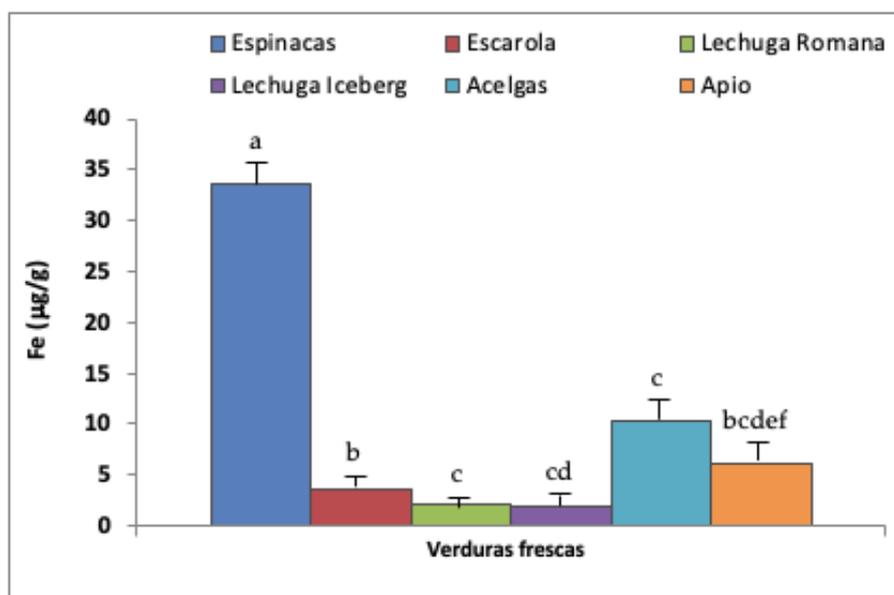


Figura 6. Concentraciones medias de Fe ($\mu\text{g/g}$) medidas en verduras frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)

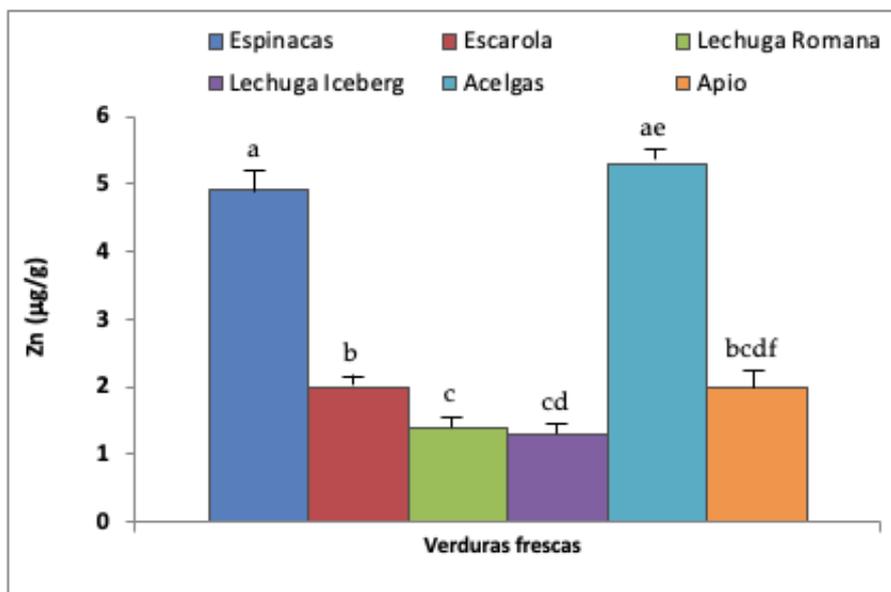


Figura 7. Concentraciones medias de Zn ($\mu\text{g/g}$) medidas en verduras frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)

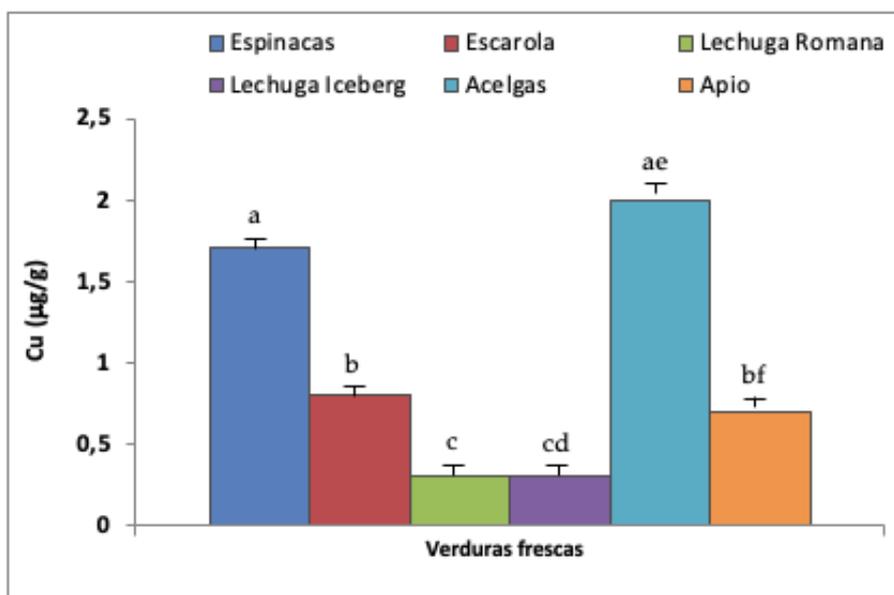


Figura 8. Concentraciones medias de Cu ($\mu\text{g/g}$) medidas en verduras frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)

4.2.1.2. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según la presencia o no de peciolo en las verduras frescas

En relación con la presencia de peciolo en las verduras frescas analizadas, tal y como se puede interpretar de la Tabla 4 y la Figura 9, se han obtenido contenidos medios de todos los minerales determinados (hierro, cinc y cobre) significativamente más elevados en las que presentan dicha estructura (espinacas, acelgas y apio) con respecto a los que no la tienen (escarola, lechuga Romana e Iceberg) ($p < 0,001$):

Tabla 4. Concentraciones medias de Fe, Zn y Cu ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg)

VERDURAS FRESCAS	Fe \pm EEM	Zn \pm EEM	Cu \pm EEM
Con peciolo	16,60 \pm 2,80 ^a	4,00 \pm 0,40 ^a	1,50 \pm 0,10 ^a
Sin peciolo	6,40 \pm 2,20 ^b	1,90 \pm 0,20 ^b	0,60 \pm 0,10 ^b

^{ab} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$)

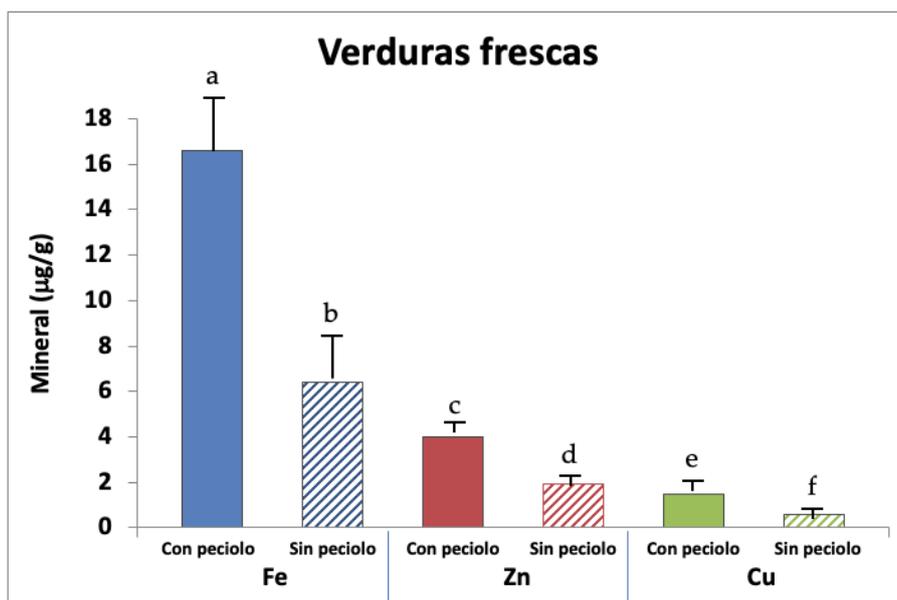


Figura 9. Concentraciones medias de Fe, Zn y Cu ($\mu\text{g/g}$) medidas en verduras frescas objeto del presente estudio, agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,001$)*

4.2.1.3. Diferenciación de las concentraciones de hierro, cinc y cobre según la forma de comercialización de las verduras frescas (I o IV Gama)

En la Tabla 5 y Figuras 10, 11 y 12, se encuadran las concentraciones medias de hierro, cinc y cobre dependiendo de la comercialización como frescas (I Gama) o IV Gama. Se aprecia que, en espinacas y escarola, los niveles de hierro, y de cinc y cobre adicionalmente en la escarola, son significativamente superiores en las verduras frescas de la I Gama ($p < 0,01$). Parece ser que el lavado de estas verduras, durante su procesamiento tecnológico, supone importantes pérdidas por lixiviación de estos minerales en las aguas usadas a tal efecto. Sin embargo, y contrariamente, en la lechuga Iceberg, los niveles de cobre fueron significativamente mayores en las muestras de IV Gama:

Tabla 5. Concentraciones medias de Fe, Zn y Cu ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas)

VERDURAS FRESCAS/GAMA	Fe \pm EEM	Zn \pm EEM	Cu \pm EEM
Espinacas			
I Gama	33,60 \pm 3,72 ^a	4,93 \pm 0,503	1,67 \pm 0,107
IV Gama	17,50 \pm 4,09 ^b	6,31 \pm 0,677	1,75 \pm 0,288
Escarola			
I Gama	3,58 \pm 0,241 ^a	2,04 \pm 0,058 ^a	0,769 \pm 0,044 ^a
IV Gama	2,10 \pm 0,213 ^b	1,46 \pm 0,112 ^b	0,530 \pm 0,013 ^b
Lechuga Romana			
I Gama	2,20 \pm 0,318	1,44 \pm 0,110	0,326 \pm 0,045
IV Gama	1,70 \pm 0,246	1,27 \pm 0,188	0,574 \pm 0,126
Lechuga Iceberg			
I Gama	1,92 \pm 0,157	1,30 \pm 0,117	0,311 \pm 0,011 ^a
IV Gama	1,93 \pm 0,081	1,38 \pm 0,131	0,441 \pm 0,029 ^b

^{ab} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna y para una de las verduras consideradas denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

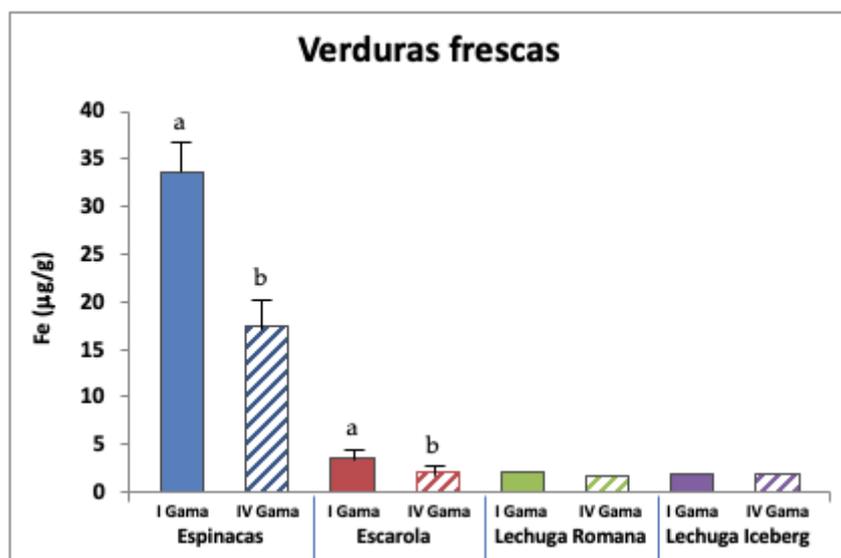


Figura 10. Concentraciones medias de Fe ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,01$)*

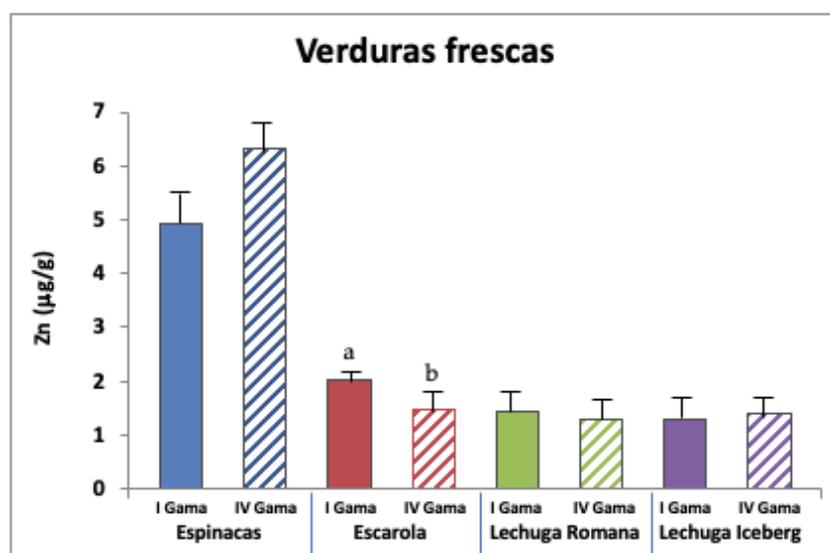


Figura 11. Concentraciones medias de Zn ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,01$)*

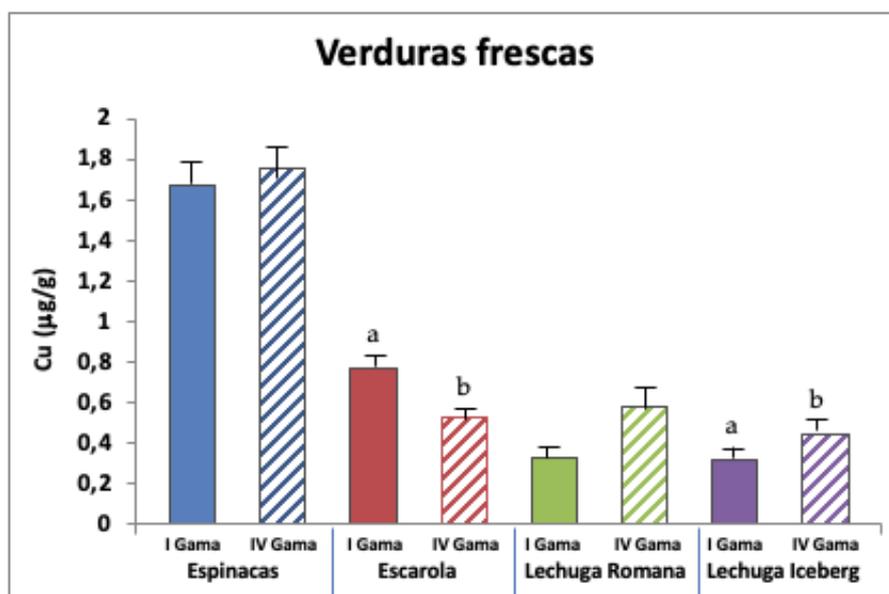


Figura 12. Concentraciones medias de Cu ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,01$)*

4.2.2. Concentraciones de calcio y magnesio en verduras frescas

4.2.2.1. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según el tipo de verdura fresca

Como se puede ver en la Tabla 6 y en la Figura 13, con respecto al **calcio**, las espinacas, las acelgas y el apio, todas ellas verduras con peciolo, contienen una concentración media significativamente superior a las restantes verduras frescas (escarola, lechuga Iceberg; $p < 0,001$); entre estas verduras no se ha apreciado la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Es destacable que las espinacas, seguidas de la acelgas, son las verduras con un mayor contenido en calcio.

En relación con el **magnesio** (Tabla 6, Figura 14) también se aprecia la existencia de diferencias estadísticamente significativas según la verdura fresca considerada. Los niveles más elevados se han encontrado, como en el caso del calcio, en espinacas y acelgas, que han manifestado niveles de magnesio significativamente superiores a los determinados en todas las demás verduras frescas estudiadas ($p < 0,001$):

Tabla 6. Concentraciones medias de Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas

VERDURAS FRESCAS	Ca \pm EEM	Mg \pm EEM
Espinacas	1911 \pm 472 ^a	1414 \pm 159 ^a
Escarola	175 \pm 11,30 ^b	184 \pm 6,67 ^b
Lechuga Romana	262 \pm 6,53 ^c	170 \pm 6,94 ^{bc}
Lechuga Iceberg	285 \pm 40,3 ^{cd}	172 \pm 12,00 ^{bcd}
Acelgas	1812 \pm 467 ^a	2588 \pm 502 ^a
Apio	1084 \pm 285 ^a	321 \pm 82 ^{be}

^{abcde} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

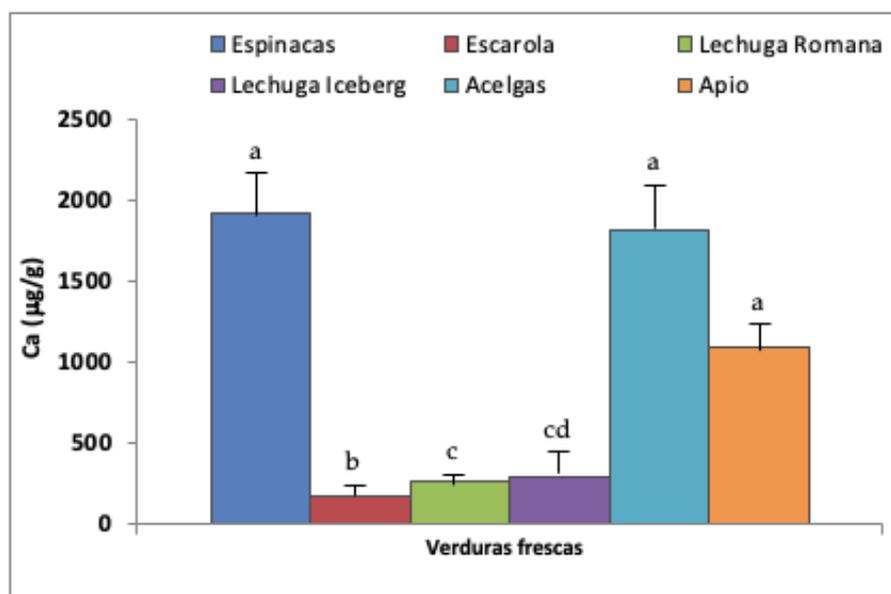


Figura 13. Concentraciones medias de Ca ($\mu\text{g/g}$) medidas en verduras frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)*

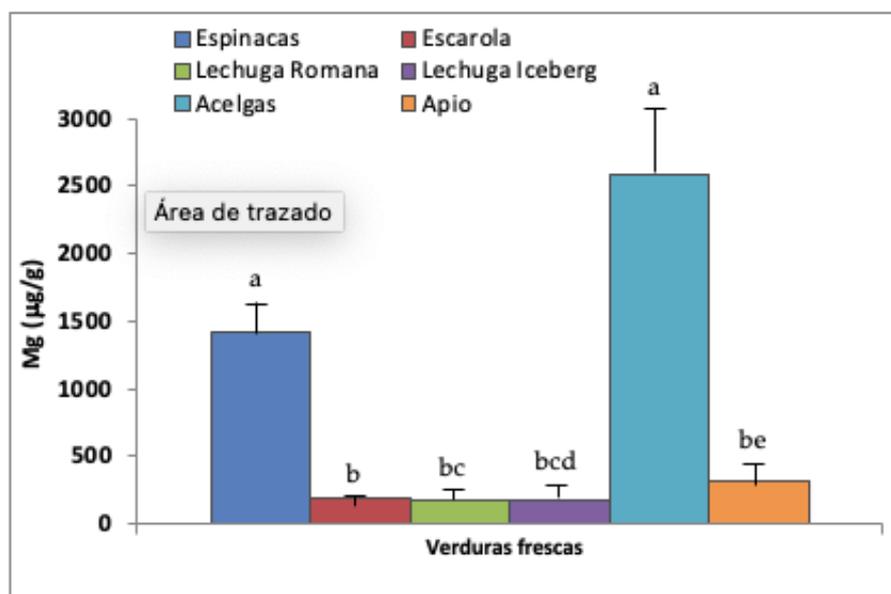


Figura 14. Concentraciones medias de Mg ($\mu\text{g/g}$) medidas en verduras frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)*

4.2.2.2. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según la presencia o no de peciolo en las verduras frescas

En la Tabla 7 y en la Figura 15, se incluyen las concentraciones de calcio y magnesio en las verduras frescas analizadas agrupadas en función de la presencia de peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (lechuga Romana, lechuga Iceberg y escarola). Como puede apreciarse, las concentraciones de estos minerales esenciales son significativamente muy superiores en las verduras frescas con peciolo:

Tabla 7. Concentraciones medias de Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas, agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg)

VERDURAS FRESCAS	Ca \pm EEM	Mg \pm EEM
Con peciolo	1602 \pm 242 ^a	1350 \pm 235,4 ^a
Sin peciolo	243 \pm 16,90 ^b	176 \pm 5,23 ^b

^{ab} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$)

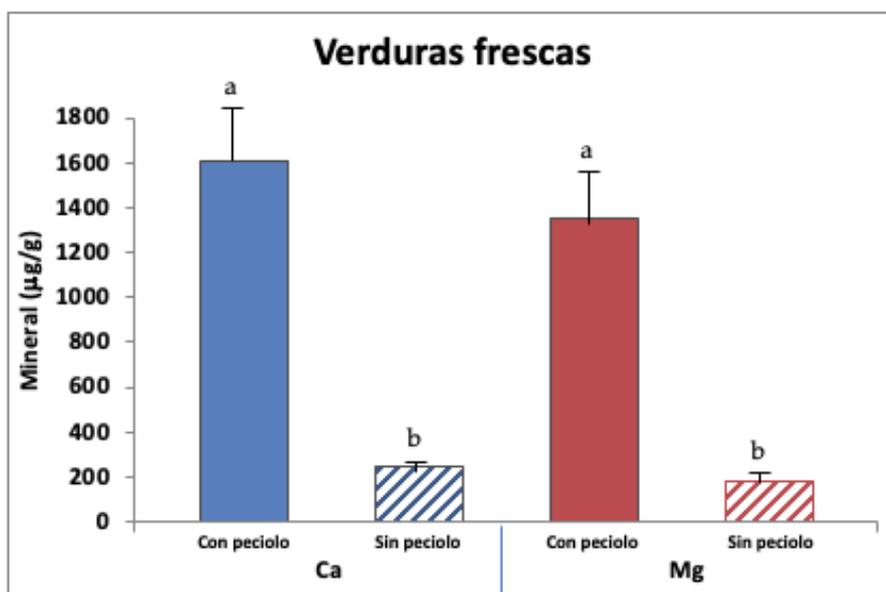


Figura 15. Concentraciones medias de Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) medidas en verduras frescas agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,001$)*

4.2.2.3. Diferenciación de las concentraciones de calcio y magnesio según la forma de comercialización de las verduras frescas (I o IV Gama)

En la Tabla 8 y en las Figuras 16 y 17, se encuadran las concentraciones medias de calcio y magnesio dependiendo de la comercialización como frescas (I Gama) o IV Gama. Se aprecia que los niveles de calcio en lechuga Romana y los de magnesio en lechuga Iceberg, ambos en lechugas de I Gama, son significativamente mayores ($p < 0,01$). De igual manera a lo indicado con anterioridad para los restantes minerales, el lavado de estas verduras (las lechugas), supone una pérdida por lixiviación de estos minerales en las aguas usadas a tal efecto. Sin embargo y contrariamente en la lechuga Iceberg, los niveles de calcio, fueron significativamente mayores en las muestras de IV Gama:

Tabla 8. Concentraciones medias de Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas)

VERDURAS FRESCA/GAMA	Ca \pm EEM	Mg \pm EEM
Espinacas		
I Gama	1911 \pm 472	1414 \pm 159
IV Gama	1048 \pm 39,90	1548 \pm 52,90
Escarola		
I Gama	175 \pm 11,30	185 \pm 6,67
IV Gama	203 \pm 23,40	149 \pm 5,94
Lechuga Romana		
I Gama	262 \pm 6,53 ^a	170 \pm 6,94
IV Gama	200 \pm 7,91 ^b	147 \pm 6,91
Lechuga Iceberg		
I Gama	285 \pm 40,3	173 \pm 12,00 ^a
IV Gama	182 \pm 16,60	129 \pm 3,16 ^b

^{ab} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna y para una de las verduras consideradas denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$)

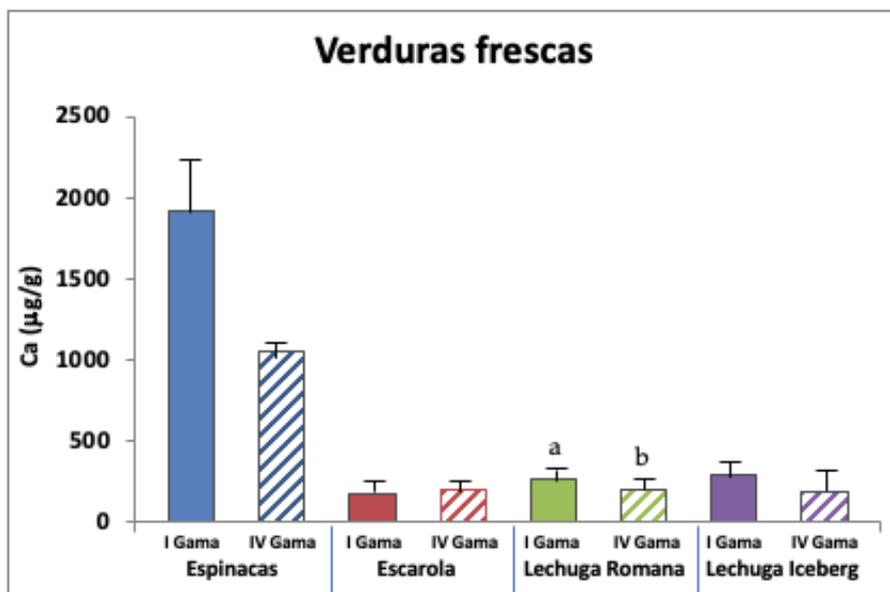


Figura 16. Concentraciones medias de Ca ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,01$)*

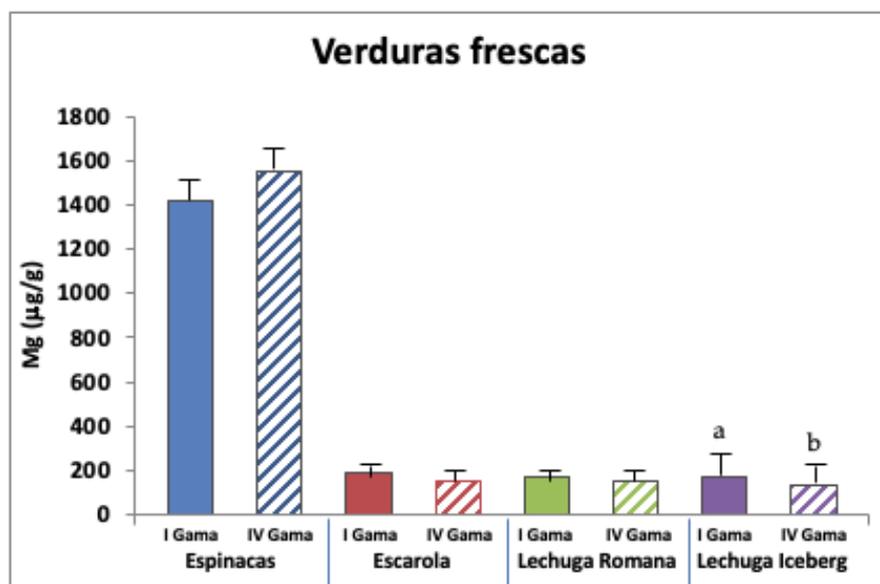


Figura 17. Concentraciones medias de Mg ($\mu\text{g/g}$) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,01$)*

4.3. Crecimiento microbiológico en hierbas aromáticas frescas y verduras frescas

En este apartado se estudia el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos, concretamente *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras en hierbas aromáticas y verduras frescas.

4.3.1. Crecimiento microbiológico en función del tipo de hierba aromática fresca

En líneas generales, con respecto al crecimiento microbiano en las hierbas aromáticas, cabe destacar el elevado contenido en microorganismos psicrófilos ($\cong 5,9 \times 10^6 - 9,0 \times 10^6$ UFC/g) de las muestras, sobre todo en comparación con *L. monocytogenes* (160-200 UFC/g) (Tabla 9):

Tabla 9. Recuentos medios de los microorganismos objeto de estudio (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas medidas en el presente estudio

ESPECIAS FRESCAS	<i>L. monocytogenes</i> ± EEM	Mesófilos ± EEM	Psicrófilos ± EEM	Mohos y levaduras ± EEM
Tomillo	200 ± 2,89 ^c	88.000 ± 577 ^c	9.026.666 ± 57735 ^c	15333 ± 587 ^{bc}
Romero	180 ± 1,15 ^b	124.666 ± 578 ^b	8.293.333 ± 57735 ^b	16666 ± 577 ^b
Albahaca	190 ± 1,15 ^a	83.333 ± 192 ^a	7.093.333 ± 53886 ^a	3000 ± 57,7 ^a
Eneldo	170 ± 4,04 ^{bd}	87.000 ± 1836 ^{acd}	5.893.333 ± 230940 ^d	4000 ± 547 ^{ad}
Cilantro	160 ± 5,77 ^{de}	9.000 ± 289 ^e	8.613.333 ± 230940 ^{bce}	477333 ± 2887 ^e

^{abcde} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los recuentos del patógeno alimentario correspondiente ($p < 0,01$)

Los recuentos medios de *L. monocytogenes* en las hierbas aromáticas han resultado ser muy próximos entre ellos (Figura 18), siendo el tomillo y el cilantro dónde este microorganismo crece en mayor y menor cantidad, respectivamente. Por orden descendente, al tomillo le sigue la albahaca, el romero y el eneldo. Además, hemos comprobado como los recuentos microbianos de *Listeria* son significativamente superiores en el tomillo, respecto a las restantes especias, seguido de la albahaca con niveles también estadísticamente mayores a los determinados en las especias restantes como son el romero, el eneldo y el cilantro ($p < 0,05$):

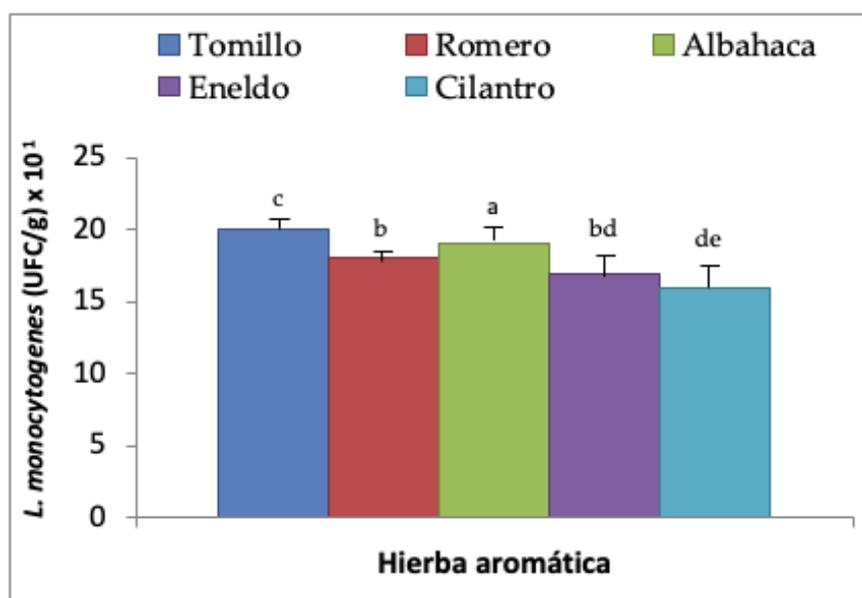


Figura 18. Recuentos medios de *L. monocytogenes* (UFC/g) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,01$)

En el caso del crecimiento de microorganismos mesófilos en las hierbas aromáticas (Figura 19), se observan valores aproximados para la albahaca, tomillo y eneldo. Los valores de crecimiento microbiano más elevados han correspondido, de forma estadísticamente significativa, al romero ($p < 0,05$). Por otro lado, el cilantro ha sido la especia con menor crecimiento de estos microorganismos, también de forma significativa ($p < 0,05$):

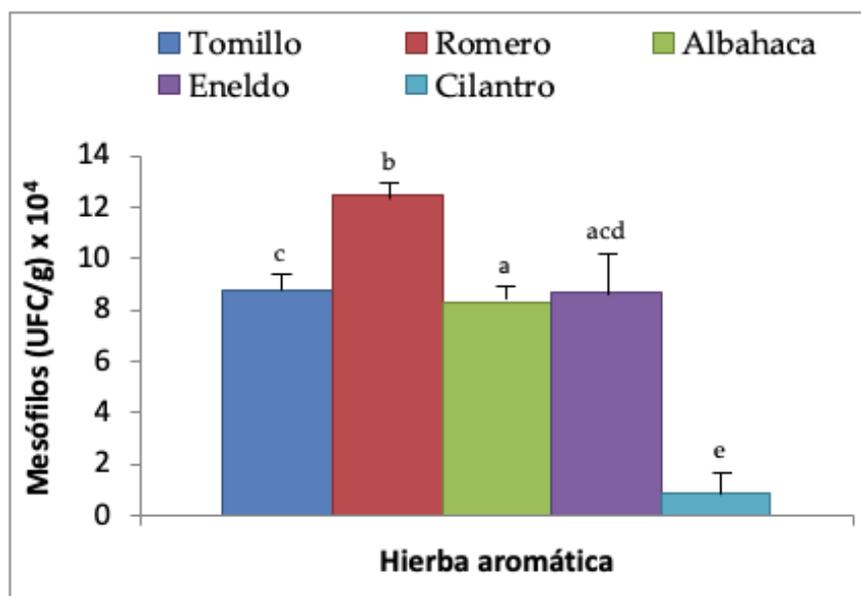


Figura 19. Recuentos medios de microorganismos mesófilos (UFC/g) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas* ($p < 0,01$)

Con respecto a los **microorganismos psicrófilos** (Figura 20), el tomillo ha sido la especie en la cual se han determinado recuentos mayores de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$), seguido del cilantro y el romero, con valores muy aproximados entre sí. Finalmente, la albahaca y el eneldo han resultado ser las hierbas aromáticas frescas que presentan, de forma significativa, menor crecimiento de este grupo de microorganismos ($p < 0,05$):

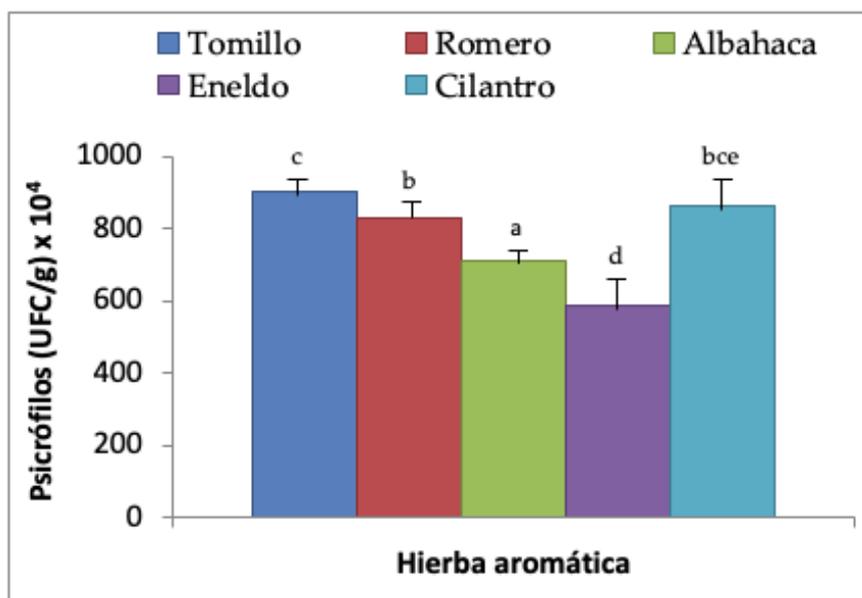


Figura 20. Recuentos medios de microorganismos psicrófilos (UFC/g) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,01$)*

En relación con los **mohos y levaduras**, se observa en la Figura 21 como el cilantro es la especia en la que se han determinado niveles muy superiores y significativamente diferentes a las muestras restantes ($p < 0,05$). Tal es dicha diferencia que ha sido necesario incorporar la Figura 21A con el fin de poder observar más en detalle las diferencias de crecimiento de levaduras y mohos en las hierbas aromáticas restantes. En esta última gráfica se observa como, por orden decreciente, al cilantro le sigue el romero y el tomillo y, finalmente, la albahaca y el eneldo, con valores muy próximos y no significativamente diferentes entre esta última pareja de especias ($p > 0,05$):

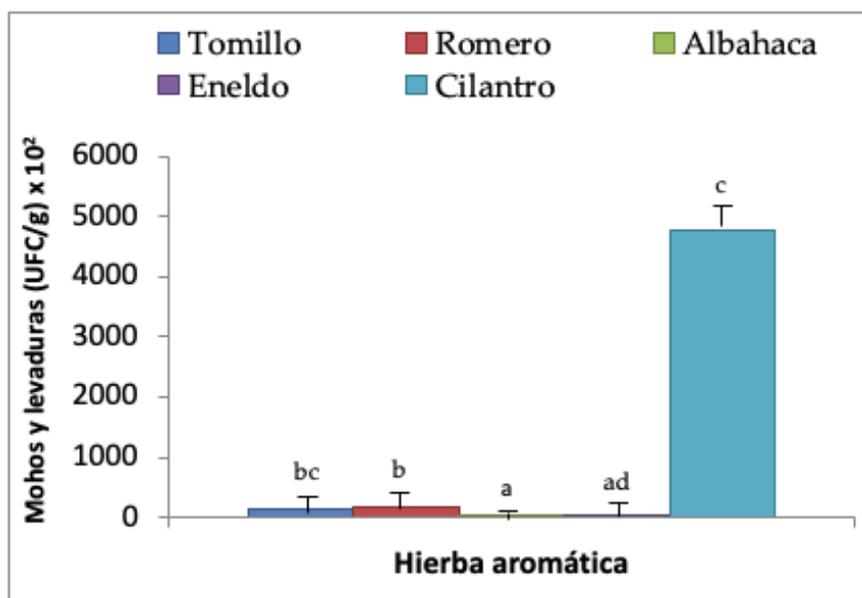


Figura 21. Recuentos medios de mohos y levaduras (UFC/g) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,01$)*

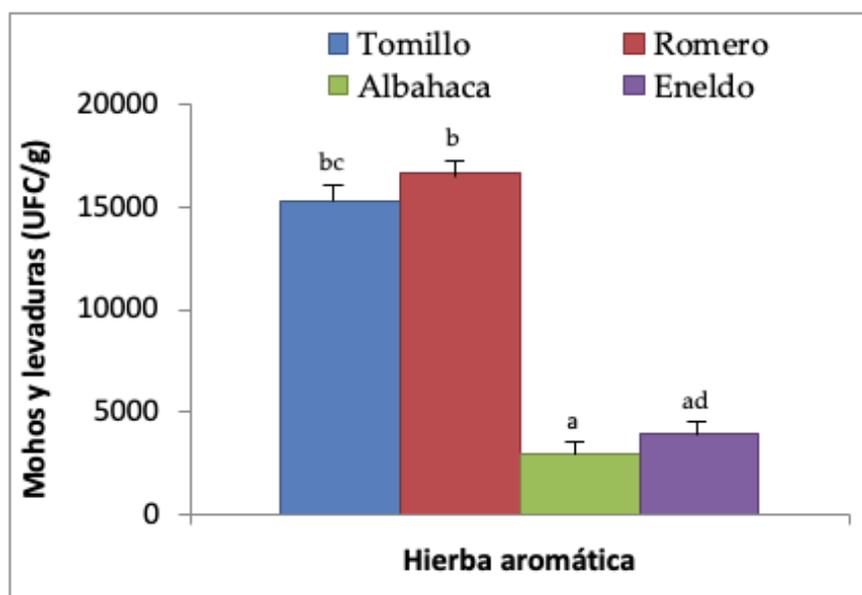


Figura 21 A. Recuentos medios de mohos y levaduras (UFC/g) en muestras comerciales de hierbas aromáticas frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,01$)*

4.3.2. Crecimiento microbiológico en función del tipo de verdura fresca

El crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras va a experimentar variaciones en función del tipo de verdura fresca de la que se trate.

En la Tabla 10 se observa que, al igual que pasaba en las hierbas aromáticas, los recuentos medios de los microorganismos psicrófilos ($9,4 \times 10^3$ - $9,1 \times 10^6$ UFC/g) son mucho mayores que los de los restantes patógenos alimentarios estudiados, sobre todo con respecto a *L. monocytogenes* (34-69 UFC/g):

Tabla 10. Recuentos medios de los microorganismos objeto de estudio (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas consideradas en el presente estudio

VERDURAS FRESCAS	<i>L. monocytogenes</i> ± EEM	Mesófilos ± EEM	Psicrófilos ± EEM	Mohos y levaduras ± EEM
Espinacas	53,00 ± 0,687 ^a	26.666 ± 3.980 ^a	8.217.775 ± 319.129 ^a	123.222 ± 28.622 ^a
Escarola	35,00 ± 5,26 ^b	5.633 ± 125 ^b	9.367 ± 150 ^b	213 ± 6,93 ^b
Lechuga Romana	38,30 ± 0,583 ^{bc}	7.767 ± 167 ^c	10.207 ± 337 ^c	120 ± 3,82 ^c
Lechuga Iceberg	34,30 ± 0,502 ^{bd}	63.333 ± 88,20 ^d	11.770 ± 164 ^d	440 ± 23,00 ^d
Acelgas	62,70 ± 0,901 ^e	65.222 ± 3.326 ^e	9.106.666 ± 362.721 ^{ae}	131.000 ± 49.108 ^{ae}
Apio	69,00 ± 0,687 ^f	61.778 ± 10.523 ^{ef}	8.031.110 ± 373.800 ^{ae}	167.333 ± 37.722 ^{ae}

^{abcdef} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna, denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento del patógeno alimentario correspondiente ($p < 0,05$)

En el caso de *L. monocytogenes* (Figura 22), se observa una mayor homogeneidad en cuanto a los valores de los recuentos en las diferentes muestras de verduras, en relación con lo apreciado en el crecimiento de los microorganismos patógenos alimentarios restantes también estudiados. Sin embargo, destacan el apio, las acelgas y espinacas como las verduras frescas que presentan valores de recuentos de este patógeno alimentario significativamente superiores a los correspondientes a escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg ($p < 0,05$). En estas tres últimas verduras, entre sus valores de crecimiento microbiano no se han establecido diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$):

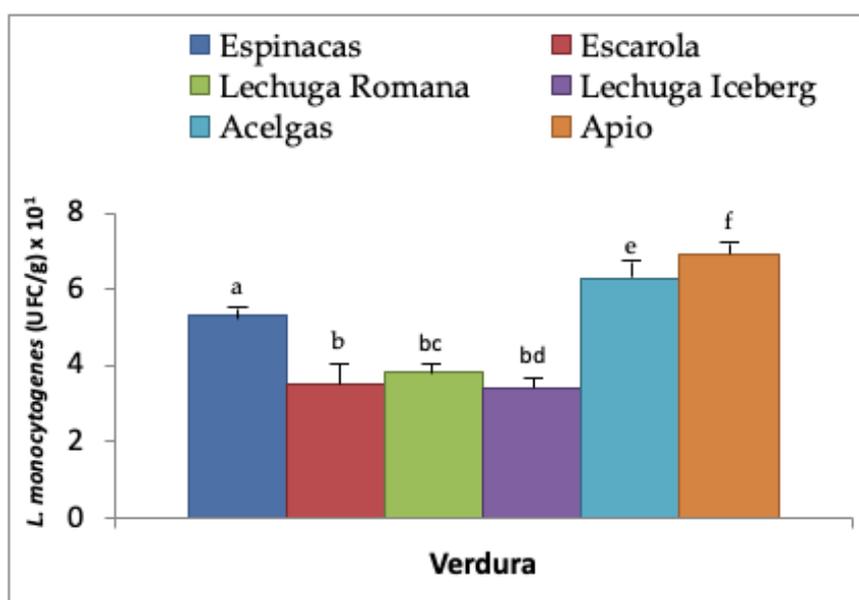


Figura 22. Recuentos medios de *L. monocytogenes* (UFC/g) en muestras comerciales de verduras frescas; diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)

La Figura 23 muestra como las acelgas y el apio son las verduras que presentan valores de crecimiento de **microorganismos mesófilos** significativamente más elevados ($p > 0,05$), respecto a las verduras frescas restantes, no existiendo sin embargo diferencias significativas entre ambas ($p > 0,05$). En el caso del recuento de estos microorganismos en las verduras, existen diferencias significativas entre todas ellas, excepto en el caso mencionado previamente. Con respecto a las muestras restantes, las espinacas, la lechuga Romana, la lechuga Iceberg y la escarola son, en orden descendente, las que han experimentado menor crecimiento de microorganismos mesófilos:

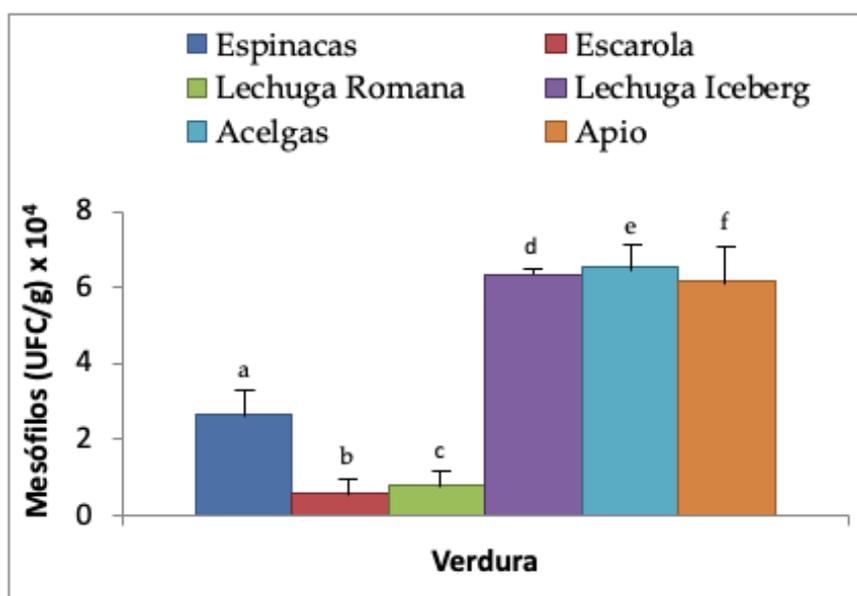


Figura 23. Recuentos medios de microorganismos mesófilos (UFC/g) en muestras comerciales de verduras frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas* ($p < 0,05$)

En el caso de los recuentos de **microorganismos psicrófilos** en las verduras, se han observado recuentos muy superiores no significativamente diferentes entre ellas ($p > 0,05$) para las acelgas, espinacas y apio (Figura 24); sin embargo, los niveles de microorganismos psicrófilos en las verduras indicadas anteriormente han sido significativamente superiores a los correspondientes a escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg ($p < 0,05$):

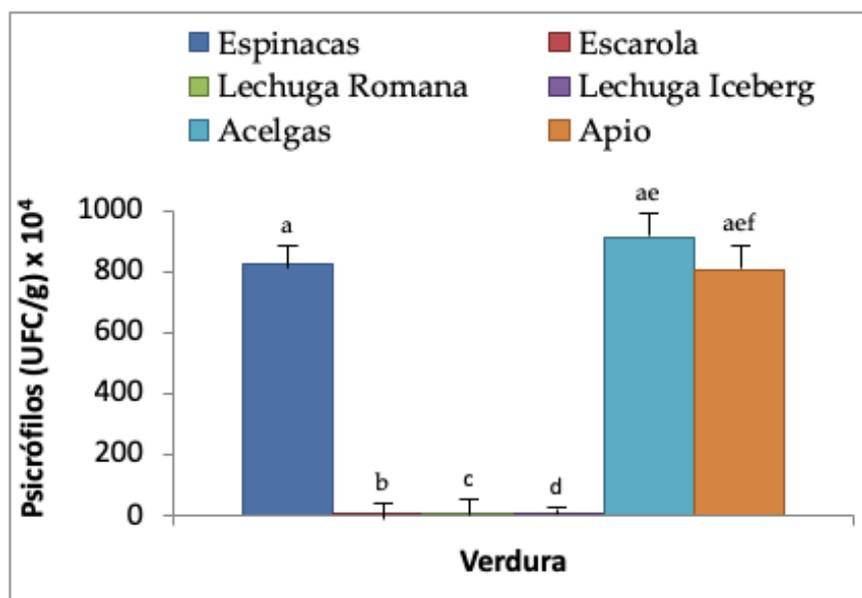


Figura 24. Recuentos medios de microorganismos psicrófilos (UFC/g) en muestras comerciales de verduras frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas* ($p < 0,05$)

Debido a que en esta representación no se pueden observar con detalle las diferencias existentes entre las muestras restantes, se ha incorporado la Figura 24 A. Esta última permite demostrar que, en orden decreciente, han sido la lechuga Iceberg, seguida de la lechuga Romana y de la escarola, las verduras que han presentado menor crecimiento de estos microorganismos, con diferencias estadísticamente significativas en los recuentos microbianos correspondientes a estas verduras frescas ($p < 0,05$):

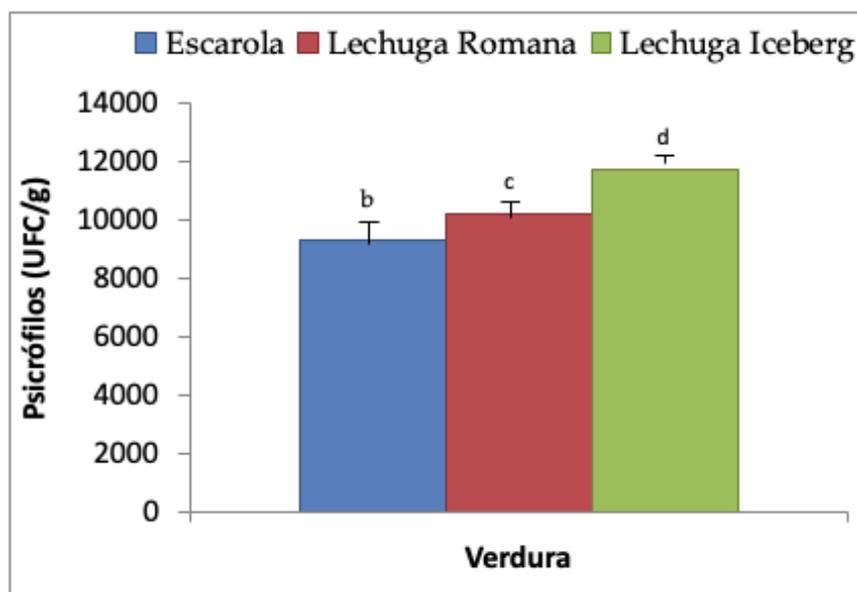


Figura 24 A. Recuentos medios de microorganismos psicrófilos (UFC/g) en muestras comerciales de verduras frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)*

Con relación a los recuentos de **mohos y levaduras** en las verduras frescas (Figura 25), se ha observado que son el apio, las acelgas y las espinacas las que presentan mayores recuentos de dichos patógenos, no habiendo diferencias significativas entre las mismas ($p > 0,05$); sin embargo, y de igual manera a lo indicado para los microorganismos psicrófilos, los niveles de crecimiento de mohos y levaduras en las verduras indicadas anteriormente han sido significativamente superiores a los correspondientes a escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg ($p < 0,05$):

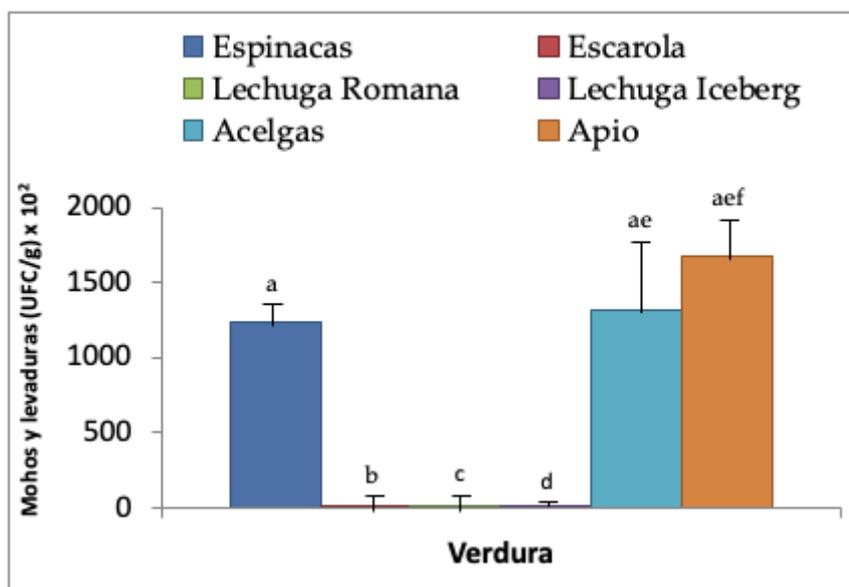


Figura 25. Recuentos medios de mohos y levaduras (UFC/g) en muestras comerciales de verduras frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)*

Al igual que ha sucedido en el caso anterior con los microorganismos psicrófilos, se ha incorporado una nueva gráfica (Figura 25 A) con el fin de poder establecer distinciones entre el crecimiento de mohos y levaduras en el resto de verduras. La lechuga Iceberg, seguida de la escarola y la lechuga Romana, se consideran las verduras que presentan recuentos significativamente diferentes ($p < 0,05$) de mohos y levaduras, y dispuestos en orden descendiente:

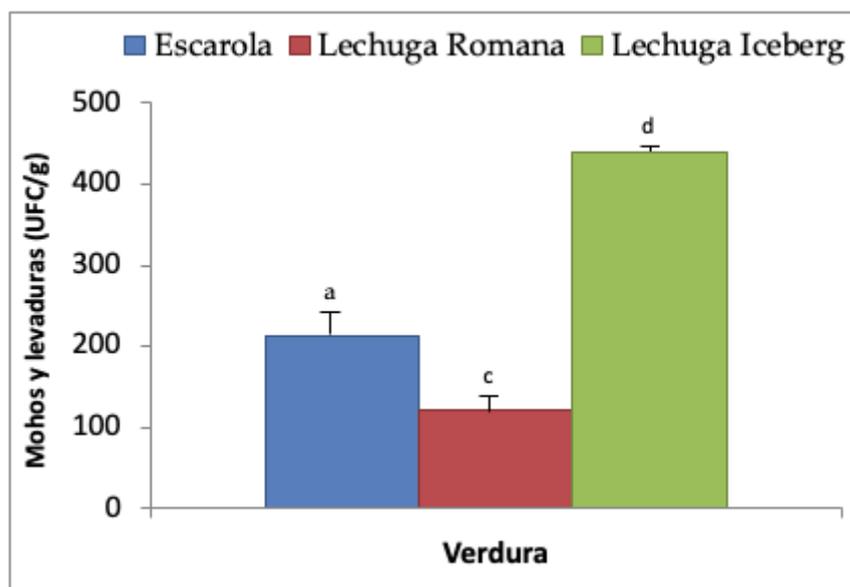


Figura 25 A. Recuentos medios de mohos y levaduras (UFC/g) en muestras comerciales de verduras frescas; *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las hierbas aromáticas ($p < 0,05$)*

Realizando un balance global, se ha observado que las espinacas, acelgas y apio son las verduras frescas que presentan mayores recuentos de todos los patógenos alimentarios estudiados en este apartado (*L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras). En contraposición, la lechuga Iceberg, la lechuga Romana y la escarola son las que han presentado recuentos más bajos, siendo, por tanto, las verduras con menor posibilidad de facilitar la aparición de enfermedades gastrointestinales asociadas al consumo de las verduras frescas estudiadas.

Dentro de las verduras frescas con menores recuentos microbianos, los valores de crecimiento en lechuga Iceberg han sido significativamente superiores a los establecidos para lechuga Romana, y éstos, a su vez, a los encontrados en escarola ($p < 0,05$) en tres de los cuatro patógenos alimentarios estudiados (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras), no observándose diferencias significativas para el crecimiento de *L. monocytogenes*. Por tanto, la escarola, de forma global, sería la verdura fresca en la que el crecimiento de los patógenos alimentarios estudiados está más dificultado y, en consecuencia, la menos susceptible de producir enfermedades en el tracto gastrointestinal de los consumidores finales.

4.3.2.1. Crecimiento microbiológico en función de la presencia o no de peciolo en las verduras frescas

El objetivo que se pretende establecer en este apartado es demostrar si el hecho de que las verduras frescas presenten o no peciolo tiene alguna repercusión con respecto al crecimiento de los microorganismos estudiados (Tabla 11, Figuras 26, 26 A, 26 B, 26 C y 26 D).

La Figura 26 representa, de forma global, el crecimiento de los diferentes microorganismos en función de si las muestras presentan o no peciolo. A simple vista, destaca el crecimiento de microorganismos psicrófilos en el grupo de las verduras que presentan peciolo con respecto a los restantes microorganismos, para los cuales apenas se distinguen sus valores en esta Figura. Con el fin de resolver lo anteriormente mencionado, se han incorporado gráficas individuales para poder observar el crecimiento microbiano de cada uno de los patógenos considerados individualmente, en los grupos de verduras con y sin peciolo (Figuras 26 A, 26 B, 26 C y 26 D).

Se ha comprobado que existe un mayor crecimiento y estadísticamente significativo de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, y en el grupo de verduras con peciolo (espinacas, acelgas y apio), con respecto a las que no lo presentan (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg) ($p < 0,05$). Adicionalmente, cabe destacar la gran diferencia entre grupos para el crecimiento de microorganismos psicrófilos y de mohos y levaduras puesto que, tras haber realizado gráficas individuales para cada microorganismo, apenas se distingue gráficamente el crecimiento microbiano en el grupo de las verduras sin peciolo (Figuras 26 C y 26 D), por la diferencia tan grande existente entre los valores de recuento a favor de las verduras frescas con peciolo. Por tanto, el peciolo es una estructura de las verduras frescas que actúa como reservorio de los patógenos alimentarios estudiados, y que se relaciona directamente con lo indicado anteriormente acerca de que las acelgas, el apio y las espinacas (verduras frescas todas ellas con peciolo), presenten valores de recuentos de los patógenos alimentarios estudiados significativamente superiores respecto a la escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg:

Tabla 11. Recuentos medios de los microorganismos objeto de estudio (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas dependiendo de si tienen peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana, lechuga Iceberg)

VERDURAS FRESCAS	<i>L. monocytogenes</i> ± EEM	Mesófilos ± EEM	Psicrófilos ± EEM	Mohos y levaduras ± EEM
Con peciolo	61,6 ± 1,36 ^a	51.122 ± 5078 ^a	8.451.851 ± 216.193 ^a	140.518 ± 22.170 ^a
Sin peciolo	35,10 ± 1,62 ^b	6.608 ± 194 ^b	10.480 ± 241 ^b	260 ± 28,50 ^b

^{ab} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

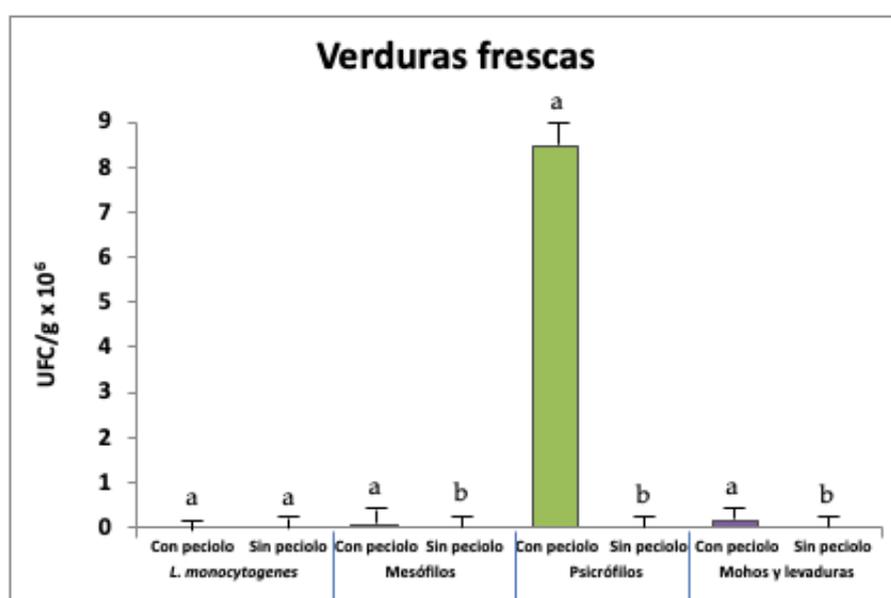


Figura 26. Recuentos microbianos de los microorganismos objeto de estudio (UFC/g) en verduras frescas agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)*

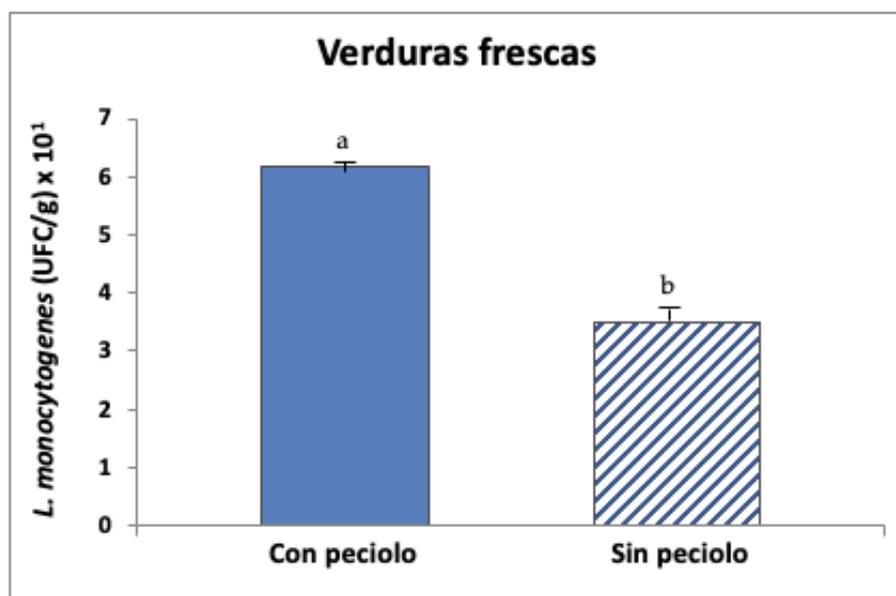


Figura 26 A. Recuentos microbianos de *L. monocytogenes* (UFC/g) en verduras frescas agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras* ($p < 0,05$)

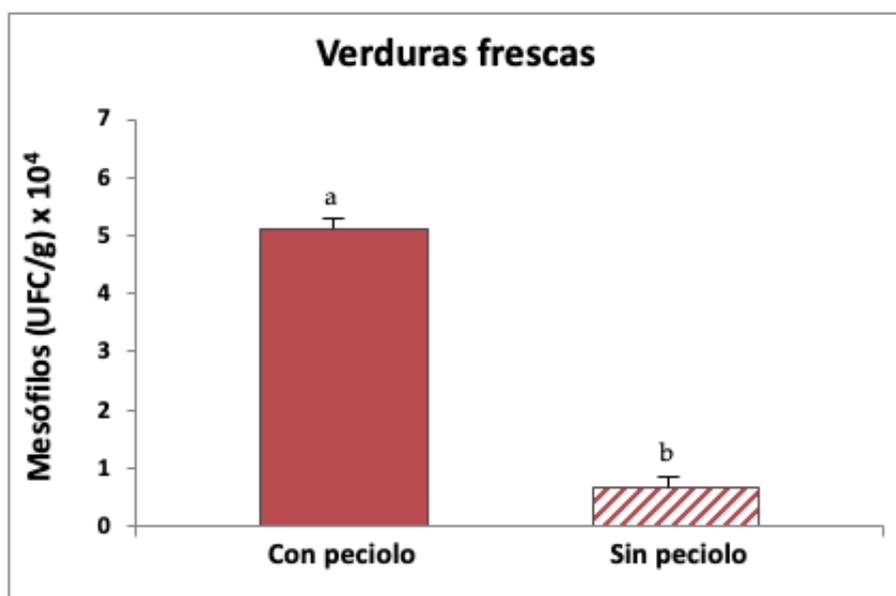


Figura 26 B. Recuentos microbianos de microorganismos mesófilos (UFC/g) en verduras frescas agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras* ($p < 0,05$)

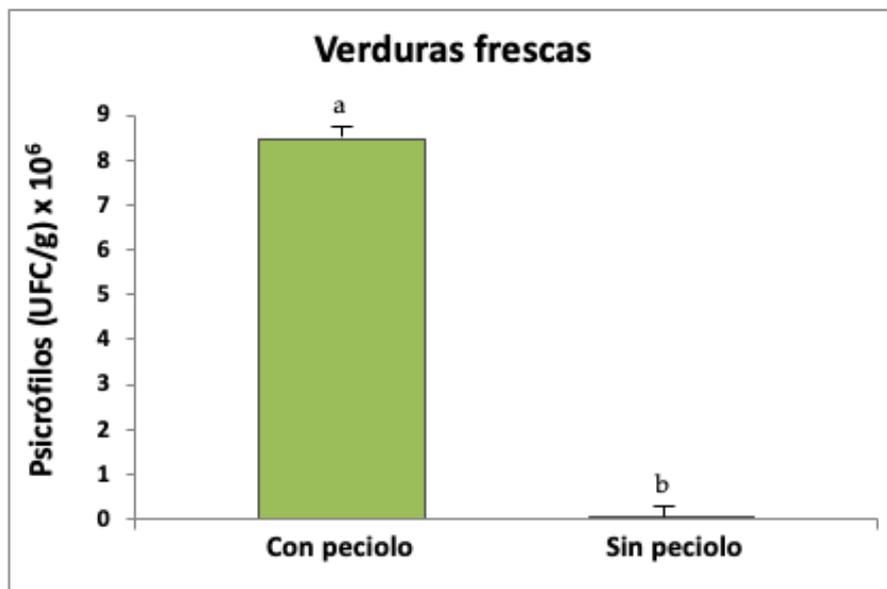


Figura 26 C. Recuentos microbianos de microorganismos psicrófilos (UFC/g) en verduras frescas agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)*

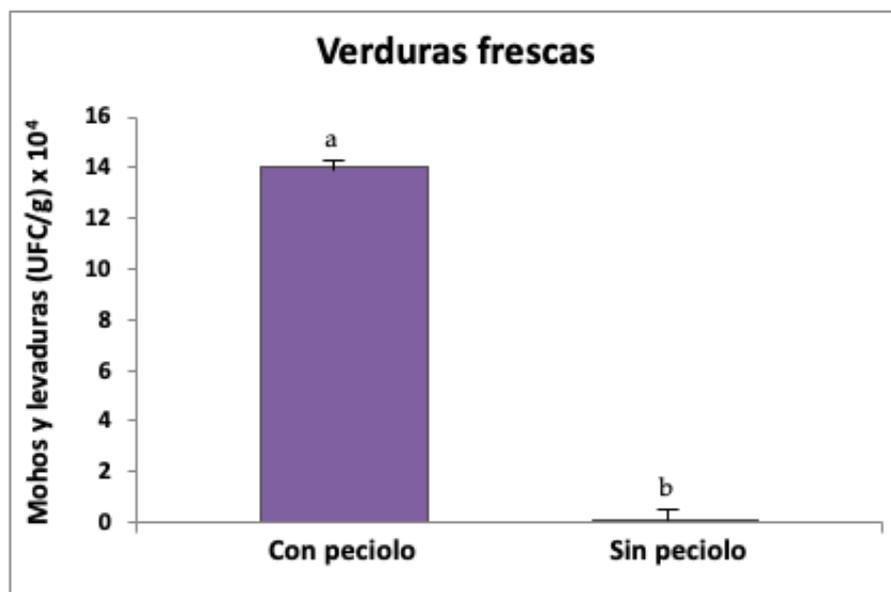


Figura 26 D. Recuentos microbianos de mohos y levaduras (UFC/g) en verduras frescas agrupadas en función de si presentan peciolo (espinacas, acelgas y apio) o no (escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,05$)*

4.3.2.2. Crecimiento microbiológico según la forma de comercialización de las verduras frescas (I o IV Gama)

En la Tabla 12 se encuadran los recuentos de crecimiento de los patógenos alimentarios estudiados en las verduras frescas (espinacas, escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg), en función de su forma de comercialización como frescas (I Gama) o IV Gama. Se aprecia que, en todas ellas, el crecimiento de los microorganismos patógenos (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras) es significativamente superior en las verduras frescas comercializadas como I Gama ($p < 0,001$). Parece ser que el lavado previo de estas verduras frescas, durante su procesado tecnológico, junto con la conservación en atmósferas modificadas en envases apropiados, y en condiciones de refrigeración, disminuye de forma significativa la carga microbiana. Posiblemente esta disminución de los recuentos microbianos esté también asociada a que el lavado de las verduras comercializadas como IV Gama produce, como anteriormente se ha comentado, un descenso de los niveles de los minerales esenciales, debido a pérdidas por lixiviación de éstos en las aguas usadas a tal efecto, por lo que no podrían actuar de forma tan eficiente como factores inductores del crecimiento de estos patógenos alimentarios.

En el caso de *L. monocytogenes* ocurre lo contrario a lo descrito para los otros patógenos alimentarios, y es que en espinacas, lechuga Romana y lechuga Iceberg los recuentos de este microorganismo aumentan significativamente en la IV Gama ($p < 0,001$), posiblemente, y tal como se comentó anteriormente, debido al envasado que facilita un ambiente anaerobio que estimula su crecimiento. La escarola es la única de las verduras frescas estudiadas en la que el crecimiento de *Listeria*, en las lechugas de IV Gama, no aumentó de forma estadísticamente significativa ($p > 0,05$):

Tabla 12. Recuentos medios de los microorganismos objeto de estudio (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas)

VERDURAS FRESCAS/GAMA	<i>L. monocytogenes</i> ± EEM	Mesófilos ± EEM	Psicrófilos ± EEM	Mohos y levaduras ± EEM
Espinacas				
I Gama	53,00 ± 0,687 ^a	26666 ± 3980 ^a	8217775 ± 319129 ^a	123222 ± 28622 ^a
IV Gama	245 ± 2,89 ^b	5000 ± 53,70 ^b	7233 ± 145 ^b	0 ^b
Escarola				
I Gama	35,00 ± 5,26	5633 ± 125 ^a	9367 ± 150 ^a	213,30 ± 6,93 ^a
IV Gama	47,30 ± 1,45	1433 ± 66,70 ^b	2400 ± 57,70 ^b	0 ^b
Lechuga Romana				
I Gama	38,30 ± 0,583 ^a	7767 ± 167 ^a	10207 ± 337 ^a	120 ± 3,82 ^a
IV Gama	52,30 ± 1,45 ^b	1600 ± 57,70 ^b	3067 ± 33,30 ^b	0 ^b
Lechuga Iceberg				
I Gama	34,00 ± 0,502 ^a	6333 ± 88,20 ^a	11770 ± 164 ^a	440 ± 23,00 ^a
IV Gama	63,70 ± 1,86 ^b	1080 ± 41,60 ^a	2433 ± 66,70 ^b	0 ^b

^{ab} La existencia de superíndices diferentes en la misma columna y para cada una de las verduras consideradas denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre la I y la IV Gama

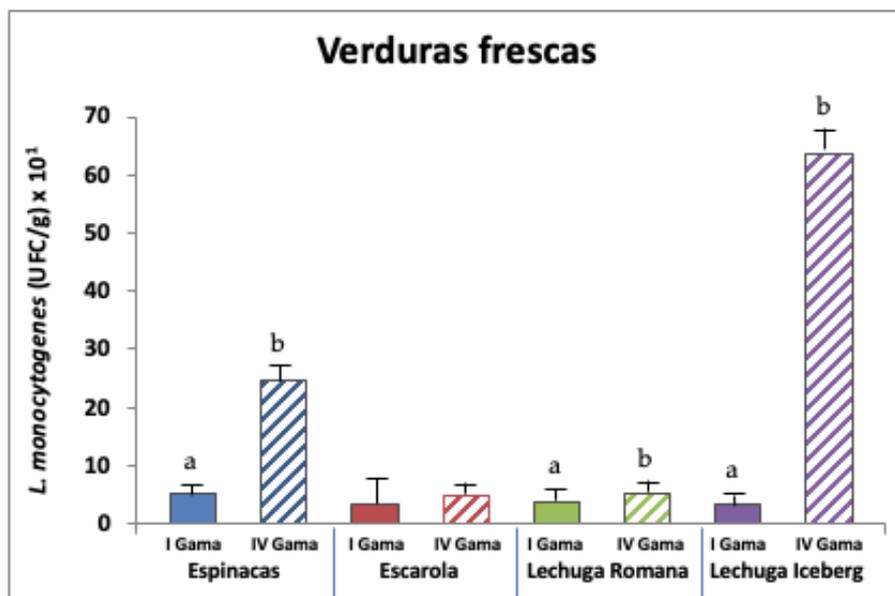


Figura 27. Recuentos microbianos de *L. monocytogenes* (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,01$)

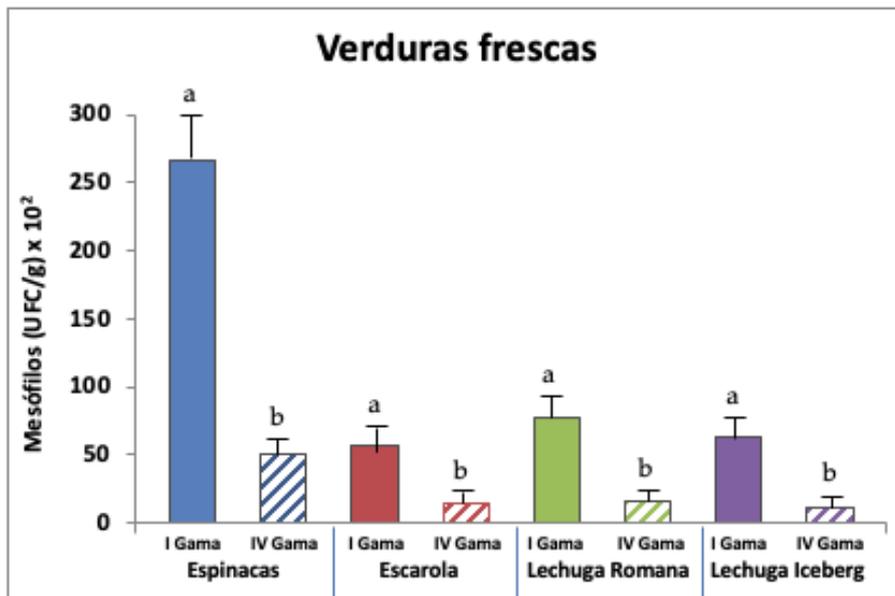


Figura 28. Recuentos microbianos de microorganismos mesófilos (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras ($p < 0,01$)

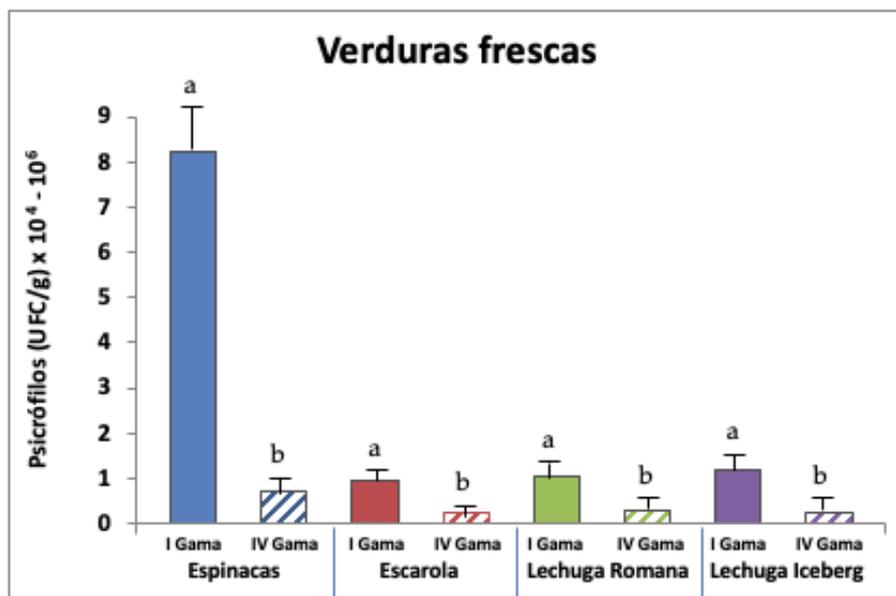


Figura 29. Recuentos microbianos de microorganismos psicrófilos (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras (p < 0,01)*

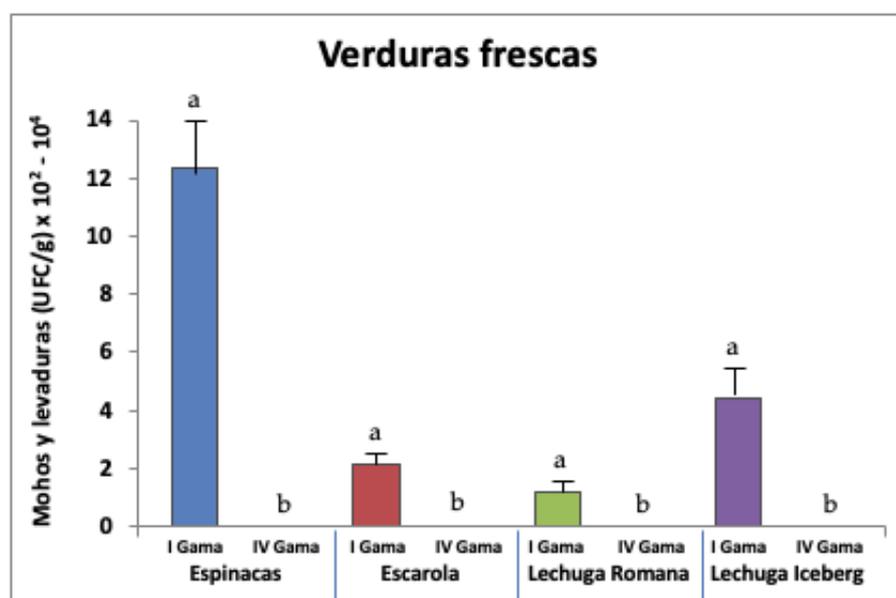


Figura 30. Recuentos microbianos de mohos y levaduras (UFC/g) y error estándar de la media (EEM) en muestras comerciales de verduras frescas agrupadas en función de su forma de comercialización como I Gama (frescas) o IV Gama (lavadas, cortadas, envasadas a vacío y refrigeradas); *diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las verduras (p < 0,01)*

4.4. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de minerales objeto de estudio de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios

4.4.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios

En relación con la correlación lineal bivariada entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre, tanto en las hierbas aromáticas frescas como en las verduras frescas, y el crecimiento microbiano de los grupos de patógenos alimentarios (microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras), se empleó el método de Spearman (no paramétrico), debido a que no se observó homogeneidad de las varianzas por el test de Levene ($p < 0,05$) ni distribución normal de los resultados por el test de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) de los valores de crecimiento microbiano analizados en ninguno de los grupos de microorganismos estudiados.

Por el contrario, para el caso de *L. monocytogenes* sí que se observó una distribución normal de los valores de crecimiento microbiano analizados por la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$), por lo cual se utilizó el coeficiente de correlación obtenido por el método de Pearson.

4.4.1.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre de hierbas aromáticas frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios

La Tabla 13 incluye los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) de los niveles de hierro, cinc y cobre y los valores de crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras para las hierbas aromáticas frescas estudiadas. Se puede apreciar como los niveles de hierro estuvieron correlacionados significativa y positivamente con el crecimiento de los microorganismo psicrófilos ($p < 0,001$), y también con el de *L. monocytogenes* ($p = 0,023$). El crecimiento microbiano de *L. monocytogenes* también estuvo significativa y positivamente correlacionado con las concentraciones de cobre presentes en las hierbas aromáticas frescas. Contrariamente, no hubo correlación entre los niveles de cinc presentes en las hierbas aromáticas frescas y el crecimiento microbiano de ninguno de los cuatro grupos de microorganismos estudiados:

Tabla 13. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre las concentraciones medidas de Fe, Zn y Cu en las hierbas aromáticas frescas y los valores de recuento microbiano en los microorganismos objeto de estudio (UFC/g)

MICROORGANISMOS	Fe		Zn		Cu	
	r^a	p	r^a	p	r^a	p
<i>L. monocytogenes</i>	0,58	0,023	0,431	0,108	0,576	0,025
Microorganismos mesófilos	0,418	0,121	0,086	0,761	-0,021	0,94
Microorganismos psicrófilos	0,893	0,001	0,346	0,206	0,3	0,277
Mohos y levaduras	0,492	0,063	0,007	0,98	-0,311	0,259

^a Se considera una correlación débil cuando el valor de r es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de r está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de r es superior a 0,7

4.4.1.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de hierro, cinc y cobre de verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios

La Tabla 14 incluye los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) de los niveles de hierro, cinc y cobre y los valores de crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras para las verduras frescas estudiadas. Como puede apreciarse, el crecimiento de los cuatro grupos de microorganismos estudiados aumentó significativamente con los niveles de los tres elementos considerados (hierro, cinc y cobre; $p < 0,05$):

Tabla 14. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre las concentraciones medidas de Fe, Zn y Cu en verduras frescas y los valores de recuento microbiano en los microorganismos objeto de estudio (UFC/g)

MICROORGANISMOS	Fe		Zn		Cu	
	r^a	p	r^a	p	r^a	p
<i>L. monocytogenes</i>	0,277	0,043	0,447	0,001	0,512	0,001
Microorganismos mesófilos	0,318	0,019	0,347	0,01	0,471	0,001
Microorganismos psicrófilos	0,359	0,008	0,381	0,005	0,5	0,001
Mohos y levaduras	0,409	0,002	0,395	0,003	0,526	0,001

^a Se considera una correlación débil cuando el valor de r es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de r está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de r es superior a 0,7

4.4.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de calcio y magnesio de hierbas aromáticas frescas y verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios

4.4.2.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de calcio y magnesio de hierbas aromáticas frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios

La Tabla 15 incluye los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) de los niveles de calcio y magnesio presentes y los valores de crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras para las hierbas aromáticas frescas estudiadas.

Como puede apreciarse, sólo el crecimiento de los microorganismos psicrófilos aumentó significativamente con los niveles de magnesio ($p < 0,05$):

Tabla 15. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre las concentraciones medidas de Ca y Mg en hierbas aromáticas frescas y los valores de recuento microbiano en los microorganismos objeto de estudio (UFC/g)

MICROORGANISMOS	Ca		Mg	
	r^a	p	r^a	p
<i>L. monocytogenes</i>	0,272	0,327	0,382	0,159
Microorganismos mesófilos	0,486	0,086	0,514	0,050
Microorganismos psicrófilos	0,468	0,069	0,632	0,011
Mohos y levaduras	-0,495	0,061	0,475	0,073

^a Se considera una correlación débil cuando el valor de r es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de r está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de r es superior a 0,7

4.4.2.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de calcio y magnesio de verduras frescas con el crecimiento microbiano de patógenos alimentarios

La Tabla 16 incluye los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) de los niveles de calcio y magnesio presentes y los valores de crecimiento microbiano de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras para las verduras frescas estudiadas. Como puede apreciarse, el crecimiento de los cuatro grupos de microorganismos estudiados aumentó significativamente con los niveles de los calcio y magnesio ($p < 0,05$), con la excepción de *L. monocytogenes* con las concentraciones de magnesio ($p = 0,051$):

Tabla 16. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre las concentraciones medidas de Ca y Mg en verduras frescas y los valores de recuento microbiano en los microorganismos objeto de estudio (UFC/g)

MICROORGANISMOS	Ca		Mg	
	r^a	p	r^a	p
<i>L. monocytogenes</i>	0,640	0,000	0,272	0,051
Microorganismos mesófilos	0,779	0,000	0,392	0,004
Microorganismos psicrófilos	0,736	0,000	0,497	0,000
Mohos y levaduras	0,704	0,000	0,499	0,000

^a Se considera una correlación débil cuando el valor de r es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de r está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de r es superior a 0,7

4.4.3. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de los minerales objeto de estudio determinados en hierbas aromáticas frescas y verduras frescas

4.4.3.1. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de los minerales objeto de estudio determinados en hierbas aromáticas frescas

La Tabla 17 incluye los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) entre las concentraciones medidas de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en las hierbas aromáticas frescas. Como puede apreciarse, existe una correlación lineal positiva y estadísticamente significativa del hierro con respecto al cobre, cinc y magnesio; del cobre respecto al hierro y al cinc; del cinc respecto al hierro y el cobre; del calcio respecto al magnesio; y finalmente del magnesio respecto al calcio y al hierro ($p < 0,01$):

Tabla 17. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre las concentraciones medidas de Fe, Zn, Cu, Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) en las hierbas aromáticas frescas

	Fe	Zn	Cu	Ca	Mg
	r^a (p)				
Fe	-	0,415 (0,002)	0,449 (0,001)	0,128 (0,365)	0,422 (0,002)
Zn	0,415 (0,002)	-	0,577 (0,001)	0,118 (0,395)	0,177 (0,201)
Cu	0,449 (0,001)	0,577 (0,001)	-	0,031 (0,822)	0,032 (0,821)
Ca	0,128 (0,365)	0,118 (0,395)	0,031 (0,822)	-	0,395 (0,003)
Mg	0,422 (0,002)	0,177 (0,201)	0,032 (0,821)	0,395 (0,003)	-

^a Se considera una correlación débil cuando el valor de r es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de r está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de r es superior a 0,7

4.4.3.2. Correlaciones lineales bivariadas entre las concentraciones de los minerales objeto de estudio determinados en verduras frescas

La Tabla 18 incluye los valores correspondientes a los coeficientes de correlación (r) y los niveles de significancia estadística correspondientes (p) entre las concentraciones medidas de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en las verduras frescas. Como puede apreciarse, existe una correlación lineal positiva de media a fuerte, y estadísticamente significativa, con valores de correlación lineal que se aproximan a 1 y un nivel de significancia $p < 0,001$, entre todos los minerales estudiados: cobre e hierro, cobre y cinc, cobre y magnesio, cobre y calcio, cinc e hierro, cinc y magnesio, cinc y calcio, hierro y calcio, hierro y magnesio, y calcio y magnesio:

Tabla 18. Coeficientes de correlación lineal (r) y niveles de significación (p) entre las concentraciones medidas de Fe, Zn, Cu, Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) en las verduras frescas

	Fe	Zn	Cu	Ca	Mg
	r^a (p)				
Fe	-	0,924 (0,000)	0,847 (0,000)	0,612 (0,000)	0,832 (0,000)
Zn	0,924 (0,000)	-	0,909 (0,000)	0,601 (0,000)	0,862 (0,000)
Cu	0,847 (0,000)	0,909 (0,001)	-	0,639 (0,000)	0,788 (0,000)
Ca	0,612 (0,000)	0,601 (0,000)	0,639 (0,000)	-	0,727 (0,000)
Mg	0,832 (0,000)	0,862 (0,000)	0,788 (0,000)	0,727 (0,000)	-

^a Se considera una correlación débil cuando el valor de r es inferior a 0,4; una correlación media cuando el valor de r está entre 0,4 y 0,7; y una correlación fuerte cuando el valor de r es superior a 0,7

Como se ha mencionado con anterioridad, las **concentraciones de hierro, cinc y cobre** van a variar en función de la hierba aromática fresca (Tabla 1, Figuras 1, 2 y 3), tal y como otros investigadores también han establecido (Tunctürk *et al.*, 2017). De esta forma, los valores medios de cinc y cobre en la albahaca, han sido más elevados respecto a los apreciados en eneldo y cilantro, y respecto al eneldo, respectivamente.

Por otro lado se puede establecer la siguiente secuencia en orden decreciente de las hierbas aromáticas frescas en función de los niveles de cinc: albahaca > romero > tomillo > cilantro > eneldo. Por su parte, para las concentraciones de cobre, las especias quedarían ordenadas de forma similar. Sin embargo, para el hierro los niveles más elevados han correspondido a romero, tomillo y albahaca, estableciéndose el orden decreciente siguiente: romero \cong tomillo > albahaca \cong eneldo y cilantro. Otros investigadores (Bukva *et al.*, 2019), en cuanto al contenido en hierro, determinaron los valores más elevados en peso fresco en el tomillo ($857 \pm 57,9 \mu\text{g/g}$), seguidos de los del romero ($118 \pm 16,6 \mu\text{g/g}$) y, finalmente, los de la albahaca ($112 \pm 61,5 \mu\text{g/g}$) comercializados en Sarajevo (Bosnia y Herzegovina), concentraciones todas ellas considerablemente muy superiores a las encontradas en nuestro estudio.

Otros investigadores han analizado el contenido en los minerales estudiados, así como en otros microelementos esenciales y metales pesados en diferentes hierbas aromáticas, algunas de ellas coincidentes con las estudiadas en nuestro estudio (Tabla 19). Ciertos autores (Özcan *et al.*, 2007) determinaron las concentraciones de hierro, cinc y cobre en las mismas especias, con excepción del eneldo y del cilantro. Al igual que en nuestro estudio, demostraron que para la mayoría de muestras los niveles de hierro eran superiores a los de cinc y éstos, a su vez, mayores que los de cobre. Ambos estudios tienen en común que, para la concentración de hierro, obtuvieron valores superiores en el tomillo y, para la concentración de cinc, en la albahaca.

Otro investigador (Kara, 2009) determinó los niveles de cinc, cobre e hierro en distintas hierbas aromáticas de un supermercado de Balıkesir (Turquía), si bien sólo el tomillo coincidió con las determinadas en nuestro estudio. Las concentraciones en tomillo fueron de $22,4 \pm 2,3$, $6,1 \pm 1,9$ y $440 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$ (peso seco), respectivamente, para niveles expresados también en peso seco de $21,2 \pm 5,11$, $10,1 \pm 1,06$ y $324 \pm 32,7 \mu\text{g/g}$ determinados en nuestro estudio.

Otros autores (Sekeroglu *et al.*, 2008), en muestras de albahaca y de romero de Turquía (expresado en peso seco), encontraron niveles de hierro de $390 \pm 13,60$ y $173 \pm 3,20$ $\mu\text{g/g}$, de cinc de $16,00 \pm 0,20$ y $9,00 \pm 0,30$ $\mu\text{g/g}$ y de cobre de $11,00 \pm 0,300$ y $5,00 \pm 1,00$ $\mu\text{g/g}$; estas concentraciones son, sobre todo, inferiores para el cinc y el cobre a las determinadas en nuestro estudio, al expresarse en peso seco, en estas 2 hierbas aromáticas.

En general y tal como puede observarse en la Tabla 19, las concentraciones de hierro, cinc y cobre determinadas en las hierbas aromáticas frescas consideradas en nuestro estudio, se encuentran por debajo de los niveles determinados por otros autores en otros países. Asimismo, se pone de manifiesto una muy amplia variabilidad en la concentración de estos minerales:

Tabla 19. Valores medios de Fe, Zn y Cu (µg/g) en hierbas aromáticas frescas determinadas en diferentes estudios

HIERBAS AROMÁTICAS FRESCAS	Fe ± EEM	Zn ± EEM	Cu ± EEM	REFERENCIAS
Albahaca	39,50 ± 10,40	7,20 ± 0,50	3,50 ± 0,90	Estudio actual
Albahaca	260,50 ± 2,30	17,60 ± 1,50	11,90 ± 1,66	Tunctürk <i>et al.</i> , 2017
Albahaca	4,95 ± 0,02	0,33 ± 0,02	43,3 ± 1,42	Nkansah <i>et al.</i> , 2016
Albahaca	185,73 ± 13,02 a 1.101,23 ± 49,46	15,22 ± 1,31 a 112,19 ± 3,44	1,44 ± 0,53 a 18,87 ± 1,46	Dghaim <i>et al.</i> , 2015
Albahaca	251 ± 38,2	23,25 ± 5,49	43,3 ± 1,42	Özcan <i>et al.</i> , 2007
Albahaca	305,4	88,9	138	Obiajunwa <i>et al.</i> , 2002
Albahaca	671 ± 20,0	35,5 ± 4,1	6,8 ± 1,5	Abou-Arab <i>et al.</i> , 2000
Romero	75,80 ± 10,40	5,80 ± 0,80	2,70 ± 0,30	Estudio actual
Romero	No detectable	41,5 ± 7,60	83,7 ± 14,2	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Romero	20,6 ± 1,50	383 ± 66,4	25,8 ± 1,90	Potortì <i>et al.</i> , 2020
Romero	735 ± 38,6	7,43 ± 2,37	31,2 ± 3,22	Özcan <i>et al.</i> , 2007
Romero	25,14 ± 0,57	23,47 ± 0,48	0,12 ± 0,04	Kiczorowska <i>et al.</i> , 2015
Tomillo	87,00 ± 13,00	5,20 ± 1,40	2,60 ± 0,30	Estudio actual
Tomillo	41,3 ± 11,2	330 ± 67,2	26,3 ± 4,10	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Italia)
Tomillo	No detectable	155 ± 41,4	30,6 ± 5,20	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Túnez)
Tomillo	198 ± 5,47 a 381 ± 5,89	16,0 ± 0,09 a 33,7 ± 1,21	15,9 ± 0,64 a 25,5 ± 1,33	Tunctürk <i>et al.</i> , 2017
Tomillo	120,75 ± 1,82 a 764,51 ± 39,15	16,50 ± 1,29 a 146,67 ± 7,57	3,52 ± 0,22 a 13,16 ± 0,33	Dghaim <i>et al.</i> , 2015
Tomillo	79,2 ± 33,08	17,5 ± 4,47	1,90 ± 0,64	Özcan <i>et al.</i> , 2007
Eneldo	19,60 ± 1,00	1,80 ± 0,10	1,20 ± 0,10	Estudio actual
Eneldo	-	12,39 (hoja) 4,36 (tallo)	32,55 (hoja) 11,16 (tallo)	Rahimi <i>et al.</i> , 2020
Eneldo	37 ± 0,13	5,67 ± 0,20	2,62 ± 0,09	Słupski <i>et al.</i> , 2004
Eneldo	848 ± 21,0	11,5 ± 2,49	2,1 ± 0,8	Abou-Arab <i>et al.</i> , 2000
Cilantro	32,90 ± 2,10	3,60 ± 0,30	2,50 ± 0,40	Estudio actual
Cilantro	26,1 ± 1,50	147 ± 37,0	26,3 ± 4,10	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Italia)
Cilantro	47,3 ± 4,60	56,3 ± 14,6	30,6 ± 5,20	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Túnez)
Cilantro	48,8 ± 3,30	16,9 ± 0,300	8,4 ± 0,100	Seddigi <i>et al.</i> , 2016
Cilantro	5,75 ± 0,09	29,43 ± 0,37	1,56 ± 0,01	Kiczorowska <i>et al.</i> , 2015
Cilantro	6,60 ± 6,53	14,13 ± 4,23	0,38 ± 0,02	Özcan <i>et al.</i> , 2007

En cuanto a los **niveles de calcio y magnesio** presentes en las hierbas aromáticas frescas, también son muy diferentes atendiendo al tipo de hierba considerada siendo el romero fresco y el tomillo fresco las hierbas aromáticas con niveles de calcio y magnesio superiores. Los niveles más bajos se han apreciado en tomillo para el calcio y eneldo, albahaca, cilantro y romero para el magnesio. En la Tabla 20 se recogen los valores de concentración de calcio y magnesio determinados por otros autores en otros estudios en hierbas aromáticas frescas y, como hemos indicado, existe una gran variabilidad dependiendo del estudio.

Por otro lado, Kara (2009) determinó en tomillo niveles de calcio ($7759 \pm 6,8 \mu\text{g/g}$) y magnesio ($2115 \pm 6,2 \mu\text{g/g}$) en peso seco, los cuales en el caso fueron superiores a los determinados en nuestro estudio referidos a la hierba aromática fresca:

Tabla 20. Valores medios de Ca y Mg ($\mu\text{g/g}$) en hierbas aromáticas frescas determinadas en diferentes estudios

HIERBAS AROMÁTICAS FRESCAS	Ca \pm SEM	Mg \pm SEM	REFERENCIAS
Albahaca	2.501 ± 229	1.080 ± 316	Estudio actual
Albahaca	4.320 ± 120	5.460 ± 130	Tunctürk <i>et al.</i> , 2017
Albahaca	16.453 ± 2.963	3.131 ± 443	Özcan <i>et al.</i> , 2007
Albahaca	26.700	-	Obiajunwa <i>et al.</i> , 2002
Romero	4.886 ± 853	1.193 ± 354	Estudio actual
Romero	712 ± 114	$137 \pm 29,8$	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Italia)
Romero	$549 \pm 27,3$	$84,7 \pm 14,0$	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Túnez)
Romero	8.605 ± 1.908	2.408 ± 264	Özcan <i>et al.</i> , 2007
Tomillo	1.665 ± 122	1.579 ± 92	Estudio actual
Tomillo	1.500 ± 100 a 3.370 ± 390	2.130 ± 200 a 4.290 ± 40	Tunctürk <i>et al.</i> , 2017
Tomillo	9.583 ± 2.665	1.525 ± 144	Özcan <i>et al.</i> , 2007
Eneldo	2.065 ± 138	998 ± 72	Estudio actual
Cilantro	1.271 ± 173	1.089 ± 169	Estudio actual
Cilantro	$10,7 \pm 1,34$	$2,91 \pm 0,320$	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Italia)
Cilantro	$6,91 \pm 0,290$	$2,39 \pm 0,460$	Potortì <i>et al.</i> , 2020 (Túnez)

Por otro lado, **con respecto a las concentraciones de los minerales estudiados en las verduras frescas**, también se ha demostrado que varían en función del tipo de verdura considerada (Tablas 3 y 6, Figuras 6, 7, 8, 13 y 14), tal como también otros autores han indicado en verduras procedentes de Finlandia (Ekholm *et al.*, 2007) entre las que se encontraba el apio fresco, donde determinaron niveles de 6,7 $\mu\text{g/g}$ de hierro, 4,51 $\mu\text{g/g}$ de cinc, 1,46 $\mu\text{g/g}$ de cobre, 438 $\mu\text{g/g}$ de calcio y 149 $\mu\text{g/g}$ de magnesio. Adicionalmente, otros autores (Golubkina *et al.*, 2020) incluso indican que el contenido en hierro, cinc y cobre en muestras de apio fresco varían según el tipo de esta verdura. En cuanto a las concentraciones de cinc y cobre obtenidas en las verduras analizadas en nuestro estudio, se ha establecido el siguiente orden decreciente: acelgas \approx espinacas > apio \approx escarola > lechuga Romana \approx lechuga Iceberg. Sin embargo, para los minerales analizados, otros estudios determinaron niveles que difieren de los obtenidos en nuestro estudio. Para el cinc han establecido el orden siguiente: espinacas > apio > escarola > lechuga, mientras que para el cobre ha sido apio > lechuga > espinacas > escarola (Li *et al.*, 2016). En relación con el contenido en hierro, según los resultados obtenidos en nuestro estudio, las verduras han quedado ordenadas de forma ascendente de la siguiente forma: lechuga Iceberg < lechuga Romana < escarola \approx apio < acelgas \approx espinacas. Como puede apreciarse, son las acelgas y las espinacas, y también es destacable el apio en cuanto al contenido de hierro, cinc y cobre. En este sentido, algunos autores (Shukla *et al.*, 2016) destacan, al estudiar el contenido mineral en verduras, que la cantidad más elevada de hierro se observó en las espinacas.

Otros investigadores (Kawashima *et al.*, 2003) evaluaron las cantidades presentes de hierro, cinc y cobre en vegetales frescos de hoja, determinando niveles en lechuga de 50 ± 20 , 33 ± 4 y 4 ± 2 $\mu\text{g/g}$, y en un sustituto de las espinacas de 100 ± 80 , 30 ± 10 y 5 ± 3 $\mu\text{g/g}$ de hierro, cinc y cobre respectivamente. Estas concentraciones son superiores a las determinadas en nuestro estudio en lechuga Romana ($2,2 \pm 0,3$, $1,4 \pm 0,1$ y $0,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$), en lechuga Iceberg ($1,9 \pm 0,2$, $1,3 \pm 0,1$ y $0,3 \pm 0,1$) y en espinacas ($33,6 \pm 3,7$, $4,9 \pm 0,5$ y $1,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$) de hierro, cinc y cobre respectivamente.

Las variaciones que se han mencionado de las concentraciones medias de hierro, cinc y cobre, tanto en las hierbas aromáticas como en las verduras, pueden deberse a factores como el diferente origen de las muestras, las características edafológicas del suelo de cultivo y los fenómenos climatológicos de la zona, así como de las prácticas agrícolas como el uso de fertilizantes, etc. (Abou-Arab *et al.*, 2000; Tokaloğlu *et al.*, 2012; Cervera-Mata *et al.*, 2019; Cervera-Mata *et al.*, 2020; Cervera-Mata *et al.*, 2021; García-Galdeano *et al.*, 2020) además de a la manipulación humana postcosecha.

En relación con la posible repercusión de la **presencia de peciolo** en las verduras sobre las concentraciones de hierro, cinc y cobre en las mismas, se han observado valores muy superiores de dichos minerales (más del doble) en el grupo compuesto por las verduras con peciolo representado por las espinacas, las acelgas y el apio (Tabla 4, Figura 9). Este hecho pone de manifiesto que dicha estructura fisiológica de la verdura facilita una mayor concentración de estos elementos esenciales.

Otros autores han estudiado las diferencias de concentraciones de micronutrientes en diferentes partes de vegetales, como el caso de la vid de la variedad Tempranillo (Romero, 2015), donde los niveles de hierro determinados en el peciolo fueron hasta ocho veces mayores a los del limbo. En ese mismo estudio, se comprobó que las concentraciones de cinc en el peciolo fueron superiores a las del limbo a partir de la fase de envero (Romero, 2015). Con respecto al cobre, no se hallaron diferencias significativas entre ambas partes (Romero, 2015). Otros autores (Abdel-Sabour *et al.*, 2003) determinaron las concentraciones de hierro, cinc y cobre en verduras con peciolo (coincidentes con la evaluadas en el presente estudio tales como el apio, acelgas, espinacas) y sin peciolo (como la lechuga), observándose contenidos superiores de los tres minerales en el grupo de verduras frescas con peciolo, de forma semejante a lo observado en nuestro estudio.

En referencia a las concentraciones medias de hierro, cinc y cobre en verduras frescas **dependiendo de su sistema de comercialización** directamente como frescas (I Gama) o semiprocadas (al someterse previamente a lavado, corte o división en porciones, mezcla y envasado en envase adecuado en atmósfera protectora, y conservación a refrigeración; IV Gama) (Bevilacqua *et al.*, 2009), hemos apreciado que para el hierro en espinacas y escarola, y para el cinc y cobre adicionalmente en la escarola, las concentraciones encontradas son superiores en las verduras frescas de I Gama.

En definitiva, y como se ha expuesto con anterioridad, parece ser que el lavado de estas verduras, durante su procesado tecnológico, supone importantes pérdidas por lixiviación de estos minerales en las aguas usadas a tal efecto. Sin embargo, y contrariamente en la lechuga Iceberg, los niveles de cobre fueron significativamente mayores en las muestras de IV Gama.

Por tanto, podríamos indicar que, en general, los niveles de hierro, cinc y cobre son superiores en las verduras frescas con peciolo (I Gama), en el caso concreto de la escarola. Estos aspectos habrían de tenerse en consideración cuando desde el punto de vista nutricional se intentan mejorar las ingestas en la dieta diaria de estos elementos esenciales, ya que incluso se están desarrollando métodos de biofortificación en minerales en los vegetales como herramienta útil para mejorar la calidad nutricional de la dieta humana (Buturi *et al.*, 2021). En este sentido, estos investigadores refieren aspectos a considerar como el tipo de vegetal, el genotipo, la forma química del elemento y los protocolos de aplicación durante la biofortificación agronómica, aspectos todos ellos finalmente relacionados con la cuantificación de la fracción biodisponible de estos minerales esenciales (hierro, cinc y cobre; Buturi *et al.*, 2021). Estos investigadores han observado, para el hierro en lechuga, concentraciones medias de 2,3 - 4,3 $\mu\text{g/g}$ (con un incremento medio tras la fortificación de 0,9 veces), para el cinc en lechuga concentraciones medias de 2,2 - 30,4 $\mu\text{g/g}$ (con un incremento medio tras la fortificación de 12,8 veces), y para el cobre en espinacas concentraciones medias de 0,5 - 3,0 $\mu\text{g/g}$ (con un incremento medio tras la fortificación de 4,5 veces). Los niveles de hierro, cinc y cobre, referidos tras la biofortificación por estos autores (Buturi *et al.*, 2021), contemplan rangos superiores al nivel medio encontrado por nosotros en el presente estudio en las mismas verduras frescas, sobre todo para el cinc ($2,2 \pm 0,3$ y $1,9 \pm 0,2$ $\mu\text{g/g}$ de hierro en lechuga Romana e Iceberg respectivamente; $1,4 \pm 0,1$ y $1,3 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$ de cinc en lechuga Romana e Iceberg respectivamente; y $1,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g/g}$ de cobre en espinacas).

En relación con el calcio y el magnesio, se ha observado que existen mayores niveles de estos elementos esenciales en las espinacas y acelgas, así como también en el apio para el calcio. Se da la circunstancia que estas verduras frescas presentan peciolo, las que a su vez contienen unas concentraciones medias superiores a las restantes verduras frescas que no lo presentan (escarola, lechuga Iceberg).

En definitiva, y en concordancia con lo expresado con anterioridad para el hierro, cinc y cobre, **las concentraciones de calcio y magnesio varían ampliamente dependiendo del tipo de verdura fresca considerada**, tal y como también han indicado otros investigadores (Buturi *et al.*, 2021). Éstos han observado para el calcio en lechuga concentraciones medias de 695 - 2.683 $\mu\text{g/g}$ (con un incremento medio tras la fortificación de 2,9 veces). Este rango de concentración de calcio existente tras la biofortificación (Buturi *et al.*, 2021) refiere concentraciones muy superiores al nivel medio encontrado por nosotros en nuestro estudio en las mismas verduras frescas y para el mismo mineral ($262 \pm 6,53$ y $285 \pm 40,3$ $\mu\text{g/g}$ de calcio en lechuga Romana e Iceberg, respectivamente).

En la misma línea que lo establecido anteriormente, se hizo el estudio al agrupar las verduras frescas, **según la presencia o no de peciolo**, de las concentraciones de los mismos minerales (calcio y magnesio) comprobándose mayores niveles, hasta alrededor de 7 veces más, para ambos minerales en las verduras con peciolo. Otros autores (Shukla *et al.*, 2016) determinaron los niveles de calcio en diferentes vegetales de hoja verde, concluyendo que son una muy buena fuente de calcio, entre otros nutrientes.

Por último, y **según el sistema de comercialización**, los niveles de calcio en lechuga Romana, y de magnesio en lechuga Iceberg, fueron superiores en estas verduras frescas cuando se comercializaron como I Gama. Como anteriormente se ha indicado, la disminución en el contenido en estos minerales en la comercialización de estas verduras frescas como IV Gama podría igualmente justificarse a través de sus pérdidas por lixiviación durante el lavado de las mismas, dentro del semiprocésado al que se ven sometidas durante su proceso previo de preparación.

En otros estudios (Babalola *et al.*, 2013) se midieron los niveles de calcio y magnesio en vegetales indígenas del Sudoeste de Nigeria, encontrando en lechuga fresca concentraciones de 7.220 y 2.200 $\mu\text{g/g}$, valores considerablemente superiores a los encontrados en nuestro estudio de $262 \pm 6,53$ y $285 \pm 40,3$ para el calcio, y $170 \pm 6,94$ y $172 \pm 12,0$ $\mu\text{g/g}$ para el magnesio, en lechuga Romana y lechuga Iceberg respectivamente. Otros investigadores (Kawashima *et al.*, 2003) evaluaron las cantidades presentes de calcio y magnesio en vegetales frescos de hoja, determinando niveles en lechuga de 470 ± 140 y 180 ± 50 $\mu\text{g/g}$, y en un sustituto de las espinacas de 640 ± 210 y 550 ± 160 $\mu\text{g/g}$ de calcio y magnesio respectivamente. Estos autores concluyen que todos los vegetales de hoja analizados pueden contribuir considerablemente a la dieta por su aporte de calcio y magnesio (Kawashima *et al.*, 2003; Babalola *et al.*, 2013).

Otros autores (Lisiewska *et al.*, 2006) estudiaron el efecto en el contenido mineral (hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio, entre otros elementos) de diferentes métodos de preparación previos (lavado, pelado, molido, blanqueado, y cocinado de vegetales de raíz) antes de la congelación, entre los que se incluyó el apio. Estos investigadores encontraron que el cocinado del apio congelado procedente de muestras blanqueadas originó un descenso en los niveles de cinc y calcio. Asimismo, indican que el apio descongelado y calentado en un horno microondas aumentó el contenido en magnesio (Lisiewska *et al.*, 2006).

El crecimiento microbiológico ha sido muy variable dependiendo del patógeno alimentario estudiado y de la hierba aromática fresca (García-Galdeano *et al.*, 2019; García-Galdeano *et al.*, 2020). Los microorganismos mesófilos han mostrado los recuentos más elevados en el romero y los más bajos en el cilantro. En relación con los microorganismos psicrófilos, los niveles de crecimiento más elevados se han determinado en el tomillo y los menores en el eneldo. En el caso de los mohos y levaduras, esos recuentos mayores y menores han correspondido al cilantro y la albahaca, respectivamente. Finalmente, *L. monocytogenes* mostró los niveles de crecimiento más elevados en el tomillo y los menores en el cilantro. De los cuatro patógenos alimentarios estudiados, los que han manifestado niveles de crecimiento considerablemente más elevados han sido los microorganismos psicrófilos, y los más bajos han correspondido a *L. monocytogenes*.

Respecto a los recuentos obtenidos de microorganismos mesófilos y *L. monocytogenes* en las hierbas aromáticas frescas de nuestro estudio, el cilantro ha resultado ser la que presenta mayor calidad higiénica, al contrario que el tomillo y el romero, donde se han determinado recuentos superiores de *L. monocytogenes* y microorganismos mesófilos respectivamente (Tabla 9, Figuras 18 y 19). Sin embargo y de forma contraria, otros estudios (Macwan *et al.*, 2016) han establecido que los aceites esenciales de algunas especias como el clavo, la canela y el tomillo, pueden actuar como potentes inhibidores de microorganismos tales como *L. monocytogenes*.

Por otro lado, el desarrollo de mohos y levaduras ha sido superior en el cilantro e inferior en la albahaca (Figuras 21 y 21 A). Este hecho podría estar relacionado con que el aceite esencial de albahaca presenta compuestos principalmente no fenólicos, que generan una elevada toxicidad para las levaduras (Macwan *et al.*, 2016). Finalmente, en cuanto a los microorganismos psicrófilos, el eneldo y el tomillo han resultado ser las hierbas aromáticas frescas con una mayor y menor calidad higiénica, respectivamente (Figura 20).

Otros investigadores (Garbowska *et al.*, 2015) han obtenido resultados similares en relación con el crecimiento de microorganismos mesófilos en las hierbas aromáticas. De forma distinta, en hierbas aromáticas deshidratadas hemos determinado niveles de crecimiento microbiano más elevados en la albahaca (García-Galdeano, *et al.*, 2020). Este resultado podría resultar controvertido pero hay que tener en cuenta que se desarrolló en hierbas aromáticas deshidratadas, mientras que en este Capítulo que nos ocupa el estudio se realizó en hierbas aromáticas frescas con la consiguiente influencia de la actividad de agua tan distinta, en las hierbas deshidratadas respecto a las hierbas aromáticas frescas, en el desarrollo y correspondientes recuentos de los patógenos alimentarios considerados. Otras publicaciones, al igual que lo indicado en el presente estudio, han demostrado que existen diferencias significativas en cuanto a la contaminación microbiana de las hierbas aromáticas (Moreira *et al.*, 2009; Garbowska *et al.*, 2015). Esta variabilidad de los resultados puede estar promovida por la presencia en las especias de sustancias antibacterianas como el timol (en el tomillo) o el canfeno (en el romero), las cuales podrían inhibir el crecimiento microbiano y contribuir a recuentos menores (Burt, 2004; Garbowska *et al.*, 2015), así como por la diferente actividad de agua de las hierbas aromáticas consideradas.

Debido a la presencia de microorganismos patógenos alimentarios en las hierbas aromáticas frescas, por su procedencia del suelo (ciertos mohos), del agua de riego o lavado (ciertos mohos y levaduras) y de las actividades antropogénicas (como *L. monocytogenes*; Mrozek-Szetela, 2020), como también hemos comprobado en nuestro estudio, se hace necesario unificar los protocolos de purificación de las hierbas aromáticas, donde la higienización por ozono parece ser una de las más prometedoras al alcanzar unos elevados índices de reducción de la contaminación microbiológica presente.

En el caso de las verduras frescas, han sido las acelgas, las espinacas y el apio las que han experimentado un mayor crecimiento de *L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras (Tabla 10, Figuras 22, 23, 24, 24 A, 25 y 25 A). Este hecho parece estar relacionado con que son las únicas muestras de verduras que presentan peciolo. Tal y como se ha mencionado anteriormente en varias ocasiones, se puede considerar que esta estructura actúa como reservorio de minerales, lo que consecuentemente deriva en un mayor crecimiento de microorganismos al utilizarlos como nutrientes y a la vez factores de crecimiento (Tabla 11 y Figuras 26, 26 A, 26 B, 26 C y 26 D). Por otro lado, el peciolo se considera una nervadura donde la presencia de agua es considerable, lo cual también contribuye al desarrollo de microorganismos (Guerrero *et al.*, 2014; Cobo, 2019). Otra investigadora (Soendjojo, 2012) ha determinado también el contenido en microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, en muestras de lechuga Romana y espinacas adquiridas en tiendas de alimentación o bien directamente a los agricultores, concluyendo que existe una gran variación de los recuentos de estos microorganismos dependiendo del tipo de producto (lechuga Romana, espinaca o cogollos de lechuga), días de muestreo y localización de los lugares de adquisición. Como resultado, esta investigadora ha relatado recuentos de microorganismos mesófilos (desde $3,5 \times 10^5$ hasta $1,1 \times 10^6$ UFC/g en lechuga Romana, y $> 3 \times 10^6$ UFC/g en espinacas) y de microorganismos psicrófilos (desde $6,4 \times 10^6$ hasta $7,5 \times 10^6$ en lechuga Romana, y $> 3 \times 10^7$ UFC/g en espinacas) más elevados para ambas verduras, en comparación con los determinados en nuestro estudio ($7,8 \times 10^3$ y $1,02 \times 10^4$ en lechuga Romana, y $2,66 \times 10^4$ y $8,2 \times 10^6$ UFC/g en espinacas, respectivamente para los dos grupos de patógenos alimentarios comparados). Por otro lado, los recuentos de mohos y levaduras (desde $2,7 \times 10^3$ hasta $2,1 \times 10^4$ en lechuga Romana, y $2,6 \times 10^3$ UFC/g en espinacas; Soendjojo, 2012) fueron superiores a los determinados en nuestro estudio en la lechuga Romana ($1,20 \times 10^2$ UFC/g) y, sin embargo, considerablemente inferiores en las espinacas ($1,23 \times 10^5$ UFC/g; concentración media medida en nuestro estudio). Como puede apreciarse también, esta autora (Soendjojo, 2012) refiere crecimiento de patógenos alimentarios (microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos) también mayores en espinacas (verdura con peciolo), respecto a la lechuga Romana, como también nosotros hemos encontrado en nuestro estudio.

En los últimos años ha habido un aumento en la demanda de verduras y ensaladas listas para comer (IV Gama), debido al cambio en los hábitos alimentarios de ciertas personas especialmente interesadas en modos de vida más saludables (Taban *et al.*, 2011). Sin embargo, las verduras frescas y las ensaladas de IV Gama (con distintas lechugas y espinacas) han sido responsables de distintos brotes de contaminación alimentaria por microorganismos patógenos (Taban *et al.*, 2011), debido al empleo de aguas de riego no tratadas, uso de fertilizantes orgánicos inapropiados (como puede ser el estiércol o los purines de las granjas), o bien fallos durante la cosecha, o postcosecha derivados de la acción humana tales como la manipulación, conservación, procesado (lavado, pelado, corte, mezcla, etc.), embalaje, distribución y venta de éstas, asociadas a un incremento del comercio internacional (Beuchat, 2002; Taban *et al.*, 2011), habiéndose señalado a *L. monocytogenes* como uno de los patógenos alimentarios más comunes presentes en las verduras frescas. Se ha indicado que en los productos frescos cortados sometidos a pelado y corte posterior se incrementa la susceptibilidad para el crecimiento microbiano (Tournas, 2005) y que, concretamente, *L. monocytogenes* es un patógeno contaminante alimentario (Li *et al.*, 2017) que crece en una gran variedad de verduras a temperaturas de refrigeración (Beuchat *et al.*, 2002), habiéndose indicado que causa una listeriosis severa y que tienen una índice de mortalidad elevado de $\cong 30\%$ (Gómez *et al.*, 2014).

En nuestro estudio, hemos comprobado que en todas las verduras consideradas (espinacas, escarola, lechuga Romana y lechuga Iceberg) los recuentos microbianos para microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, son superiores en las frescas no tratadas (I Gama) frente a las mínimamente procesadas (lavadas, peladas, cortadas, mezcladas y envasadas; IV Gama). Sin embargo, según hemos observado, sucede lo contrario en el caso de *L. monocytogenes*, con un incremento del crecimiento microbiano en las condiciones anaerobias del envasado final, resultado altamente significativo y muy para tener en cuenta. Esto es así porque, en cierta medida, contraviene la falsa confianza que puede conllevar en los consumidores finales la conservación de las verduras de IV Gama a temperaturas de refrigeración en los frigoríficos, en cuanto la limitación efectiva del desarrollo microbiano en estas condiciones. Esto, según hemos observado, no ocurre en el caso de *L. monocytogenes* sino todo lo contrario, con el consiguiente riesgo para la salud que ello podría suponer.

Por otro lado, otros autores (Azimirad *et al.*, 2021) no aprecian diferencias en los recuentos microbianos de *Listeria* en las verduras de hoja frescas y en las listas para comer mínimamente procesadas, ni cuando el recuento se realiza por métodos microbiológicos normales ni por ensayos de PCR en tiempo real. Estos autores concluyen que existe una falta de sistemas de descontaminación efectiva en la producción en cadena en Irán, al comprobar la existencia, tanto en verduras de hoja frescas como en las de IV Gama, una contaminación por bacterias patógenas de transmisión alimentaria. De manera general, indican que hay mayores índices de contaminación por bacterias patógenas alimentarias en verduras de hoja frescas frente a las de IV Gama, como también hemos comprobado en microorganismos mesófilos y microorganismos psicrófilos en nuestro estudio.

Otros autores (Tian *et al.*, 2012) estudiaron la supervivencia y crecimiento de patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (como *L. monocytogenes*, entre otros) en vegetales mínimamente procesados como lechuga Romana, lechuga Iceberg y brotes a 4 y 15 °C, concluyendo que la supervivencia y crecimiento de estos microorganismos en verduras frescas eran muy distintos dependiendo del microorganismo patógeno considerado y de la temperatura de almacenamiento (recomendándose finalmente el almacenamiento de las verduras frescas en condiciones refrigeradas a temperaturas < 4 °C). Estos autores determinaron recuentos de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento a 4 °C considerablemente superiores (en lechuga Romana desde $6.918 \pm 6,76$ hasta $87.096 \pm 3,80$ UFC/g, y en lechuga Iceberg desde $1.950 \pm 2,29$ hasta $8.511 \pm 8,13$ UFC/g, los días 0 y 15 de almacenamiento a esa temperatura respectivamente) a los determinados en nuestro estudio con valores de $38,3 \pm 0,583$ y $34,3 \pm 0,502$ UFC/g, en las muestras de lechuga Romana e Iceberg respectivamente.

En las **hierbas aromáticas frescas**, se puede apreciar que cuando aumentaron los niveles de hierro se elevaron los valores de crecimiento tanto de microorganismos psicrófilos como de *L. monocytogenes*. Además, los recuentos de *L. monocytogenes* también aumentaron con las concentraciones de cobre. Por otro lado, también al aumentar las concentraciones de magnesio aumentaron los recuentos de microorganismos psicrófilos. Por tanto, y tal y como hemos establecido con anterioridad en hierbas aromáticas deshidratadas (García-Galdeano *et al.*, 2020) en el caso concreto de *L. monocytogenes*, no podemos descartar que tanto el hierro como el cobre sean minerales que pudiesen actuar como factores de crecimiento de esta bacteria anaerobia, hecho que también se podría establecer para el hierro y el magnesio para los microorganismos psicrófilos (García-Galdeano *et al.*, 2020; García-Galdeano *et al.*, 2021).

En las **verduras frescas**, el crecimiento de los cuatro grupos de microorganismos patógenos estudiados (*L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras) aumentó con el incremento de los niveles de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio con la excepción de los recuentos de *L. monocytogenes* con las concentraciones de magnesio, lo que podría poner de manifiesto que estos minerales esenciales actúan como factores de crecimiento de estos cuatro grupos de patógenos alimentarios (en este caso, sin embargo, en verduras frescas) (García-Galdeano *et al.*, 2020, García-Galdeano *et al.*, 2021).

Por otro lado, se han establecido correlaciones entre los niveles de hierro, cinc y cobre tanto en las hierbas aromáticas frescas como en las verduras frescas estudiadas.

Se ha demostrado que existe correlación entre las concentraciones de los metales evaluados en las **hierbas aromáticas frescas**, concretamente del hierro con respecto al cobre, cinc y magnesio; del cobre respecto al hierro y al cinc; del cinc respecto al hierro y al cobre; del calcio respecto al magnesio; y finalmente del magnesio respecto al calcio y al hierro. En estudios previos desarrollados por otros autores, así como por nosotros, (Kara, 2009; García-Galdeano *et al.*, 2020) también se han encontrado correlaciones lineales positivas entre el hierro, el cinc y el cobre en varias infusiones y hierbas aromáticas tales como la rosa mosqueta, el tomillo y el jengibre, entre otras. Contrariamente, en un estudio desarrollado en Ghana, donde se determinaron los niveles de hierro y cinc en hierbas medicinales frescas, entre las que evaluaron la albahaca, otros autores (Nkansah *et al.*, 2016) no encontraron correlaciones lineales entre estos minerales.

En el caso de las **verduras frescas**, se ha observado que existe una correlación lineal positiva de media a fuerte entre todos los minerales estudiados (cobre e hierro, cobre y cinc, cobre y magnesio, cobre y calcio, cinc e hierro, cinc y magnesio, cinc y calcio, hierro y calcio, hierro y magnesio, y calcio y magnesio).

5. Conclusiones

1) Las concentraciones de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio en las hierbas aromáticas y verduras frescas analizadas varían en función del tipo de muestra. En las hierbas aromáticas frescas, los niveles más altos y más bajos para el hierro se encontraron en el tomillo y eneldo; y para el cinc y el cobre en la albahaca y el eneldo respectivamente. Para el calcio, los valores más altos correspondieron a la albahaca y los más bajos al cilantro; y para el magnesio, los más elevados se determinaron en el tomillo, no existiendo diferencias en las concentraciones halladas en las restantes hierbas frescas.

2) En las verduras frescas, de forma general, las espinacas, acelgas y el apio (verduras con peciolo), son las que han presentado mayor contenido de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio, y la lechuga Romana y la lechuga Iceberg las de un menor contenido. Las verduras con peciolo presentaron concentraciones, dependiendo del mineral estudiado, entre dos y ocho veces superiores a las que no tiene peciolo. En las verduras frescas (I Gama), en general y dependiendo del mineral y de la verdura, las concentraciones de los minerales son más elevadas; concretamente, en la escarola para el hierro, cinc y cobre; en la lechuga Iceberg para el cobre y el magnesio; en la lechuga Romana para el calcio y en las espinacas para el hierro.

3) Los recuentos de los patógenos alimentarios (*L. monocytogenes*, microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras) en las hierbas aromáticas y verduras frescas también han variado en función del tipo de muestra. En las hierbas aromáticas frescas, en el tomillo se han determinado los recuentos más elevados para *L. monocytogenes* y microorganismos psicrófilos; en el romero para los microorganismos mesófilos; y en el cilantro para los mohos y levaduras. En las verduras frescas, las que presentan peciolo (espinacas, acelgas y el apio) tienen recuentos microbianos más elevados para los cuatro patógenos alimentarios estudiados.

La presencia del peciolo en las verduras podría actuar como reservorio natural de los patógenos alimentarios considerados, cuyo crecimiento podría verse además estimulado por los niveles más elevados de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio, también determinados en las verduras con peciolo, que a su vez podrían actuar como factores de crecimiento de estos microorganismos. Los recuentos microbianos de microorganismos mesófilos, microorganismos psicrófilos, y mohos y levaduras, fueron superiores en las cuatro verduras frescas estudiadas (I Gama); contrariamente, el crecimiento de *L. monocytogenes* fue mayor en todas las verduras mínimamente procesadas comercializadas como IV Gama, lo que establece el efecto estimulante del ambiente anaerobio en estas verduras, dispuestas en los envases apropiados y refrigeradas, en el desarrollo de éste patógeno alimentario.

4) En las hierbas aromáticas hemos encontrado una correlación positiva entre las concentraciones de hierro y el crecimiento de *L. monocytogenes* y microorganismos psicrófilos; entre las de cobre y el de *L. monocytogenes*; y entre las de magnesio y microorganismos psicrófilos. En las verduras frescas, también aumentó el crecimiento de todos los patógenos estudiados, con el incremento de los niveles de hierro, cinc, cobre, calcio y magnesio, con la excepción de los recuentos de *L. monocytogenes* en relación con las concentraciones de magnesio, lo que también abogaría por la actuación de estos minerales esenciales como factores de crecimiento de los mismos en verduras frescas.

Se ha comprobado que los niveles de hierro, cinc y cobre en las hierbas aromáticas se han correlacionado de forma lineal y positiva entre sí. Esto mismo sucede en el caso de las verduras, donde se ha puesto de manifiesto una correlación fuerte entre las concentraciones de los minerales.

En las hierbas aromáticas frescas, existe una correlación positiva entre las concentraciones de hierro respecto al cinc, cobre y magnesio; del cobre respecto al cinc; y del calcio respecto al magnesio. En las verduras frescas se ha determinado que existe una correlación positiva entre todos los minerales estudiados: cobre con hierro, cinc, magnesio y calcio; cinc con hierro, magnesio y calcio; hierro con calcio y magnesio; y calcio con magnesio.

6. Bibliografía

1. Abdel-Sabour, M.F.; Rabie, F.H. Accumulation of heavy metals in vegetable plants grown in Mostorod area. *Egypt. J. Soil Sci.* **2003**, *43*, 63-76.
2. Abou-Arab, A.A.K.; Donia, M.A.A. Heavy metals in Egyptian spices and medicinal plants and the effect of processing on their levels. *J. Agr. Food Chem.* **2000**, *48*, 2300-2304.
3. Aguerri, I. Análisis de la situación actual del consumo de productos de IV Gama en Pamplona. Universidad Pública de Navarra, **2014**.
4. Alarcón-Flores, M.I.; Romero-González, R.; Martínez Vidal, J.L.; Egea González, F.J.; Garrido Frenich, A. Monitoring of phytochemicals in fresh and fresh-cut vegetables: a comparison. *Food Chem.* **2014**, *142*, 392-399.
5. Alzamora, S.M.; Salvatori, D.; Tapia, M.S.; Lopez-Malo, A.; Welti-Chanes, J.; Fito, P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *J. Food Eng.* **2005**, *67*, 205-214
6. Azimirad, M.; Nadalian, B.; Alavifard, H.; Panirani, S.N.; Vand Bonab, S.M.; Azimirad, F.; Gholami, F.; Jabbari, P.; Yadegar, A.; Busani, L.; Aghdaei, H.A.; Zali, M.R. Microbiological survey and occurrence of bacterial foodborne pathogens in raw and ready-to-eat green leafy vegetables marketed in Tehran, Iran. *Intern. J. Hyg. Environ. Health* **2021**, *237*, 113824.
7. Babalola, S.O.; Akinwande, B.A. Determination of minerals by ICP-AES in indigenous vegetables from Southwest Nigeria. *Nutr. Food Sci.* **2014**, *44*, 249-257.
8. Barret, D.M.; Beaulieu, J.C.; Shewfelt, R. Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh-cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 369-389.
9. Barry-Ryan, C.; O'Beirne, D. Quality and shelf-life of freshcut carrot slices as affected by slicing method. *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 851-856.
10. Berger, C.N.; Sodha, S.V.; Shaw, R.K.; Griffin, P.M.; Pink, D.; Hand, P.; Frankel, G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 2385-2397.
11. Bergmann, W. Nutritional Disorders of Plants Color Atlas. Gustav Fischer Verlag **1992**, 386.

12. Bevilacqua, M.; Ciarapica, F.E.; Giacchetta, G. Business process reengineering of a supply chain and a traceability system: A case study. *J. Food Engineer.* **2009**, *93*, 13-22.
13. Beuchat, L.R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microb. Infec.* **2002**, *4*, 413-423.
14. Bosiacki, M.; Tyksinski, W. Copper, zinc, iron and manganese content in edible parts of some fresh vegetables sold on markets in Poznań. *J. Elem.* **2009**, *14*, 13-21.
15. Bukva, M.; Kapo, D.; Huseinbašić, N.; Gojak-Salimović, S.; Huremović, J. Iron content in fruits, vegetables, herbs and spices samples marketed in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. *Kem. Ind.* **2019**, *68*, 281-287.
16. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223-253.
17. Buturi, C.M.; Mauro, R.P.; Fogliano, V.; Leonardi, C.; Giuffrida, F. Mineral biofortification of vegetables as a tool to improve human diet. *Foods* **2021**, *10*, 223.
18. Caleb, O.; Mahajan, P.; Al-Said, F.; Opara, U. Modified atmosphere packaging technology of fresh and fresh-cut produce and the microbial consequences - a review. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 303-329.
19. Cámara, M.; de Cortés, M.; Torija, E. Frutas y verduras, fuentes de salud. Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Consejería de Sanidad y Consumo de la Comunidad de Madrid **2008**.
20. Carreres, J.E. Cuarta Gama. Una alternativa de futuro **2006**.
21. Cervera-Mata, A.; Navarro-Alarcón, M.; Delgado, G.; Pastoriza, S.; Montilla-Gómez, J.; Llopis, J.; Sánchez-González, C.; Rufián-Henares, J.A. Spent coffee grounds improve the nutritional value in elements of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and are an ecological alternative to inorganic fertilizers. *Food Chem.* **2019**, *282*, 1-8.
22. Cervera-Mata, A.; Navarro-Alarcón, M.; Rufián-Henares, J.A.; Pastoriza, S.; Montilla-Gómez, J.; Delgado, G. Phytotoxicity and chelating capacity of spent coffee grounds: two contrasting faces in its use as soil organic amendment. *Sci. Total Environ.* **2020**, *717*, 137247.

23. Cervera-Mata, A.; Fernández-Arteaga, A.; Navarro-Alarcón, M.; Hinojosa, D.; Pastoriza, S.; Delgado, G.; Rufián-Henares, J.A. Spent coffee grounds as a source of smart biochelates to increase Fe and Zn levels in lettuces. *J. Cleaner Product.* **2021**, 328, 129548.
24. Curutchet, E.; Dellacassa, J.A.; Ringuelet, A.R.; Chaves, A.R.; Viña, S.Z. Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*Mentha piperita* and *M. spicata*). *Food Chem.* **2014**, 143, 231-238
25. Dghaim, R.; Al Khatib, S.; Rasool, H.; Khan, M.A. Determination of heavy metals concentration in traditional herbs commonly consumed in the United Arab Emirates. *J. Environ. Public. Health* **2015**, 973878, 1-6.
26. Ekholm, P.; Reinivuo, H.; Mattila, P.; Pakkala, H.; Koponen, J.; Happonen, A.; Hellstrom, J.; Ovaskainen, M.L. Changes in the mineral content of cereals, fruits and vegetables in Finland. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, 20, 487-495.
27. Fan, X.; Sokorai, K.J.B. Retention of quality and nutritional value of 13 fresh-cut vegetables treated with low-dose radiation. *J. Food Sci.* **2008**, 73, S367-S372.
28. Francis, G.A.; Gallone, A.; Nychas, G.J.; Sofos, J.N.; Colelli, G.; Amodio, M.L.; Spano, G. Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Food Sci. Nutr.* **2012**, 52, 595-610.
29. García-Galdeano, J.M.; Villalón-Mir, M.; Medina, J.; Vázquez-Foronda, L.M.; Zamora-Bustillos, J.G.; Agil, A.; Fonseca, S.M.; Navarro-Alarcón, M. Zn, Cu, and Fe Concentrations in Dehydrated Herbs (Thyme, Rosemary, Cloves, Oregano, and Basil) and the Correlation with the Microbial Counts of *Listeria monocytogenes* and Other Foodborne Pathogens. *Foods.* **2020**, 9, 1658.
30. García-Galdeano, J.M.; Villalón-Mir, M.; Medina-Martínez, J.; Fonseca-Moor-Davies, S.M.; Zamora-Bustillos, J.G.; Vázquez-Foronda, L.M.; Agil, A.; Navarro-Alarcón, M. Ca and Mg Concentrations in Spices and Growth of Commonly Sporulated and Non-Sporulated Food-Borne Microorganisms According to Marketing Systems. *Foods.* **2021**, 9, 1-16.
31. Garbowska, M.; Berthold-Pluta, A.; Stasiak-Róžańska, L. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter spp.* *Food Microbiol.* **2015**, 49, 1-5.
32. Guerrero, I.; García, B.; Wachter, M.; Regalado, C. Microbiología de los alimentos. Ed. Limusa **2014**, 179-195.

33. Golubkina, N.A.; Kharchenko, V.A.; Moldovan, A.I.; Koshevarov, A.A.; Zamana, S.; Nadezhkin, S.; Soldatenko, A.; Sekara, A.; Tallarita, A.; Caruso, G. Yield, growth, quality, biochemical characteristics and elemental composition of plant parts of celery leafy, stalk and root types grown in the Northern Hemisphere. *Plants* **2020**, *9*, 484.
34. Gómez, D.; Azón, E.; Marco, N.; Carramiñana, J.J.; Rota, C.; Ariño, A.; Yanguela, J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* **2014**, *42*, 61-65.
35. Jacxsens, L.; Devlieghere, F.; Ragaert, P.; Vanneste, E.; Debevere, J. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *83*, 263-280.
36. Jefferies, R.T.; Willis, A.J. Studies on the calcicole-calcifuge habit. II. The influence of calcium on the growth and establishment of four species in soil and sand cultures. *J. Ecol.* **1964**, *52*, 691-707.
37. Junqueira-Gonçalves, G.E.; Zuñiga, G.E.; Zárate, H.; Arcos, K.; Ganga, A.; Miltz, J. Effect of γ -radiation on chives safety and quality. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 2436-2443.
38. Kara, D. Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chem.* **2009**, *114*, 347-354.
39. Kawashima, L.K.; Valente Soares, L.M. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *J. Food Compos. Anal.* **2003**, *16*, 605-611.
40. Kiczorowska, B.; Klebaniuk, R.; Bąkowski, M.; Al-Yasiry, A.R.M. Culinary herbs-the nutritive value and content of minerals. *J. Elemen.* **2015**, *20*, 599-608.
41. King, A.D.; Bolin, H.R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* **1989**, *43*, 132-139.
42. Li, B.; Wang, Y.; Jiang, Y.; Li, G.; Cui, J.; Wang, Y.; Zhang, H.; Wang, S.; Xu, S.; Wang, R. The accumulation and health risk of heavy metals in vegetables around a zinc smelter in northeastern China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 25114-25126.

43. Li, F.; Li, B.; Dang, H.; Kang, Q.; Yang, L.; Wang, Y.; Aguilar, Z.P.; Lai, W.; Xu, H. Viable pathogens detection in fresh vegetables by quadruplex PCR. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2017**, *81*, 306-313.
44. Lisiewska, Z.; Kmiecik, W.; Gebczynski, P. Effects on mineral content of different methods of preparing frozen root vegetables. *Food Sci. Tech. Int.* **2006**, *12*, 497-503.
45. Luo, Y.; McEvoy, J.L.; Wachtel, M.R.; Kim, J.G.; Huang, Y. Package Atmosphere Affects Postharvest Biology and Quality of Fresh-cut Cilantro Leaves. *HortScience* **2004**, *39*, 567-570.
46. Macwan, S.R.; Dabhi, B.K.; Aparnathi, K.D.; Prajapati, J.B. Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2016**, *5*, 2319-7706.
47. Marschner, H. Magnesium. Mineral Nutrition of Higher Plants (second edition). Academic Press **1995**, 277-285.
48. Martínez-Sánchez, A.; Marín, A.; Llorach, R.; Ferreres, F.; Gil, M.I. Controlled atmosphere preserves quality and phytonutrients in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Postharvest Biol. Technol.* **2006**, *40*, 26-33.
49. Moreira, P.; Lourencao, T.; Pinto, J.; Rall, V. Microbiological quality of spices marketed in the city of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 421-424.
50. Mrozek-Szetela, A.; Rejda, P.; Wińska, K. A review of hygienization methods of herbal raw materials. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 8268.
51. Nkansah, M.A.; Hayford, S.T.; Borquaye, L.S.; Ephraim, J.H.; Ng, C. Heavy metal contents of some medicinal herbs from Kumais, Ghana. *Cogent Environ. Sci.* **2016**, *2*, 1234660.
52. Obiajunwa, E.I.; Adebajo, A.C.; Omobuwajo, O.R. Essential and trace element of some Nigerian medicinal plants. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2002**, *252*, 473-476.
53. Özcan, M.M.; Ünver, A.; Uçar, T.; Arslan, D. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1120-1127.
54. Potortì, A.G.; Bua, G.D.; Lo Turco, V.; Ben Tekaya, A.B.; Beltifa, A.; Ben Mansour, H.; Dugo, G.; Di Bella, G. Major, minor and trace element concentrations in spices and aromatic herbs from Sicily (Italy) and Mahdia (Tunisia) by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chem.* **2020**, *313*, 126094.

55. Rahimi, A.M.; Özyazici, G.; Ahmadi, F. Effects of some heavy metals (Cd, Cu, Pb, and Zn) concentration on qualitative traits of dill (*Anethum graveolens L.*) and basil (*Ocimum basilicum L.*). *J. Agric. Sci.* **2020**, *4*, 54-67.
56. Romero, I. Análisis de limbo y pecíolo para el diagnóstico nutricional de la vid (*Vitis vinifera L.*), cv. Tempranillo. Universidad de La Rioja **2015**.
57. Santos, J.; Herrero, M.; Mendiola, J.A.; Oliva-Teles, M.T.; Ibáñez, E.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M.B.P.P. Fresh-cut aromatic herbs: Nutritional quality stability during shelf-life. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2014**, *59*, 101-107.
58. Sekeroglu, N.; Ozkutlu, F.; Kara, S.M.; Ozguven, M. Determination of cadmium and selected micronutrient sin commonly used and traded medicinal plants in Turkey. *J. Sci Food Agric.* **2008**, *88*, 86-90.
59. Shukla, P.; Kumar, R.; Ra, A.K. Detection of minerals in green leafy vegetables using laser induced breakdown spectroscopy. *J. Appl. Spectr.* **2016**, *83*, 872-877.
60. Słupski, J.; Lisiewska, Z.; Kmiecik, W. Contents of macro and microelements in fresh and frozen dill (*Anethum graveolens L.*). *Food Chem.* **2005**, *91*, 737-743.
61. Soendjojo, E. Is local produce safer? Microbiological quality of fresh lettuce and spinach from grocery stores and farmers' markets. *J. Purdue Undergrad. Res.* **2012**, *2*, 54-63.
62. Taban, B.M.; Halkman, A.K. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe* **2011**, *17*, 286-287.
63. Tian, J.Q.; Bae, Y.M.; Choi, N.Y.; Kang, D.H.; Heu, S.; Le, S.Y. Survival and growth of foodborne pathogens in minimally processed vegetables at 4 and 15 °C. *J. Food Sci.* **2012**, *71*, M48-M50.
64. Tokaloğlu, S. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chem.* **2012**, *134*, 2504-2508.
65. Tomás-Callejas, A.; Boluda, M.; Robles, P.A.; Artés, F.; Artés-Hernández, F. Innovative active modified atmosphere packaging improves overall quality of fresh-cut red chard baby leaves. *Lebensm. Wiss. Technol.* **2011**, *44*, 1422-1428.
66. Tournas, V.H. Spoilage of vegetables crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Crit. Rev. Microbiol.* **2005**, *31*, 33-44.
67. Tunctürk, M.; Eryigit, T.; Kaya, A.R. Nutritional properties, minerals, and selected heavy metal contents in herby cheese plants of Lamiaceae. *Appl. Biol. Chem.* **2017**, *60*, 41-47.

68. Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J.A. Spices as Functional Foods. *Food Sci. Nutr.* **2010**, *51*, 13-28.
69. Watada, A.E.; Qui, L. Quality of fresh-cut produce. *Postharvest Biol. Technol.* **1999**, *15*, 201-205.
70. White, P.J.; Broadley, M.R. Calcium in plants. *Ann. Bot.* **2003**, *92*, 487-511.