

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 682**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3472 (2006.01)
A23L 3/349 (2006.01)
A23L 3/3508 (2006.01)
A23B 4/18 (2006.01)
A23B 4/20 (2006.01)
A23L 3/3562 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2016 PCT/IB2016/000178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016 WO16125015**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2016 E 16714519 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3253231**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas que comprenden extractos de Lamiaceae y de Punica**

30 Prioridad:

06.02.2015 US 201514615968

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.03.2021

73 Titular/es:

**NATUREX S.A. (100.0%)
250 rue Pierre Bayle, B.P. 81218
84911 Avignon Cedex 09, FR**

72 Inventor/es:

**HEUDRE, MELANIE, MARIE-PAULE, PATRICIA;
BIRTIC, SIMONA;
PIERRE, FRANCOIS-XAVIER, HENRI;
MESNIER, XAVIER, PIERRE, FRANÇOIS;
PASSEMARD, ANNE;
BILY, ANTOINE, CHARLES y
ROLLER, MARC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 815 682 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones antimicrobianas que comprenden extractos de Lamiaceae y de Punica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones para aumentar el color y/o la estabilidad microbiana a los alimentos y, en particular, a composiciones que aumentan el color y/o la estabilidad microbiana a los alimentos, incluidos, entre otros a, la carne, el pescado o las aves de corral (frescos/sin procesar y procesados). Estas composiciones son eficaces para aumentar el color y la estabilidad microbiológica de los alimentos.

Antecedentes de la invención

10 La seguridad alimentaria y la prevención del deterioro de los alimentos es una preocupación siempre presente en todo el mundo, particularmente dentro de la industria cárnica. El deterioro de los alimentos es un problema económico importante para un productor de alimentos. Los productores de alimentos deben proteger la salud y la seguridad del público suministrando productos que sean seguros para comer. Dichos alimentos deben tener una vida útil garantizada, ya sea en almacenamiento refrigerado o a temperatura ambiente.

15 Los consumidores prefieren alimentos de buen sabor y gran calidad. Esto es difícil de lograr con conservantes químicos, regímenes de calentamiento severos y otras medidas de elaboración. La seguridad y la protección de los alimentos se logran mejor con un sistema de conservación múltiple que utiliza un método combinado de elaboración más suave y conservantes naturales. Los microorganismos transmitidos por los alimentos también son menos capaces de adaptarse y crecer en alimentos conservados con diferentes medidas de conservación.

20 Existe una gran preocupación por la protección de los alimentos y el crecimiento de organismos que estropean los alimentos, como *Listeria monocytogenes*. Esta especie en particular es uno de los microorganismos de descomposición más problemáticos en la carne. Las características fisiológicas atípicas, como la resistencia excepcional a los antimicrobianos, son en gran parte responsables de su capacidad de causar deterioro. Además, los organismos de descomposición a veces pueden adaptarse a diferentes conservantes y condiciones de almacenamiento, por lo tanto, una combinación de medidas de conservación puede tener más éxito que las medidas individuales.

30 Hay una creciente necesidad de desarrollar sistemas conservantes económicos, naturales y eficaces de satisfacer la demanda pública de productos convenientes, naturales, seguros, saludables y de buena calidad con una vida útil garantizada. Los materiales antimicrobianos como los derivados de las plantas se pueden usar como conservantes en los alimentos para ayudar a satisfacer esta necesidad. Dichos extractos vegetales se consideran deseables porque se consideran naturales. Además, desde un punto de vista normativo, debido al empleo a largo plazo, los extractos vegetales suelen tener el estado GRAS (generalmente considerado como seguro). También existe un deseo continuo de proporcionar protección microbiana utilizando cantidades más bajas de materiales antimicrobianos. Por lo tanto, hay necesidad de proporcionar nuevos materiales antimicrobianos o nuevas combinaciones más eficaces de materiales antimicrobianos.

35 A pesar de sus orígenes naturales, es deseable que los productos antimicrobianos de las plantas se usen en las cantidades más bajas posibles. Esto es deseable no solo por razones de costo sino también para satisfacer el deseo del consumidor de minimizar la cantidad de 'aditivos' en los alimentos. Además, muchos materiales vegetales tienen un sabor asociado. Por lo tanto, en muchas aplicaciones alimentarias exigentes, es conveniente la reducción de la cantidad de protector de origen vegetal.

40 Los productores de carne están buscando maneras para que se les permita suministrar puntos de venta minorista desde centros de elaboración central, eficientes y rentables. Se requiere una mayor vida útil con respecto al deterioro (seguridad del consumidor) para que esto sea posible a medida que la carne se abre paso a través de canales de distribución más largos desde el productor al minorista hasta el consumidor.

45 La vida útil del color es importante para la aceptación del consumidor. Los consumidores juzgan la frescura de la carne por la presencia de pigmento rojo brillante de oximioglobina. La oximioglobina en la carne fresca disminuye con el tiempo durante el almacenamiento a medida que cambia al pigmento marrón estable, la metmioglobina. Aunque el pigmento de oximioglobina se desvanece durante el almacenamiento en la oscuridad, por ejemplo, en un armario de carne, la pérdida de pigmento es más pronunciada en vitrinas refrigeradas e iluminadas en establecimientos minoristas. Además, la pérdida de pigmento es principalmente de naturaleza cosmética, tiene graves consecuencias económicas. Los consumidores que buscan los cortes más frescos evitan comprar carne que contenga incluso pequeñas cantidades de metmioglobina marrón.

55 La vida útil asociada al deterioro microbiano es un problema grave. La posible responsabilidad asociada a los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos por la venta de carne contaminada con microbios es enorme. La industria de la carne y los puntos de venta asociados están buscando formas de garantizar la seguridad de los consumidores al evitar la contaminación microbiana durante todo el proceso de elaboración. Las mejoras del proceso, como el lavado de la carcasa y la elaboración cuidadosamente controlada a baja temperatura, ahora son rutinarias en la industria. Un

método para aumentar la vida útil asociada a l deterioro microbiano es envasar los alimentos, p. ej. carne, utilizando envases con atmósfera modificada (MAP).

Hay necesidad en la industria de métodos y procesos antimicrobianos que los consumidores perciban como más naturales. La actividad antimicrobiana de la composición que comprende extracto de Lamiaceae y extracto de Punica ha sido el principal tema de estudio. La mayoría de las técnicas anteriores indican que la actividad antimicrobiana de las hierbas se centra en los componentes volátiles de aceites esenciales.

P. M. Davidson y A. S. Naidu (en *Natural Food Antimicrobial Systems*, A. S. Naidu, ed., 2000, CRC Press, Boca Raton, páginas 265-294) estudian las propiedades antimicrobianas de los compuestos fito-fenólicos de los aceites esenciales de especias, hierbas, granos y semillas comestibles. Los autores dan a conocer que los efectos antimicrobianos de las especias y hierbas se deben principalmente a la presencia de compuestos fenólicos en las fracciones de aceites esenciales y que algunos monoterpenos también parecen mostrar alguna actividad. El carvacrol, el p-cimeno y el timol se identifican como los principales componentes volátiles del orégano, el tomillo y la ajedrea que probablemente explican la actividad observada. Se ha sugerido que los agentes antimicrobianos activos del romero son borneol, alcanfor, 1,8-cineol, alfa pineno, canfeno, verbenona y acetato de bornilo. Se ha sugerido que el principio activo de la salvia es la tujona. Se ha demostrado que las concentraciones letales mínimas de aceites esenciales de aceite de tomillo oscilan entre 225 y 900 ppm en cultivos. Estas concentraciones de aceites esenciales en los alimentos causarían serios problemas de sabor. Dado que los experimentos de cultivos subestiman la concentración necesaria para la eficacia en los alimentos, es probable que los problemas de sabor en los alimentos sean más graves de lo que sugieren incluso una serie de cultivos. En otra parte de esta referencia, las concentraciones inhibitorias mínimas de aceites esenciales se establecieron como 1-2% para romero, 0,12-2% para tomillo, 0,12-2% para menta verde, 0,5-2% para salvia, 0,5-2% para menta y 0,12-2% para orégano. En el compendio, los autores afirman que las concentraciones de compuestos antimicrobianos en hierbas y especias son demasiado bajas para ser utilizadas eficazmente sin efectos adversos sobre las características organolépticas de un alimento.

Y. Kimura *et al.* en la patente de EE.UU. nº 4,380,506, da a conocer un procedimiento para producir un conservante que tenga actividad antioxidante y antimicrobiana. El procedimiento consiste en dividir un extracto de especias de hierbas entre solventes polares y apolares. Algunos de los extractos divididos presentaron actividad antimicrobiana contra microorganismos *Bacillus subtilis* Gram positivos. en medios de cultivo. El único criterio de sabor probado por Kimura *et al.* fue el amargor. Kimura *et al.* permanecieron en silencio en cuanto a la percepción del sabor del aceite esencial. Kimura *et al.* no desodorizaron el extracto, lo que significa que el extracto contenía aceites esenciales y afectaron al sabor de la carne. Este impacto en el sabor enseña a usar extractos de romero obtenidos por el procedimiento dado a conocer por Kimura *et al.*

D. Ninkov (documento WO 01/15680) da a conocer que las composiciones farmacéuticas pueden prepararse combinando extractos de aceites esenciales de plantas de la familia Lamiaceae con un ácido orgánico. Ninkov da a conocer que la actividad antimicrobiana de la composición farmacéutica se debe a la presencia de fenoles orgánicos como el isopropil o-cresol en el extracto de aceite vegetal.

K. Shetty y R. G. Labbe, (*Asia Pacific J. Clin. Nutr.* (1998), 7 (3/4), páginas 270-276., describen el trabajo para clonar plantas Lamiaceae para producir aumento de cantidades de componentes de aceites esenciales como carvacrol y timol. Estos componentes de aceites esenciales tienen algunas propiedades antimicrobianas, pero su uso comercial se ve impedido por los fuertes sabores que estos compuestos volátiles transmiten a los alimentos.

J. Campo, M. Amiot y C. Nguyen-the (2000, *Journal of Food Protection* 63, páginas 1359-1368) dan a conocer que el extracto de romero tiene propiedades antimicrobianas en estudios de cultivos. Las concentraciones inhibitorias mínimas variaron con las especies de bacterias que se estaban probando, pero oscilaron entre 0,06 y 1%. Estos investigadores sugieren que el extracto de romero puede ser prometedor en alimentos con bajo contenido de grasas y proteínas, contra organismos Gram positivos. No se estudiaron realmente sistemas alimentarios en esta referencia. Esta referencia no estudió específicamente *Listeria*.

E. Down, *et al.*, "Comparison of Vitamin E, Natural Antioxidants and Antioxidants on the Lean Color and Retail Case-Life of Ground Beef Patties" publicado en octubre de 1999, describe el efecto del extracto de romero en combinación con otros antioxidantes naturales y complementos dietéticos de vitamina E sobre la vida del color de la carne picada sin MAP. Esta referencia no enseña cómo alargar la vida útil microbiana de la carne. Los autores no pudieron demostrar una mejora del color rojo de la carne al usar romero ya que la conservación del color rojo en la carne con romero que contiene un antioxidante natural no podía diferir estadísticamente de la referencia. El color rojo de la referencia se altera dentro del período comercialmente deseable. La pérdida de la mayor parte del color rojo en la referencia como en la carne con el romero de esta referencia no permite utilizar el extracto de romero como agente de estabilidad capaz de conservar el color rojo de la carne.

Ahn *et al.* "Effects of plants extracts on microbial growth, color chngge, and lipid oxidation in cooked beef", *Food Microbiol.*, Vol. 24, número 1, (2007): 7-14 demuestra que el extracto de romero, u la oleoresina de romero, para los que no se conocen los contenidos en diterpenos fenólicos, tiene un efecto antilistérico. En esta referencia, el extracto de semilla de uva y el extracto de corteza de pino tuvieron un mayor efecto antilistérico que el romero, que enseña a utilizar el extracto de romero como el principal producto natural antilistérico en la carne. Además, Ahn *et al.* 2007 ha

demostrado que la adición de extracto de romero a la carne deterioró significativamente el color rojo de la carne, en comparación con la referencia que perdió menos color rojo o en comparación con el extracto de uva que mejoró significativamente la conservación del color rojo de la carne. . Por lo tanto, Ahn *et al.* 2007 enseña a uno a no usar extracto de romero como agente de estabilidad capaz de preservar el color rojo de la carne.

- 5 Los estudios de la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos nº 2004/131709 demuestran que el extracto de romero solo, Herbalox® Seasoning, en donde se ha eliminado la mayoría de los componentes volátiles del aceite, muestra muy poco, si es que tiene alguno, efecto antimicrobiano. Esta referencia no enseña cómo alargar la vida útil de la carne Gram positiva, más exactamente antilistérica.

- 10 Además, los antimicrobianos derivados de plantas de cítricos descritos en la técnica anterior son ácidos, no flavonoides. Por ejemplo, las patentes anteriores dirigidas a compuestos de cítricos se refieren esencialmente a ácidos. El documento KR20040001441 describe el zumo de naranja como un supresor del crecimiento de gérmenes. Sin embargo, solo menos de aproximadamente 1/50 parte del zumo descrito en el documento KR20040001441 podría usarse en la carne sin percibir la carne como agria. Como la carne solo consume hasta el 7,2% de la solución rica en ácido cítrico, los contenidos finales de hesperidina en la carne corresponderían a menos del $0,48\% \cdot 1/50 \cdot 7,2\% = \sim 0,0007\%$. Esta referencia no enseña si la hesperidina podría tener un efecto antilistérico en la carne.

- 15 Lorente, José *et al.* "Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices". *Food chemistry* 162 (2014): 186-191 describe que el zumo de cítricos tiene una acidez valorable de 52,4 g/l, siendo el ácido cítrico el componente principal. Según Lorente *et al.* (2014) en dicho zumo, los contenidos de hesperidina en comparación con la acidez valorable son más bajos en más de dos órdenes de magnitud (257 a 484,8 mg/l), lo que corresponde a 0,26 a 0,48% de hesperidina p/v. Agregando dicha composición ácida a la carne afectaría el sabor de la carne ya en pequeñas cantidades.

- 20 Akta, Nesimi y Mükerrerem Kaya. "The influence of marinating with weak organic acids and salts on the intramuscular connective tissue and sensory properties of beef". *European Food Research and Technology* 213.2 (2001): 88-94 demuestra que agregar una solución de ácido débil al 1% (incluido el ácido cítrico) a la carne confiere a la carne sabor agrio. Además, demuestran que cuando se adoba en proporciones 1:1 p/v (carne/adobo), la carne gana en peso como máximo un 7,2% después de adobar en adobos que contienen ácido cítrico.

- 25 En el documento WO 2012/112337, se señala que los flavonoides, incluida la hesperidina, pueden proporcionar alguna actividad antimicrobiana activa sin informar sobre la naturaleza de los microbios, si son bacterias, si son bacterias Gram positivas ni si son *Listeria*. El documento WO 2012/112337 enseña que los compuestos antimicrobianos activos son ácidos.

- 30 Moulehi, Ikram, *et al.* "Variety and ripening impact on phenolic composition antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts". *Industrial Crops and Products* 39 (2012): 74-80 informan que los extractos de semillas de cítricos contienen un total de flavonoides 1,31 a 2,52 mg de catequinas equivalentes/g DW. Como la hesperidina representa <16% del total de flavonoides del extracto de semillas de cítricos, esto significa que la hesperidina está presente en $\sim 0,032\%$ en el extracto de semillas de cítricos DW.

- 35 Mandalari, G. *et al.* "Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot rind (*Citris bergamia* Risso), a byproduct of the essential oil industry.". *Journal of Applied Microbiology* 103.6 (2007): 2056-2064 señala que los extractos cítricos ricos en flavonoides *in vitro* inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas solamente y no tienen efecto sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas, ni tienen efecto sobre el crecimiento de *Listeria*. Mandalari *et al.* (2007) demuestran que la neohesperidina en forma pura no tiene efecto sobre crecimiento de *Listeria in vitro*

- 40 Fernández-López, J., *et al.* " Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs." *Meat Science* 69.3 (2005): 371-380 demuestran que la carne a la que se añaden extractos cítricos que contienen flavonoides, el principal de los cuales es la hesperidina, no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Por ejemplo, Fernández-López *et al.* (2005) demuestran que dichos extractos ejercen efectos antimicrobianos sobre otras cepas bacterianas, incluida *Listeria innocua*, pero no sobre *Listeria monocytogenes*.

Las enseñanzas de Mandalari *et al.* y Fernández-López *et al.* dan a conocer el empleo de hesperidina como compuesto antilistérico y no dan por hecho el uso de ninguno o una combinación de flavonoides de un extracto de cítricos contra *Listeria monocytogenes* en la carne. Por ejemplo, Mandalari *et al.* (2007) enseñan a usar la hesperidina como compuesto antilistérico y no dan por hecho que un flavonoide purificado podría tener un efecto antilistérico.

- 50 Los extractos de *Punica* ricos en ácido elágico no tienen efectos antimicrobianos en la carne cruda MAP. Por ejemplo, Hayes *et al.* (Hayes, J. E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M. N. y Kerry, J. pág. 2010). " Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and stability of raw minced beef patties", *Meat Science*, 84(4), 613-620.) (en adelante "Hayes *et al.*") enseñan que el ácido elágico (uno de los compuestos activos del extracto de *Punica*) no tiene efecto antimicrobiano sobre la carne cruda MAP de vacuno almacenada en frío y cuando se aplica a 300 ppm.
- 55 Hayes *et al.* enseñan que el ácido elágico no mejoró la conservación del color rojo de la carne cruda MAP de vacuno almacenada en frío y cuando se aplica a 300 ppm o 600 ppm. Hayes *et al.* enseñan a usar concentraciones inferiores a 300 ppm en ácido elágico para obtener un efecto antimicrobiano. Hayes *et al.* enseñan a usar ácido elágico para mejorar el color rojo de la carne.

El problema general de mejorar la vida útil de la carne fresca sin afectar el sabor sigue siendo evitar el crecimiento de organismos de descomposición y patógenos y conservar el color rojo de la carne durante todo el período de almacenamiento comercialmente deseable.

5 El documento US2010/159085 describe un método para alargar la vida del color de la carne roja fresca envasada en atmósfera modificada al poner en contacto la carne roja fresca con un extracto de una hierba Labiatae antes de envasar la carne.

Negi *et al.*, *Journal of Food Science*, vol. 68, n° 4, págs. 1473-1477 describen las actividades antioxidantes y antibacterianas de los extractos de cáscara de *Punica granatum*.

Compendio de la invención

10 La invención está definida por las reivindicaciones. Según un aspecto de acuerdo con la presente invención, las composiciones incluyen un extracto de Lamiaceae (romero) que contiene los diterpenos fenólicos, ácido carnósico y carnosol, en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae; y el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico. En una composición beneficiosa, el el extracto de *Punica* se selecciona del grupo que consiste en punicalaginas y ácido elágico.

15 Otros aspectos del presente método y composición son para uso con un alimento, que incluye, pero no se limita a la carne, aves de corral y pescado (fresco/sin procesar y procesado), y que comprende los componentes de una composición de esta descripción, un producto alimenticio envasado y un método de envasado de alimentos.

20 La presente invención, en otra forma de la misma, se refiere a un alimento que incluye, entre otros, carne, aves de corral y pescado sin procesar/frescos, así como carne, aves de corral y pescado procesados, que contiene una composición definida anteriormente que comprende extracto de *Punica* y un extracto de Lamiaceae en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae.

25 La presente invención en otra forma de la misma se refiere a un método para procesar, incluido el envasar, un alimento. El método incluye aplicar o incorporar a un alimento que incluye, entre otros carne, aves de corral y pescado fresco/sin procesar, así como carne, aves de corral y pescado procesados, una composición como se definió anteriormente que comprende extracto de *Punica* y un extracto de Lamiaceae en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae. Opcionalmente, el método puede incluir además envasar los alimentos en una atmósfera que contenga 20% o más de oxígeno. En otras realizaciones alternativas, la cantidad de oxígeno puede ser 70% de oxígeno como máximo. En otra realización alternativa, un producto alimenticio envasado comprende un alimento que incluye, entre otros, carne, aves de corral y pescado sin procesar/frescos, así como carne,
30 aves de corral y pescado procesados, envasados en un medio atmosférico habitual.

35 La presente invención en otra forma de la misma se refiere a un método para envasar alimentos. El método incluye la aplicación o incorporación a un alimento, que incluye entre otros, carne, pescado o aves de corral (frescas/sin procesar y procesadas), una composición que comprende extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y un extracto de Lamiaceae que contiene los diterpenos fenólicos ácido carnósico y carnosol, en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae y el alimento se envasa en un ambiente que incluye 20% o más de oxígeno.

También se describe en la presente memoria, aunque no forma parte de la presente invención, una composición antimicrobiana que comprende una cantidad eficaz de un diterpeno fenólico y/o de hesperidina.

40 La presente invención en otra forma más de la misma se refiere a una composición antibacteriana definida anteriormente que comprende extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y un extracto de Lamiaceae que contiene los diterpenos fenólicos, ácido carnósico y carnosol, en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae. En otra forma beneficiosa, la composición antimicrobiana es eficaz contra bacterias Gram positivas incluidas *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus hirae* o *Mycobacterium bovis*.
45 En otra forma alternativa, la composición es eficaz contra bacterias Gram negativas incluidas *Pseudomonas aeruginosa* o *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* o *Enterobacter cloacae*.

50 La presente invención en otra forma de la misma se refiere a una composición antifúngica/anti-levadura que comprende extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y un extracto de Lamiaceae que contiene los diterpenos fenólicos, ácido carnósico y carnosol, en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae. En otra forma, la composición es eficaz contra levaduras incluidas *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

55 En una forma, la presente invención se refiere a una composición que comprende extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y un extracto de Lamiaceae que contiene los diterpenos fenólicos ácido carnósico y carnosol, en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

- 5 El extracto de romero según la presente invención mejora la conservación del color rojo de la carne y alarga la vida útil microbiana sin afectar el sabor de la carne. Los estudios de los presentes inventores en sistemas de carne reales utilizan un extracto de romero desodorizado: un extracto del que se ha eliminado la mayoría de los componentes volátiles del aceite esencial y que no afecta el sabor de la carne. Cuando se combina con extracto de *Punica*, inesperadamente, se observan efectos sinérgico antilistérico y sinérgico de conservación del color, sin ningún impacto en el sabor de los alimentos.
- 10 El presente método y composición pueden proporcionar formas para que los productores de alimentos de cualquier producto alimenticio o bebida proporcionen a los minoristas productos de centros de elaboración central rentables y económicos. El presente método y composición pueden alargar la vida útil de la carne fresca, pescado y aves de corral, y proporcionar carne fresca, pescado y aves de corral que ha alargado la vida útil microbiana y del color en una atmósfera que contiene 70% o más de oxígeno y 30% o más de CO₂. El método, según esta descripción, que emplea combinaciones de extractos, puede usarse para mejorar la conservación del color de la carne, bloquear el crecimiento de *Listeria* en carnes frescas, pescado y aves de corral, y permitir el uso de concentraciones inhibitorias menores, pero más eficaces, de extractos vegetales, sin impactos negativos de sabor.
- 15 El presente método es particularmente adecuado para su uso con carnes envasadas en atmósfera modificada (MAP). Las carnes MAP se envasan en materiales impermeables a los gases que mantienen una atmósfera por encima del producto. A menudo se usan mezclas de oxígeno y dióxido de carbono en las carnes MAP. Las mezclas de estos gases funcionan muy bien con el presente método.
- 20 Los inventores encontraron, sorprendentemente, que el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico puede usarse en carne picada para alargar su vida útil microbiana, de color y de sabor. Cuando el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico se usa solo (es decir, sin extracto de romero), se requieren concentraciones más altas de extracto de *Punica* para garantizar efectos antilistéricos adecuados. Sorprendentemente, la adición de extractos de romero o extractos de otras Lamiaceae mejora sinérgicamente los efectos antilistéricos y permite el uso de menores cantidades de extracto de *Punica* (p. ej., punicalaginas y extractos de ácido elágico).
- 25 Además, sorprendentemente, se ha descubierto que el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y extractos de Lamiaceae conservan el color en la carne de vacuno picada MAP de manera sinérgica. En muestras de carne de vacuno picada almacenada cinco (5) días en condiciones frías, el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico más extracto de romero excede el efecto aditivo conservante del color de *Punica* o romero solo. Este efecto sinérgico se observó a diferentes concentraciones de cada extracto.
- 30 Sorprendentemente, los inventores encontraron pruebas de que el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico en presencia de altas concentraciones de oxígeno inhibe a *Listeria monocytogenes*, organismo Gram positivo. La combinación de extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y la atmósfera con alto contenido de oxígeno inhibe *Listeria monocytogenes*, organismo Gram positivo aislado como uno de los principales organismos de descomposición en la carne de vacuno picada. Aún más sorprendentemente, la combinación de romero y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico muestra inhibición sinérgica de estos organismos Gram positivos, *Listeria monocytogenes*, en atmósferas con alto contenido en oxígeno.
- 35 Las combinaciones de extracto de Lamiaceae que contienen diterpenos fenólicos y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico, alagan la vida útil del color de la carne, pescado y aves de corral frescos en presencia de oxígeno de una manera sinérgica. Crítica para esta invención es la combinación de extracto de romero u otro extracto eficaz de Lamiaceae y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico, y la presencia de oxígeno.
- 40 El extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico solo a determinadas concentraciones disminuye la vida del color de la carne roja fresca y da como resultado una característica organoléptica inaceptable. La combinación de extracto de romero y del extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico actúa sinérgicamente para alargar la vida del color de la carne picada en condiciones de almacenamiento en frío. La combinación no es solo aditiva, sino que es sinérgica, porque excede el efecto aditivo del extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico solo y romero solo.
- 45 La adición de extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos fenólicos al extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico, produce una composición de sabor aceptable que es eficaz para conservar el color e inhibir el crecimiento de microorganismos en la carne, pescado y aves de corral frescos.
- 50 Las combinaciones de extracto de Lamiaceae, preferiblemente extracto de romero y extracto *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico, son más eficaces en la supresión del crecimiento de bacterias, Gram positivas, preferiblemente *Listeria monocytogenes*, que el extracto de Lamiaceae o el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico, solo.
- 55 La combinación de extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos fenólicos y del extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico en presencia de oxígeno, no afecta al sabor de la carne picada en un envase después de un período de almacenamiento comercialmente deseable. Ni el extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos fenólicos ni el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico solo, u oxígeno solo, o una combinación

de dos de estos factores solos conserva el color y de manera sinérgica como la combinación, al menos hasta el 6° día de almacenamiento, sin afectar al sabor.

Sorprendentemente, la adición de extractos de romero, o extractos de otras Lamiaceae mejora sinérgicamente los efectos antilistéricos y permite el uso de dosis más bajas de cada extracto.

5 Además, sorprendentemente, se ha encontrado que el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico y extractos de Lamiaceae conservan el color en la carne picada de MAP de manera sinérgica. En muestras de carne de vacuno picada almacenada cinco (5) días en condiciones frías, el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico más extracto de romero excede el efecto aditivo que conserva el color de la hesperidina o el romero solo.

10 Sorprendentemente, los inventores encontraron pruebas de que el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico en presencia de altas concentraciones de oxígeno inhibe el organismo Gram positivo *Listeria monocytogenes*. La combinación del extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico y la atmósfera con alto contenido de oxígeno inhibe a *Listeria monocytogenes*, organismo Gram positivo aislado como uno de los principales organismos de descomposición en la carne picada. Aún más sorprendente, la combinación de romero y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico muestra inhibición sinérgica de estos organismos Gram
15 positivos, *Listeria monocytogenes*, bajo atmósferas ricas en oxígeno.

Las combinaciones de extracto de Lamiaceae que contienen diterpenos fenólicos y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico, conserva el color de la carne, pescado y aves de corral frescos en presencia de oxígeno de manera sinérgica. Por consiguiente, es beneficiosa para algunos de los presentes métodos y composiciones de esta descripción una combinación de extracto de romero u otro extracto eficaz de Lamiaceae y extracto de *Punica* que
20 contiene punicalaginas y ácido elálgico, y la presencia de oxígeno.

El extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico solo en determinadas concentraciones disminuye la vida del color de la carne roja fresca y da como resultado una característica organoléptica inaceptable. La combinación de extracto de romero y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico actúa sinérgicamente para alargar la vida del color de la carne de vacuno picada en condiciones de almacenamiento en frío. La combinación no
25 es solo aditiva, sino que es sinérgica, porque excede el efecto aditivo del extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico solo y romero solo.

La adición de extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos fenólicos al extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico, produce una composición de sabor aceptable que es eficaz para conservar el color e inhibir el crecimiento de microorganismos en la carne, pescado y aves de corral frescos.

30 Las combinaciones de extracto de Lamiaceae, preferiblemente extracto de romero, y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico, son más eficaces de manera sinérgica en la supresión de crecimiento de bacterias Gram positivas, preferiblemente *Listeria monocytogenes*, que el extracto de Lamiaceae o el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico, solo. Ni el extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos fenólicos ni el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico solo, u oxígeno solo, o una combinación de dos de
35 estos factores solos conserva la carne contra *Listeria monocytogenes* así como la combinación de los tres, dentro del período de almacenamiento comercialmente deseable, sin afectar al sabor.

La combinación de extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos fenólicos y extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico en presencia de oxígeno, no afecta el sabor de la carne picada en un envase después de un período de almacenamiento comercialmente deseable. Ni el extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos
40 fenólicos ni el extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elálgico solo, u oxígeno solo, o una combinación de dos de estos factores por sí solos conserva el color, así como la combinación de los tres después de cinco (5) días de período de almacenamiento en frío, sin afectar el sabor.

Para mantener el número de aditivos dentro de límites razonables con respecto a la carne, el pescado o las aves de corral, es beneficioso usar extractos botánicos que proporcionen la propiedad de inhibir el crecimiento de *Listeria
45 monocytogenes*, y, más particularmente, es beneficioso combinar extractos botánicos que proporcionan efectos antilistéricos sinérgicos y que conservan el color rojo de la carne sin afectar al sabor de la carne. De manera ventajosa, las formulaciones de diferentes extractos botánicos, según esta descripción, funcionan sinérgicamente para aumentar la actividad antilistérica total y conservar el color rojo de la carne sin afectar al sabor de la carne, de los extractos combinados, que son superiores a la suma de sus contribuciones individuales.

50 Los métodos y composiciones según la presente descripción presentan un efecto sinérgico, como se introdujo anteriormente y se expondrán con más detalle a continuación. Se observa que, en contraste con el efecto sinérgico de los métodos y composiciones según la presente descripción, cuando dos compuestos provocan la misma respuesta abierta, independientemente del mecanismo de acción y el efecto combinado es la suma algebraica de sus efectos individuales, se dice que los compuestos presentan la adición (Levine *et al.*, 1996). Sin embargo, en sinergia, el efecto
55 conjunto de dos compuestos es mayor que la suma algebraica de sus efectos individuales.

La técnica en Levine *et al.* (1996) se ha utilizado para evaluar los efectos biológicos de las combinaciones de compuestos. En la figura 1 (identificada como "Técnica anterior" y tomada de los Basic Principles of Pharmacology,

Universidad de Tulane), gráfico superior, los efectos de la combinación de los compuestos ilustran que cuando dos compuestos con mecanismos similares se administran juntos, suelen producir efectos aditivos. Esto también se conoce como adición. Sin embargo, si el efecto de dos compuestos excede la suma de sus efectos individuales, este es un efecto inesperado referido a la sinergia.

5 Por analogía, una respuesta sinérgica con respecto a las medias dosis, como se ilustra en el gráfico inferior de la figura 1, ocurre si la combinación de la mitad de la dosis de los compuestos A y B produce una respuesta mayor que A o B solo.

Los expertos en la técnica de las formulaciones antimicrobianas para matrices alimentarias como la carne, son conscientes de que la sinergia antimicrobiana en la carne no es predecible. No se pudo describir una sola sinergia para diferentes combinaciones entre tres extractos botánicos naturales. Gutiérrez, J., Barry-Ryan, C. y Bourke, P. (2008). " The antimicrobial efficacy of plant essential oils combinations and interactions with food ingredients". *Internacional journal of food microbiology*, 124 (1), 91-97) Rara vez se han descrito efectos sinérgicos de las combinaciones para combinaciones entre extractos sintéticos y naturales (véase p. ej. el documento WO 2013/169231).

15 Una ventaja de algunas composiciones y métodos, según esta descripción, se consigue mediante un proceso que elimina los compuestos volátiles por desodorización. El proceso de desodorización elimina compuestos volátiles incluidos borneol, alcanfor, 1,8-cineol, alfa pineno, canfeno, verbenona y acetato de bornilo.

Otra ventaja, según algunos aspectos de los presentes métodos, sistemas y composiciones de esta descripción, se consigue mediante una combinación de extracto de *Punica* con extracto de Lamiaceae. Además, a diferencia del proceso descrito en la Patente de EE.UU. nº 4,380,506, los métodos, según esta descripción, no requieren el proceso de reparto y los métodos evitan el empleo de gastos de elaboración adicionales.

20 Otra ventaja según un aspecto del presente método y sistema es una composición que reduce la concentración de compuestos volátiles a un nivel bajo para no afectar al sabor de un producto alimenticio al que se aplica una composición tal como carne, no afecta por lo tanto al sabor de la carne.

Otra ventaja de algunos aspectos de la presente invención es la presencia del extracto de *Punica* con más de 60 concentraciones más bajas en ácido elálgico (que lo publicado previamente por Hayes *et al.*) lo que produce efectos anti-listéricos cuando se combina con extracto de romero.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 está adaptada de "Bacic Principles of Pharmacology" (Universidad de Tulane), en donde la parte superior es "Summation: Compounds A and B Produce Equal effects, And Their Affects Are Additive When Combined " y la parte inferior es " Synergism: The Combination of Half the Dose of Compound A and Compound B Produces a Response Greater Than A or B Alone ".

La figura 2 es un gráfico que muestra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en la carne según la presente invención.

La figura 3 de referencia es un gráfico que muestra los efectos antilistéricos de la sinergia de combinaciones de hesperidina y extracto de romero según la presente invención.

La figura 4 de referencia es un gráfico que muestra la respuesta antimicrobiana de la superficie de diferentes combinaciones de extracto de romero y hesperidina que inhibe y disminuye el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, según la presente invención.

La figura 5 de referencia es un gráfico de barras que muestra los valores del color rojo de la carne según la presente invención con respecto a las combinaciones de extracto de romero y hesperidina según la presente invención.

La figura 6 es un gráfico de barras que muestra los valores de color rojo de la carne según la presente invención con respecto a varias combinaciones de romero y extracto de *Punica* según la presente invención.

La figura 7 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* por extractos vegetales en la carne picada.

La figura 8 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* por extractos vegetales en la carne picada a 8°C el 9º día.

La figura 9 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* por extractos vegetales en carne picada a 8°C el 6º día.

La figura 10 es un gráfico que muestra la inhibición de *Listeria monocytogenes* por extractos vegetales en carne picada a 8°C el 9º día según la presente invención.

La figura 11 es un gráfico que muestra según la presente invención, la respuesta antimicrobiana de la superficie de

diferentes combinaciones de romero y extracto de *Punica* que inhiben y disminuyen el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

La figura 12 es un gráfico que muestra *Listeria monocytogenes* en salchichas de pollo.

5 La figura 13 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de *Listeria* en salchichas de pollo mediante una combinación de extracto de R/P según la presente invención.

La figura 14 de referencia es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de *Listeria* en salchichas de pollo por combinación del extracto de R/H.

La figura 15 es un gráfico que muestra *Listeria monocytogenes* en salchichas de cerdo (referencia).

10 La figura 16 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de *Listeria* en salchichas de cerdo por una combinación de extractos de R/P.

La figura 17 de referencia es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de *Listeria* en salchichas de cerdo por una combinación de extractos de R/H.

La figura 18 es un gráfico que muestra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado (referencia).

15 La figura 19 es un gráfico que muestra la inhibición de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado el día 30^º de crecimiento

La figura 20 es un gráfico que muestra la inhibición de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado el día 30^º de crecimiento.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención, que se define por las reivindicaciones, proporciona composiciones que comprenden extracto de Lamiaceae y extracto de *Punica* y métodos para usar estas composiciones para alargar la vida útil de la carne, pescado y aves de corral frescos sin afectar al sabor.

25 Los presentes métodos y composiciones se basan en el descubrimiento de que los extractos de romero ricos en diterpenos fenólicos, solos o en combinación con hesperidina o con extractos de *Punica* ricos en ácido elágico y en punicalaginas conservan el color rojo de la carne durante un período comercialmente significativo. Extractos de Lamiaceae que comprenden diterpenos fenólicos en combinación con hesperidina o con extracto de *Punica* que comprende ácido elágico y punicalaginas, sinérgicamente proporcionó soluciones novedosas para suprimir el crecimiento de microorganismos durante un período comercialmente deseable y para conservar el color rojo de la carne sin afectar al sabor de la carne. Se ha descubierto que las composiciones de esta invención inhiben el crecimiento de microorganismos Gram positivos. Se ha descubierto que las composiciones de esta invención inhiben el crecimiento de *Listeria*. Se ha descubierto que las composiciones de esta invención inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

30 Combinaciones que comprenden: extractos vegetales homogeneizados en diterpenos fenólicos, ácido carnósico y carnosol, y extractos vegetales homogeneizados en ácido elágico y punicalaginas, que se habrían utilizado para evitar sinérgicamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en la carne sin afectar al sabor de la carne y que mejoran sinérgicamente la conservación del color de la carne, no pudieron recuperarse de la técnica anterior.

35 Ninguna de las técnicas anteriores sobre el uso antimicrobiano de la combinación de romero u otros extractos de Lamiaceae que comprenden diterpenos fenólicos con extractos de *Punica* que comprenden punicalaginas y ácido elágico, prevén o hacen obvios los presentes métodos y composiciones. La técnica anterior se centra en el uso de aceites esenciales de hierbas o en el uso de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico. Los extractos de romero utilizados en la presente descripción se procesan de una manera que los hace esencialmente exentos del aceite esencial natural y ricos en diterpenos fenólicos. La técnica anterior no prevé ni hace evidente la combinación sinérgica de extractos de Lamiaceae ricos en diterpenos fenólicos y extractos de *Punica* ricos en punicalaginas y ácido elágico.

40 La técnica anterior no prevé ni hace evidente el efecto antimicrobiano sorprendentemente beneficioso de la combinación de extractos de Lamiaceae que comprenden diterpenos fenólicos con extractos de *Punica* que comprenden punicalaginas y ácido elágico en organismos Gram positivos: *Listeria monocytogenes*. La técnica anterior no prevé ni hace obvio el efecto de conservación del color sorprendentemente beneficioso de la combinación de extractos de Lamiaceae que comprenden diterpenos fenólicos con extracto de *Punica* que comprende punicalaginas y ácido elágico.

45 La técnica anterior no prevé ni hace evidente la ausencia del impacto en el sabor de los alimentos de la combinación de extractos de Lamiaceae que comprenden diterpenos fenólicos con extracto de *Punica* que comprende punicalaginas y ácido elágico.

50 Otros flavonoides que tienen el mismo efecto, incluidos, entre otros: narigina, isocurametina, neohesperidina,

hesperidina, poncirina, nebiletina y tangeretina.

Definiciones

La siguiente es una lista de definiciones utilizadas a lo largo de esta descripción:

5 "Cantidad eficaz" es la cantidad necesaria para conseguir un efecto específico, según lo que un experto en la técnica podría determinar fácilmente mediante experimentación de rutina. Por ejemplo, con respecto a la presente descripción, una cantidad eficaz de una composición que comprende extracto de *Punica* y un extracto de Lamiaceae para aplicar a la carne, pescado y aves de corral frescos, para alargar la longevidad del color rojo en la carne, pescado y aves de corral frescos, es una cantidad que se determina para proporcionar la longevidad del color rojo en función de parámetros conocidos que incluyen, entre otros la concentración de *Punica* y un extracto de Lamiaceae, el volumen y/o superficie de la carne fresca, pescado y aves de corral, y las condiciones del ambiente atmosférico de la carne, pescado y aves frescos. Asimismo, las cantidades eficaces de romero/*Punica* para alargar la longevidad de otros alimentos se determinan de manera similar.

15 "Alimentos" y "productos alimenticios" se refieren a productos que comen las personas o los animales. Los alimentos o productos alimenticios incluyen, entre otros, carne, pescado y aves de corral frescos y carne, pescado y aves de corral procesados.

20 "Carne, pescado y aves de corral frescos" se refiere a carne, pescado y aves de corral, cuerpos enteros, porciones cortadas y porciones picadas de los mismos. La carne, el pescado y las aves de corral frescos incluyen tanto la carne, el pescado y las aves de corral sin procesar como la carne, el pescado y las aves de corral que incluyen aditivos como polifosfatos, sal, agua, condimentos, caldos, proteínas agregadas, azúcar, almidones y similares que se incorporan en la carne, pescado o aves de corral. Es importante distinguir la carne, el pescado o las aves de corral frescos que pueden contener estos ingredientes, de la carne, el pescado y las aves de corral curados, que pueden contener los mismos ingredientes, pero también contienen uno o más de los siguientes aditivos: eritorbato, ácido eritórbico, ascorbato, ácido ascórbico, nitritos, nitratos o cultivos. La carne, el pescado y las aves de corral frescos se deben distinguir de, y no incluyen, la carne curada, el pescado o las aves de corral, que son lo opuesto de aquellos.

25 "Hesperidina" se refiere a un compuesto extraído de la naturaleza o sintetizado.

"Extracto de Lamiaceae" se refiere al extracto de una planta de la familia Lamiaceae, preferiblemente romero, salvia, orégano, tomillo, mentas y los siguientes géneros: *Salvia*, *Rosmarinus*, *Lepechinia*, *Oreganum*, *Thymus*, *Hyssopus* y sus mezclas. El más preferido es el romero.

30 "Carne, pescado y aves de corral se refiere, tanto a) carne, pescado y aves de corral procesados como a b) carne, pescado y aves de corral sin procesar.

"Diterpenos fenólicos" se refiere a ácido carnósico, carnosol, metilcarnosol y otros derivados fenólicos de diterpeno (rosmanol, isorosmanol, 11,12-di-*O*-metilisorosmanol, ácido 12-*O*-metilcarnósico, éter rosmanol-9-etílico, circimaritina, producto monooxidado metilado del ácido carnósico, genkwanina, epirosmanol, epiisorrosmanol, derivados del ácido carnósico, éter epirosmanol etílico, criptotanshinona) y sus mezclas.

35 "Procesados" tal como "alimentos procesados" y "carne, pescado y aves de corral procesados" son productos resultantes de la elaboración de alimentos, tales como carne, pescado o aves de corral o de la elaboración posterior de dichos productos procesados, de modo que la superficie de corte muestra que el producto ya no tiene las características de la carne, el pescado o las aves de corral frescos. Elaboración se refiere a cualquier acción que altere sustancialmente el producto inicial, incluidos calentamiento, ahumado, curado, maduración, secado, adobado, extracción, extrusión o una combinación de esos procesos. Los procesos incluyen procesos no tratados térmicamente y tratados térmicamente.

"Extracto de *Punica*" se refiere al extracto de una planta del género *Punica*, preferiblemente *Punica granatum* y *Punica protoPunica* y una de sus mezclas. La más preferida es *Punica granatum*.

45 "Sin procesar" (como carne, pescado y aves de corral) significa no haber recibido ningún tratamiento que produzca un cambio sustancial en el estado original de los alimentos (p. ej., carne, pescado y aves de corral). Sin embargo, los alimentos pueden haber sido, por ejemplo, divididos, partidos, separados, deshuesados, picados, desollados, mondados, pelados, molidos, cortados, limpiados, recortados, ultracongelados, congelados, refrigerados, molidos o descascarillados, envasados o sin envasar. Los alimentos no procesados, incluidos la carne, el pescado y las aves de corral comprenden la carne, el pescado y las aves de corral crudos sin tratar, así como la carne, el pescado y las aves de corral frescos que se ha triturado o picado, que ha pasado temporadas con alimentos o aditivos añadidos o que ha sufrido una elaboración insuficiente para modificar la fibra muscular interna de la carne, el pescado o las aves de corral y así eliminar las características de la carne, el pescado o las aves de corral frescos.

55 En el desarrollo del presente método y composición, se descubrió que el extracto de romero que comprende diterpenos fenólicos combinados con hesperidina o con extracto de *Punica* tiene un efecto superior en la supresión del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en la carne que cuando los extractos se aplican solos.

En el desarrollo del presente método y composición, se descubrió que determinadas mezclas de extractos de romero combinados con extracto de *Punica* que comprende punicalaginas y ácido elágico, proporcionan un efecto antilistérico sinérgico cuando se preparan dentro de ciertos intervalos de relaciones de concentración.

5 En el desarrollo del presente método y composición, se descubrió que el extracto de romero que comprende diterpenos fenólicos combinados con extracto de *Punica* tiene un efecto superior en la conservación del color rojo en la carne que cuando los extractos se aplican solos.

10 En el desarrollo del presente método y composición, se descubrió que determinadas mezclas de extractos de romero combinados con extracto de *Punica* que comprende punicalaginas y ácido elágico, proporcionan un efecto sinérgico de conservación del color rojo en la carne cuando se preparan dentro de determinados intervalos de relaciones de concentración.

Mezclas de extractos ricos en diterpenos fenólicos y extractos de *Punica*

15 Los diterpenos fenólicos como el ácido carnósico o el carnosol se producen específicamente en las Lamiaceae. Hasta la fecha, el ácido carnósico se ha identificado en solo unas pocas especies, todas exclusivas de las Lamiaceae. Hasta donde saben los inventores, solo siete de los 70 géneros del grupo de las Mentheae contienen ácido carnósico: Salvia (Brieskorn y Dumling, 1969), Rosmarinus (Luis y Johnson, 2005), Lepechinia (Bruno *et al.*, 1991), Oreganum (Hossain *et al.*, 2010) y Thymus (Achour *et al.*, 2012). Puede estar presente en Hyssopus donde se identificó uno de sus posibles derivados, éter rosmanol-9-etílico (7) (Djarmati *et al.*, 1991). El ácido carnósico también se presenta como un compuesto menor en un género del grupo Ocimeae, Ocimum (Jayasinghe *et al.*, 2003). Brieskorn, C.H., Dumling, H.J., 1969. Carnosolsäure, der wichtige antioxydativ wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin-und Salbeiblattes. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 141, 10-16; Luis, J.C., Johnson, C.B., 2005; Bruno, Maurizio, *et al.* "Abietane diterpenoides from Lepechinia meyeri and Lepechinia hastata". *Phytochemistry* 30.7 (1991): 2339-2343; Hossain, Mohammad B. *et al.* "Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58.19 (2010): 10576-10581; Achour, S., Khelifi, E., Attia, Y., Ferjani, E., Noureddine Hellah A., 2012. Concentration of Antioxidant Polyphenols from Thymus capitatus extracts by Membrane Process Technology. *Journal of Food Science* 77, C703-C709; Djarmati, Z., Jankov, R.M., Schwirtlich, E., Djulinac, B., Djorđejevic, A., 1991. High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68, 731-734; Jayasinghe, C., Gotoh, N., Aoki, T., Wada, S., 2003. Phenolic composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4442-4449. Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of its antiradical *in vitro* activity *Spanish Journal of Agricultural Research* 3, 106-112.

En la presente memoria estos diterpenos fenólicos se extrajeron del romero con el objetivo de extraer y concentrar diterpenos esencialmente fenólicos: 44-85%. El extracto así obtenido se desodorizó para eliminar los aceites esenciales y los compuestos volátiles que afectan el sabor de los alimentos.

Extracto de romero

35 Las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) se pueden extraer con varios disolventes y producir extractos que son ricos en diferentes compuestos. Por ejemplo, los extractos acuosos son bastante abundantes en ácido rosmarínico, mientras que las extracciones con disolventes orgánicos dan lugar a extractos ricos en diterpenos fenólicos como el ácido carnósico y el carnosol. El procedimiento detallado para preparar la composición del extracto de romero se describió en la patente de EE.UU. n° 5,859,293 y el documento WO 96/34534.

40 Las hojas de romero se extrajeron con acetona a temperatura ambiente. Una vez completada la extracción, el extracto de acetona se filtró para separar la solución de las hojas de romero y se concentró a presión reducida para obtener un extracto natural concentrado. En este momento, el extracto concentrado se puede secar directamente en un horno de vacío a calor suave para preparar un extracto en polvo, que es una composición que comprende aproximadamente 15%-30% de ácido carnósico y 1%-3% de carnosol. Alternativamente, al extracto natural concentrado, se añadió bicarbonato de sodio acuoso (NaHCO₃) para disolver el ácido carnósico y otros ácidos orgánicos, mientras que las sustancias insolubles básicas se precipitaron.

45 La solución se filtró para separarla del sólido, y el filtrado se concentró más a presión reducida. Una vez que se consigue la concentración final, se añadió ácido fosfórico (H₃PO₄) y las sustancias insolubles en ácido (incluyendo ácido carnósico, carnosol y derivados carnósicos) se precipitaron de la solución concentrada. Se utiliza carbón activo durante el proceso para decolorar el extracto de romero en solución antes de la filtración. Mediante filtración, el sólido precipitado se separó posteriormente del líquido y se enjuagó con agua para eliminar las impurezas.

50 Por último, el sólido se secó en una estufa de vacío y luego se molió en polvo para obtener una composición que contenía aproximadamente 40-65% de ácido carnósico, 2-10% de carnosol y 2-10% de ácido 12-O-metilcarnosol. En ese momento el extracto utilizado contenía >48% de ácido carnósico + carnosol. Se realizó un último paso para desodorizar el extracto de romero. Correspondía a una extracción posterior del sólido anterior con una mezcla de acetona/hexano. El propósito de este paso fue la eliminación de moléculas grasas y de compuestos volátiles. El filtrado se concentró a presión reducida y se formuló directamente sobre un vehículo líquido.

Dentro de la presente memoria y reivindicaciones, este extracto homogeneizado en diterpenos fenólicos, ácido carnósico y carnosol, se denominará romero, extracto de romero o romero (polvo) o romero (líquido).

Extracción de Punica

5 La piel amarga de la granada (*Punica granatum L.*) se extrajo con etanol/agua. El extracto se filtró, luego se concentró. El extracto se mezcló con un vehículo, en este ejemplo con maltodextrina antes del secado. Se pueden aplicar diferentes tecnologías de secado. Este extracto se homogeneizó en los siguientes polifenoles: punicalaginas (> 7,5% por HPLC) y ácido elágico (1,5-2,5%) según se determinó por HPLC.

En toda esta descripción, este extracto homogeneizado en punicalaginas (> 7,5% por HPLC) y ácido elágico (1,5-2,5%), se denominará *Punica* o extracto de *Punica* o *Punica* (polvo) o *Punica* (líquido).

10 *Preparación de productos y mezclas de extracto de romero/Hesperidina (comparativa) y extracto de romero/extracto de Púnica*

Los extractos vegetales y sus combinaciones se secaron en polvos. Se usó maltodextrina para asegurar el proceso de secado adecuado de combinaciones de extractos. Las maltodextrinas son excipientes o vehículos normalmente utilizados para procesos de secado.

15 Las maltodextrinas se definen como productos de hidrólisis de almidón con un equivalente de dextrosa inferior a 20. El equivalente de dextrosa (valor DE) es una medida del poder reductor de los oligosacáridos procedentes del almidón expresado como porcentaje de D-glucosa en la materia seca del hidrolizado y es un valor inverso de grado medio de polimerización (DP) de unidades de anhidro glucosa. Como productos de la hidrólisis del almidón, las maltodextrinas contienen productos de degradación de amilosa lineal y amilopectina ramificada, por lo tanto, se consideran polímeros de D-glucosa unidos por enlaces α -(1,4) y α -(1,6).

Aunque las maltodextrinas proceden de un compuesto natural (almidón), su estructura es diferente de la estructura inicial de la molécula natural de la que proceden (almidón). Esta diferencia es inducida por el proceso de hidrólisis. Por lo tanto, la estructura de maltodextrina no se produce en la naturaleza.

25 Otros posibles excipientes o vehículos incluyen maltodextrina, goma arábiga, dextrosa, sal, mono y diglicéridos de ácidos grasos, MPG, polisorbato 80, aceite vegetal, mono y diglicéridos de ácidos grasos, jarabe de glucosa, glicerina, agua y alcohol.

Las composiciones se agregaron a la carne cruda de vacuno picada con un 15% de grasa.

30 En el transcurso del trabajo que conduce al presente método y composición, mezclas de extracto de romero y de hesperidina o de extracto de *Punica*, en una serie de proporciones de concentración variables se probaron la eficacia antilistérica utilizando los métodos microbiológicos clásicos. La enumeración bacteriana en todas las muestras aquí estudiadas se realizó en el medio Aloa según el método normalizado (NF EN ISO 11-290). El crecimiento de *Listeria monocytogenes* se evaluó en carne sin ningún agente antilistérico y sin ningún extracto vegetal (referencia). Los datos de crecimiento listérico en una carne de referencia se representan en la figura 2. A destacar que después de 6 días de crecimiento, *Listeria* creció ligeramente, solo en 0,29 log CFU/ml. Después de 9 días de crecimiento, *Listeria* creció en 2,42 log CFU/ml. Los experimentos en carne se realizaron en envases con atmósfera modificada (MAP) que contenían más del 20% de O₂, más exactamente 70% de O₂ y 30% de CO₂.

40 Después de la elaboración de la carne, se tomó una muestra de un lote de carne inmediatamente después del proceso de picado y se transportó en condiciones refrigeradas al laboratorio. En el laboratorio, la carne se muestreó en muestras de 2 kg y se acondicionó al vacío a -20°C, 24 h antes de la experimentación, las muestras de carne de 2 kg se transfirieron a 2-4°C y se mantuvieron a esta temperatura durante 24 h \pm 3 h hasta la temperatura del centro alcanzó -1°C.

45 En esta fase, las muestras de carne de 2 kg se inocularon con *Listeria monocytogenes* en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 para evitar la contaminación por otros microorganismos. Cualquier enriquecimiento adicional a la carne se realizó en dicho laboratorio. Después de la homogeneización del inóculo a 4°C, las muestras de carne inoculadas de 2 kg se enriquecieron con extractos vegetales y se homogeneizaron. Los extractos vegetales estaban en forma de polvo y se añadieron como tales a la carne. Para mantenerlos como polvos secos, los extractos vegetales se enriquecieron con maltodextrina antes del proceso de secado.

Los extractos vegetales podrían agregarse como líquidos lipófilos o hidrófilos, o una de sus combinaciones, a la carne. Para hacerlo, el extracto lipófilo o hidrófilo vegetal necesita estar disuelto o líquido, los extractos no secos se pueden usar directamente sin pasar por la etapa de secado.

50 Inmediatamente después del enriquecimiento de extractos vegetales y de la homogeneización, dos piezas de 100 g de carne picada así formada se colocaron juntas en bandejas. Las piezas de carne de referencia, sin tratamiento con extracto, siguieron el mismo procedimiento.

Las bandejas se acondicionaron luego bajo atmósfera modificada de 20% o más de oxígeno, preferiblemente 70% de O₂ y 30% de CO₂ a 4 o a 8°C. La carne envasada se almacenó en la oscuridad durante un tiempo determinado.

5 Se realizaron una serie de experimentos con extractos de romero y hesperidina, extractos de romero y *Punica*, compuestos antilistéricos típicos (lactato de sodio o acetato de sodio) y referencia sin tratar. Se añadieron a la carne mezclas o extractos solos de romero y de hesperidina al 1,18%. Se añadieron a la carne mezclas o extractos solos de romero y de *Punica* al 0,48%. Se añadieron compuestos antilistéricos típicos, lactato de sodio y acetato de sodio a concentraciones clásicas de 25 g/kg y 3 g/kg, respectivamente, en experimentos separados.

Se prepararon combinaciones de extractos y se agregaron a la carne según las siguientes proporciones y dosis antes de la prueba:

	Referencia LM	0,5R	R	0,5P	P	0,5R + 0,5P	0,5R + P	R + 0,5P	R + P
Composición de extractos (%)		0,00	6,65	0,00	0,00	3,33	3,33	6,65	6,65
	Extracto de romero	0,00	6,65	0,00	0,00	3,33	3,33	6,65	6,65
	Ácido carnósico	0,00	2,93	0,00	0,00	1,47	1,47	2,93	2,93
	Ácido carnósico + carnosol	0,00	3,22	0,00	0,00	1,61	1,61	3,22	3,22
	Extracto de granada	0,00	0,00	13,50	27,00	13,50	27,00	13,50	27,00
	Ácido elálgico	0,00	0,00	0,27	0,54	0,27	0,54	0,27	0,54
	Punicalaginas	0,00	0,00	1,22	2,43	1,22	2,43	1,22	2,43
Composición en carne picada (ppm)		0	319	0	0	160	160	319	319
	Extracto de romero	0	319	0	0	160	160	319	319
	Ácido carnósico	0	140	0	0	70	70	140	140
	Ácido carnósico + carnosol	0	154	0	0	77	77	154	154
	Extracto de granada	0	0	648	1296	648	1296	648	1296
	Ácido elálgico	0	0	13	26	13	26	13	26
	Punicalaginas	0	0	58	117	58	117	58	117

R: extracto de romero; P: extracto de *Punica*; 0,5R: media concentración de extracto de romero; 0,5P: media concentración de extracto de *Punica*

Inmediatamente después del enriquecimiento y la homogeneización, dos piezas de 100 g de carne picada en forma de hamburguesas se colocaron en bandejas. Las bandejas se acondicionaron luego en una atmósfera modificada que contenía 70% de O₂ y 30% de CO₂ y se almacenaron a 8°C hasta el análisis del crecimiento de *Listeria* y de las características organolépticas, incluido el color rojo. Dichos análisis se realizaron los días 0, 6° y 9° de almacenaje.

5 El crecimiento de *Listeria monocytogenes* se evaluó en carne en condiciones refrigeradas para cada extracto o compuesto y para sus combinaciones. El crecimiento de *Listeria monocytogenes* se midió al comienzo del experimento, a los 2/3 de la vida útil comercial (6 días) y en el momento correspondiente a la duración comercial de la vida útil (9 días). Se calcularon los valores logarítmicos del crecimiento listérico (log CFU/ml) para cada experimento y tratamiento. Se calcularon las diferencias de los valores logarítmicos del crecimiento de *Listeria* (log CFU/ml) entre
10 la carne tratada con extractos vegetales y la referencia no tratada para obtener un resultado final. Cuanto más negativo fue el valor obtenido, mayor fue el efecto antilistérico del extracto o de la combinación de extractos. En la microbiología de la ciencia de la carne, durante un tiempo dado, los valores se consideran significativos entre dos series cuando se observa una diferencia de 0,5 log₁₀ CFU · g⁻¹ (Chaillou *et al.*, 2014); (Guide pour la validation des méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de l'incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de
15 l'environnement), Schweizerische Eidgenossenschaft, Confédération suisse, Département fédéral de l'économie, de la formation et de la recherche DEFR, Documento n 328, abril de 2013, Rev. 03). En microbiología, se observa que un tratamiento tiene un efecto antibacteriano significativo si su efecto excede de -0,5 log CFU/ml en comparación con la referencia no tratada.

20 Durante el crecimiento listérico, se controló el color de la carne y se tomaron imágenes inmediatamente después de la adición del extracto (el día 0) y el 6° día de crecimiento). Las imágenes se tomaron en condiciones normalizadas de exposición a la luz y usando un sistema llamado "PackShot Creator". De hecho, este equipo profesional consiste en una caja de luz optimizada que contiene cuatro tubos fluorescentes que difunden luz homogénea, lo que produce imágenes tomadas siempre en las mismas condiciones, con una reflexión mínima.

25 Cada imagen que representa la "muestra" en una escala de tiempo diferente se cargó en el programa ImageJ de análisis de imágenes de código abierto. El software se usa normalmente en la industria alimentaria para medir diferentes parámetros alimentarios, como el color o la densidad (Reineke *et al.* "The Influence of Sugars on Pressure Induced Starch Gelatinization, *Procedia Food Science*, 1, 2011, 2040-3046; Kelkar *et al.* "Development of new 3D measurement techniques and prediction method for food density determination, *Procedia Food Science*, 1, 2011, 483-491) Para obtener valores representativos del color rojo, se usó la unidad de color rojo (R) de las tres unidades de color rojo (R) verde (G) y azul (B) del modelo RGB, y se midió el color de cada píxel de una línea que se dibujó en
30 toda la muestra. La obstrucción en el trazado de la curva RGB incorporada se utilizó para determinar los diferentes valores de color de cada píxel a lo largo de esta línea, en particular los valores del color rojo. Los resultados se presentan como una variación de los diferentes valores de color en función del número de píxeles a lo largo de esta línea. Los resultados se analizaron estadísticamente para detectar diferencias significativas mediante la prueba ANOVA a p <0,05. Así, por muestra, se analizaron más de 1.000 píxeles.

35 Con el fin de evaluar el efecto de los extractos vegetales sobre el color de la carne, se comparó el color rojo de la carne tratada con una referencia no tratada. El efecto se calculó por [color rojo en carne con extracto] - [color rojo en carne de referencia (sin extracto)]. El efecto negativo significa que la adición de extractos no conserva el color rojo de la carne. El efecto positivo significa que la adición de extractos mejora el color rojo de la carne en comparación con la referencia.
40

Mezclas de romero y *Punica*

Crecimiento de Listeria monocytogenes en carne cruda

45 Resultados de dichas pruebas el 6° y 9° días se presentan en la figura 9 y la figura 10. Los datos son medias de 2 a 6 repeticiones. Los datos representan diferencias log en el crecimiento de *L. monocytogenes* en carne tratada en comparación con las referencias inoculadas (carne no tratada). Los datos se analizaron estadísticamente para la significación a p <0,05 utilizando ANOVA. Letras diferentes indican diferencias significativas a p <0,05.

Tabla 8:

Extracto de romero (%)	Extracto de <i>Punica</i> (%)	Efecto esperado	Efecto medido
R	0		0,26
0	P		0,05
R	P	0,31	0,12

* Efecto inesperado

Extracto de romero y/o extracto de *Punica*: efectos de la concentración total en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* después de 6 días de crecimiento en la carne: [(log (CFU/ml) en la carne tratada con extractos vegetales) - (log (CFU/ml) carne de referencia (sin tratamiento))]

Obsérvese que a tan corta duración (6 días de crecimiento en condiciones de frío), la diferencia en el crecimiento de *Listeria* en la carne tratada con extractos vegetales en comparación con la carne no tratada, expresada en log, no alcanzó -0,5 log, lo que significa que, en tan poco tiempo de crecimiento, no se pudieron apreciar los efectos antilistéricos.

- 5 Obsérvese que cuando se combina, el efecto medido de la combinación de extracto de romero y del extracto de *Punica* no correspondió a un efecto sinérgico.

Cuando las concentraciones se redujeron a la mitad, se obtuvieron los siguientes efectos esperados calculados a partir de la tabla anterior y los efectos medidos:

Tabla 9:

Extracto de romero (%)	Extracto de <i>Punica</i> (%)	Efecto esperado	Efecto medido
0,5R	0	0,13	0,28
0	0,5P	0,025	0,27
0,5R	0,5P	0,55	0,11*
R	0,5P	0,53	-0,03*
0,5R	P	0,33	0,26*

* Efecto inesperado
 Extracto de romero y/o extracto de *Punica*: Efectos de las concentraciones medias y las combinaciones de concentraciones medias y completas sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* después de 6 días de crecimiento en carne: [(log (CFU/ml) en carne tratada con extractos vegetales) - (log (CFU/ml) carne de referencia (sin tratamiento))]

- 10 Obsérvese que a tan corta duración (6 días de crecimiento en condiciones de frío), la diferencia en el crecimiento listérico expresado en log no alcanzó -0,5 log, lo que significa que en tan corto tiempo de crecimiento, no se pudieron apreciar los efectos antilistéricos.

El efecto inesperado se representa mediante una estrella

- 15 Inesperadamente, el efecto antilistérico de la combinación de media concentración de romero y media concentración de *Punica* excedió los efectos adicionales esperados del romero a la mitad de la concentración o de *Punica* a la mitad de la concentración, solo. Esto es sinergia.

- 20 Además, inesperadamente, el efecto antilistérico de la combinación de la concentración total de romero y la concentración media de *Punica* excedió los efectos adicionales esperados del romero a la concentración total o de *Punica* a la mitad de la concentración, solo. Esto es sinergia.

Aún más, inesperadamente, el efecto antilistérico de la combinación de la mitad de la concentración de romero y de concentración total de *Punica* excedió los efectos adicionales esperados del romero a la mitad de la concentración o de *Punica* a la concentración total, solo. Esto es sinergia.

Los resultados de dichas pruebas el 9º día usando extracto de romero y/o extracto de *Punica* se exponen en la tabla 10.

- 25 Tabla 10:

Extracto de romero (%)	Extracto de <i>Punica</i> (%)	Efecto esperado	Efecto medido
R	0		-0,39
0	P		-0,53
R	P	-0,92	-0,63

* Efecto inesperado
 Extracto de romero y extracto de *Punica*: efectos de concentración total sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* después de 9 días de crecimiento en la carne: [(log (CFU/ml) en la carne tratada con extractos vegetales) - (log (CFU/ml) carne de referencia (sin tratamiento))]

<Obsérvese que como se mencionó anteriormente, en microbiología, un tratamiento tiene un efecto antibacteriano si su efecto excede -0,5 log CFU/ml en comparación con la referencia no tratada. Obsérvese que después de nueve (9) días de crecimiento en condiciones frías, en comparación con la referencia, la diferencia en el crecimiento listérico

5 expresado en log CFU/ml excedió -0,5 log CFU/ml cuando la carne se trató con concentraciones completas de *Punica* o de la combinación de concentración total de romero y de concentración total de *Punica*. El romero solo a la concentración total no inhibió significativamente el crecimiento listérico en comparación con la carne de referencia no tratada. Sin embargo, la combinación de romero plena la concentración total con *Punica* a la concentración total tuvo un mayor efecto antilistérico que cuando los extractos se usaron solos y permitieron superar el umbral de -0.5 log CFU/ml que se requiere para un efecto significativo en el crecimiento antilistérico.

Tabla 11:

Extracto de romero (%)	Extracto de <i>Punica</i> (%)	Efecto esperado	Efecto medido
0,5R	0	-0,195	-0,35*
0	0,5P	-0,265	-0,84*
0,5R	0,5P	-1,19	-1,47*
R	0,5P	-1,23	-1,45*
0,5R	P	-0,88	-0,69

* Efecto inesperado
 Extracto de romero y extracto de *Punica*: efectos de las concentraciones a la mitad y combinaciones de concentraciones a la mitad y completas sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* después de 9 días de crecimiento en la carne: [(log (CFU/ml) en la carne tratada con extractos vegetales) - (log (CFU/ml) carne de referencia (sin tratamiento))]

10 Después de 9 días de crecimiento en la carne, todos los extractos solos menos uno o sus combinaciones en casi todas las concentraciones probadas inhibieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en más de 0,5 log CFU/ml en comparación con la referencia, lo que significa que tenían un efecto antilistérico en la carne. Solamente el extracto de romero solo cuando se probó a la mitad de la concentración no alcanzó la diferencia de -0,5 log CFU/ml en comparación con la referencia.

15 Inesperadamente, el extracto de *Punica* solo tuvo un mayor efecto antilistérico cuando se usó a la mitad de la concentración en comparación con una concentración total. Además, inesperadamente, cuando se usa a la mitad de la concentración, el extracto de romero tuvo un efecto antilistérico mayor de lo esperado. Aún más, inesperadamente, el efecto antilistérico de la combinación de la mitad de la concentración de romero y la mitad de la concentración del extracto de *Punica*, excedió sus efectos adicionales esperados de romero a la mitad de la o del extracto de *Punica* a la mitad la concentración solo. Esto es sinergia.

20 Además, inesperadamente, el efecto antilistérico de la combinación de la concentración total de romero y de mitad de la concentración del extracto de *Punica*, excedió los efectos adicionales esperados de romero a la concentración total o de hesperidina a concentración reducida a la mitad, solo. Esto es sinergia.

Además, inesperadamente, extracto de romero combinado con *Punica* el extracto a concentraciones medias tuvo un mayor efecto antilistérico que cada extracto solo a concentración completa. Esto es sinergia (ver, por ejemplo, la figura 1).

25 Se analizaron diferentes concentraciones y sus superficies de respuesta utilizando un diseño experimental factorial de metodología de respuesta de superficie que se diseñó en tres niveles. Estos resultados se muestran en la figura 11. Indican los siguientes rangos de concentración que proporcionan una respuesta antilistérica en la carne que se determina como [log (CFU/ml) en carne tratada con extractos vegetales] - [log (CFU/ml) carne de referencia (sin extracto vegetal)] <-1 como se muestra en la tabla 12.

30 Tabla 12:

Extracto	Extracto (%)
Extracto de <i>Punica</i>	5,0 - 24,0
Extracto de romero	0,5 - 8,0
* Extracto %	

Obsérvese que para garantizar el efecto antilistérico, cualquiera de las concentraciones de extracto anteriores (Tabla 12) se puede agregar en combinación o solo a la carne. El porcentaje total del extracto agregado, solo o en combinación, a la carne no superó el 0,18%.

Color rojo de la carne cruda

El color de la carne fue apreciado por un grupo de expertos en análisis sensorial. Este grupo de expertos distinguió el color de la carne entre tonos rojo brillante, rojo, marrón y verde. Todas las muestras de carne eran de color rojo brillante el día 0 de los experimentos.

- 5 El 6º día, la apreciación general del grupo de expertos describió el color de diferentes muestras de carne sometidas a diferentes tratamientos de carne de la siguiente manera:

	Color de carne el 6º día
Referencia	marrón
Acetato de sodio	marrón
Lactato de sodio	marrón
0,5R	marrón
R	marrón
0,5P	rojo
P	rojo
0,5R + 0,5P	rojo
0,5R + P	marrón
R + 0,5P	rojo
R + P	marrón

- 10 Durante el crecimiento listérico, se controló el color de la carne enriquecida o no con extractos vegetales y se tomaron imágenes inmediatamente después de la adición del extracto (el día 0) y el 6º día de crecimiento). Los píxeles rojos se cuantificaron como se explicó anteriormente en el apartado Métodos.

Los resultados de dicho control el 6º día con extracto de romero y extracto de *Punica* solo o en combinación se expone a continuación:

Tabla 13:

Extracto de romero (%)	Extracto de <i>Punica</i> (%)	Efecto esperado	Efecto medido
R	0		-3,72
0	P		-5,60
R	P	-9,32	1,27*

* Efecto inesperado
 Extracto de romero y extracto de *Punica*: efectos de concentración total en la conservación del color rojo de la carne después de 6 días de crecimiento en la carne. El efecto se calculó por: [color rojo de la carne con extracto] - [color rojo de la carne de referencia (sin extracto)]

- 15 A las concentraciones anteriores (tabla 13), cuando se agrega solo, el extracto de romero o de *Punica* estropeó la conservación del color rojo de la carne en comparación con la referencia. Por lo tanto, se esperaba que cuando se combinaran, estos extractos estropearían aún más la conservación del color rojo de la carne. Inesperadamente, cuando se combinan, los extractos de romero y *Punica* mejoraron la conservación del color rojo de la carne en comparación con la referencia.

- 20 Inesperadamente, el efecto sobre la conservación del color rojo de la carne de la combinación de la concentración total de romero y la concentración total de *Punica* excedió los efectos adicionales esperados del romero a concentración total o de concentración total de *Punica* solo. Esto es sinergia.

Tabla 14:

Extracto de romero (%)	Extracto de <i>Punica</i> (%)	Efecto esperado	Efecto medido
0,5R	0	-1,86	1,07*
0	0,5P	-2,80	-0,34*
0,5R	0,5P	0,73	4,45*
R	0,5P	-4,04	-2,71*
0,5R	P	-4,53	6,37*
* Efecto inesperado			

5 Extracto de romero y extracto de *Punica*: Efectos de las concentraciones completas y de la mitad y combinaciones de concentraciones de la mitad y completas sobre la conservación del color rojo de la carne después de 6 días de crecimiento de *Listeria* en la carne. Cada efecto se calculó por: [color rojo de la carne con extracto] - [color rojo de la carne de referencia (sin extracto)]

10 Como las concentraciones totales de extractos de romero y de *Punica* deterioraron la conservación del color rojo de la carne, era de esperar que las concentraciones a la mitad también hubieran estropeado la conservación del color rojo de la carne. Inesperadamente, reduciendo a la mitad la concentración de romero añadida mejoró significativamente la conservación del color rojo de la carne en comparación con la referencia no tratada.

Agregar romero mejoró significativamente la conservación del color de la carne en comparación con la carne de referencia no tratada. Inesperadamente, reducir a la mitad la concentración del extracto de *Punica* agregado no deterioró tanto como se esperaba la conservación del color rojo de la carne.

15 Además, inesperadamente, la mejora de la conservación del color rojo de la combinación de la mitad de la concentración de romero y la mitad de la concentración de *Punica* extracto, excedió sus efectos adicionales esperados de romero a la concentración por la mitad o de *Punica* extraer a la mitad la concentración solo. Esto es sinergia.

Además, inesperadamente, la mejora de la conservación del color rojo de la combinación de la concentración total del extracto de romero y de la concentración a la mitad del extracto de *Punica*, excedió los efectos adicionales esperados de romero a la concentración total o de hesperidina a concentración reducida a la mitad, solo. Esto es sinergia.

20 Aún más, inesperadamente, la mejora de la conservación del color rojo de la combinación de concentración total del extracto de *Punica* y de concentración a la mitad del extracto de romero, excedió los efectos adicionales esperados del extracto de *Punica* a la concentración total o del extracto de romero a concentración reducida a la mitad, solo. Esto es sinergia.

25 Inesperadamente, la combinación de concentración total del extracto de *Punica* y de la concentración a la mitad del extracto de romero mejoró la conservación del color de la carne, mientras que cabía esperar que la conservación del color se deteriorara tras la aplicación de dicha combinación.

La figura 6 muestra que todas las combinaciones entre el extracto de romero y el de *Punica* a cualquier concentración aquí presentada mejoraron significativamente la conservación del color rojo de la carne en comparación con la referencia y en comparación con los agentes antilistéricos clásicos como el acetato de sodio y el lactato de sodio.

30 Experimentos *in vitro* (incluidas las composiciones de referencia que comprenden romero y hesperidina):

35 Actividades antimicrobianas de extractos de romero, *Punica* y hesperidina solos y en combinación. Extractos vegetales de romero, hesperidina, *Punica* y sus combinaciones romero/hesperidina, romero /*Punica* se prepararon en 10% en DMSO_{50%} final según el siguiente protocolo en donde se prepararon combinaciones de extractos, se completaron hasta el 100% con maltodextrina y agregadas a las soluciones de prueba según las siguientes proporciones y dosis antes de la prueba.

Tabla 15:

		R/H
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	3,05
	<i>Ácido carnósico</i>	1,34
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	1,48
	Extracto de hesperidina	56,7
	<i>Hesperidina</i>	53,87

R: extracto de romero; H: extracto de hesperidina

Tabla 16:

		R	P	R/P
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	5,33	0	5,33
	<i>Ácido carnósico</i>	2,35	0	2,35
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	2,58	0	2,58
	Extracto de granada	0	21,60	21,60
	<i>Ácido elágico</i>	0	0,43	0,43
	Punicalaginas	0	1,94	1,94

R: extracto de romero; P: extracto de *Punica*

5 Preparación de solución de trabajo/prueba

Se mezclaron 200 mg del extracto (combinación) con 1 ml de DMSO al 100%, se agitó vigorosamente, se aplicó ultrasonidos durante 10 minutos a una potencia del 100%, 45 kHz, modo normal, se agitó vigorosamente, se volvió a aplicar ultrasonidos y se diluyó 1:2 en agua esterilizada a una concentración final de 100 mg/ml de DMSO ^{50% final}.

10 Estos preparados a 100 mg/ml se prepararon en un tubo Eppendorf esterilizado de 5 ml. Se tomó una muestra antes de preparar placas de concentración bactericida mínima (MBC). MBC, concentración mínima de fungicida (MFC) y concentración mínima inhibidora (MIC).

Principio

15 La concentración bactericida mínima (MBC) es la concentración más baja de muestra requerida para matar al menos el 99,99% del inóculo (-4log10). La concentración bactericida mínima (MBC) es la concentración más baja de un agente antibacteriano requerida para matar una bacteria determinada. Se puede determinar a partir de las pruebas de concentración mínima inhibidora (MIC) de dilución de caldo subcultivando en placas de agar-agar que no contienen el agente de prueba. La MBC se identifica determinando la concentración más baja de agente antibacteriano que reduce la viabilidad del inóculo bacteriano inicial en $\geq 99,9\%$. La MBC es complementaria a la MIC; mientras que la prueba MIC demuestra la concentración menor de agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento, la MBC demuestra concentración menor de agente antimicrobiano que produce la muerte microbiana. Esto significa que incluso si una MIC determinada presenta inhibición, colocar las bacterias en el agar-agar aún podría provocar la proliferación de organismos porque el antimicrobiano no causó la muerte. Los agentes antibacterianos generalmente se consideran bactericidas si la MBC no es más de cuatro veces la MIC. Esta prueba se basó en el recuento de microorganismos en los pocillos que muestran poco o ningún crecimiento visual y luego en placas. Muestras preparadas en 10% DMSO_{50%} ^{final} se probaron a concentraciones de 2,5, 0,5 y 0,1%, frente a una referencia de DMSO equivalente (12,5, 2,5 y 0,5% respectivamente).

25 En el caso de las levaduras, se realizaron concentraciones mínimas de fungicida (CMF) como WCD. En el caso de la cepa *A. brasiliensis*, un hongo, la mera presencia de crecimiento se interpretó como ausencia de actividad fungicida. La concentración inhibidora mínima (MIC) es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhiba el crecimiento visible de un microorganismo después de un período de incubación adaptado. Las concentraciones inhibidoras mínimas se suelen usar para determinar la potencia de nuevos agentes antimicrobianos, como extractos vegetales o sus combinaciones. La concentración inhibidora mínima o MIC es la concentración más baja que es suficiente para inhibir el crecimiento microbiano por los extractos probados en la presente memoria. Esta prueba se basa en la observación visual de los pocillos que contienen cepa microbiana que se estudia con extractos probados o sin ellos

(referencia). La duración y las condiciones de crecimiento microbiano se realizaron según métodos clásicos bien conocidos por un experto en la técnica.

5 Las pruebas se realizaron en las siguientes cepas bacterianas *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica ser typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus hirae*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella bovis* y dos levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* y el moho *Aspergillus brasiliensis*. La evaluación de la actividad bactericida y fungicida se realizó según el procedimiento interno en medios ricos en nutrientes, con un inóculo calibrado de 10^5 - 10^6 CFU/ml para bacterias y levaduras y 10^5 esporas/ml para *A. brasiliensis*.

10 Antes de la evaluación antimicrobiana de los extractos, se verificó la esterilidad de los extractos mediante placas. La ausencia de crecimiento microbiano era obligatoria. Los cultivos microbianos se realizaron de forma clásica como se resume en la tabla 17.

Tabla 17. Condiciones de crecimiento y colecciones de microorganismos

Organismo	Colección	Condiciones de cultivo
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11.778	TS-30°C-24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 4.83	TS-37°C-18h
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19.115	TS-37°C-24h
<i>Salmonella typhimurium</i>	CIP 103.799	TS-37°C-18h
<i>Escherichia coli</i>	CIP 53.126	TS-37°C-18h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIP 82.118	TS-37°C-18h
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 35.668	COS 5% sangre/Streptos de caldo-37°C-24h
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 8043	Caldo TS-37°C-24h
<i>Enterobacter cloacae</i>	CIP 103.475	Caldo TS-30°C-24h
<i>Moraxella bovis</i>	CIP 70.40 T	TS/Caldo Col 10% suero de caballo-30°C-24h
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13.124	RCM/37°C/Anaerobiosis/48h
<i>Candida albicans</i>	UMIP 48.72	Sabouraud/30°C/48h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	UMIP 1181.79	Sabouraud/30°C/48h
<i>Aspergillus niger</i>	IP 1431.83	Sabouraud/30°C/48h

Resultados

15 Tabla 18: Concentraciones de MBC y MFC (0,1; 0,5 o 2,5%) de Romero (R), *Punica* (P), Romero/*Púnica* (R/P) y Romero/Hesperidina (R/H) como eficaces contra los microorganismos aquí presentados.

	R/H	R/P
<i>S. aureus</i>	0,5	0,1
<i>S. mutans</i>	2,5	0,5
<i>S. typhimurium</i>	2,5	0,1
<i>P. aeruginosa</i>	2,5	0,1
<i>E. coli</i>	2,5	0,5
<i>L. monocytogenes</i>		0,5
<i>B. cereus</i>	2,5	0,1
<i>C. perfringens</i>	0,5	0,1
<i>E. hirae</i>		2,5
<i>E. cloacae</i>		0,5
<i>M. bovis</i>	0,1	0,1

Combinación R/H de extractos de romero y hesperidina según la tabla 15; R: extracto de romero, P: extracto de

Punica, R/P: combinación de extractos de romero y *Punica* según la tabla 16. Celdas vacías: las concentraciones mínimas (si las hubiera) serían mayores que la concentración más alta aquí medida (2,5%).

Tabla 19: Efectos inesperados/sinérgicos de MBC y MFC de R y P (% en solución de prueba)

	MBC/MFC de R (%)	MBC/MFC de P (%)	MBC/MFC esperado de R/P (%)	MBC/MFC medido de R/P (%)
<i>S. typhimirium</i>	0,5	0,5	0,25-0,5	0,1*
<i>P. aeruginosa</i>	0,5	0,5	0,25-0,5	0,1*
<i>C. perfringens</i>	0,03	>0,016	>0,016	0,0078*

*: Resultado inesperado
Inesperadamente, cuando se aplica en combinación, la concentración mínima de la combinación R/P para disminuir el crecimiento microbiano en 4 log, *S. typhimirium* y *P. aeruginosa* es sorprendentemente bajo; es 2,5-5 veces menor de lo esperado. Sorprendentemente, cuando se combinan los dos extractos, su actividad aumenta sinérgicamente en 2,5-5 veces.

- 5 Inesperadamente, el efecto anti-salmonella de la combinación de extractos de romero y *Punica*, excedieron sus efectos adicionales esperados cuando los extractos se aplicaron solos. De hecho, cabría esperar que para lograr el mismo efecto anti-salmonella y disminuir el crecimiento microbiano en 4 log, la MBC se hubiera reducido a la mitad en el mejor de los casos cuando los extractos se combinan en comparación con la MBC cuando los extractos se aplicaron solos. Sorprendentemente, aquí, la MBC se redujo en 2,5-5 veces. Esto es sinergia.
- 10 Más inesperadamente, el efecto anti-pseudomonas de la combinación de extractos de romero y *Punica*, excedieron sus efectos adicionales esperados cuando los extractos se aplicaron solos. De hecho, cabría esperar que para lograr el mismo efecto anti-pseudomonas y disminuir el crecimiento microbiano en 4 log, la MBC se habría reducido a la mitad en el mejor de los casos cuando los extractos se combinan en comparación con la MBC cuando los extractos se aplicaron solos. Sorprendentemente, aquí, la MBC se redujo en 2,5-5 veces. Esto es sinergia.
- 15 Aún más inesperadamente, el efecto anti-clostridium de la combinación de extractos de romero y *Punica*, excedieron sus efectos adicionales esperados cuando se aplicaron extractos solos. De hecho, cabría esperar que para lograr el mismo efecto anti-clostridium y disminuir el crecimiento microbiano en 4 log, MIB se habría reducido a la mitad en el mejor de los casos cuando los extractos se combinan en comparación con MIB cuando los extractos se aplicaron solos. Esto es sinergia. Obsérvese que el extracto de *Punica* tuvo un efecto MIC de 0,016%. Esto implica que su MBC debe ser mayor que MIC, lo que significa más de 0,016%. De cualquier manera, es aún más inesperado que la MBC de la combinación de extractos de romero y *Punica* son más de dos veces menores que la MIC de un extracto solo.
- 20

Tabla 20: Efectos de MIC inesperados/sinérgicos de R y P (% en solución de prueba)

	MIC de R (%)	MIC de P (%)	MIC esperada de R/P (%)	MIC medida de R/P (%)
<i>S. mutans</i>	0,25	>1	0,25	0,0625*
<i>S. aureus</i>	0,125	0,5	0,125-0,325	0,0625*
<i>C. albicans</i>	1	>1	1	0,25*
<i>S. cerevisiae</i>	0,25	>1	0,25	0,0625*

- 25 Inesperadamente, cuando se aplica en combinación, la concentración mínima de la combinación R/P para inhibir el crecimiento microbiano de bacterias o levaduras, *S. mutans*, *S. aureus*, *C. albicans* y *S. cerevisiae* es sorprendentemente bajo; es 2-4 veces menor de lo esperado. Sorprendentemente, cuando se combinan los dos extractos, su actividad aumenta sinérgicamente en 2,5-5 veces más de lo esperado.
- 30 Más inesperadamente, el efecto anti-estreptococo de la combinación de los extractos de romero y *Punica*, excedieron sus efectos adicionales esperados cuando los extractos se aplicaron solos. De hecho, cabría esperar que para conseguir el mismo efecto anti-estreptococo e inhibir el crecimiento microbiano, la MIC hubiera sido, en el mejor de los casos, la MIC más baja en comparación con MIC cuando los extractos se aplicaron solos. Sorprendentemente, aquí, las MIC disminuyeron 4 veces de lo esperado. Esto es sinergia.

5 Aún más inesperadamente, el efecto anti-estafilococo de la combinación de extractos de romero y *Punica*, excedieron sus efectos adicionales esperados cuando los extractos se aplicaron solos. De hecho, cabría esperar que para lograr el mismo efecto anti-estafilocócico e inhibir el crecimiento microbiano, la MIC se habría reducido a la mitad en el mejor de los casos cuando los extractos se combinan en comparación con la MIC cuando los extractos se aplicaron solos. Sorprendentemente, aquí, las MIC disminuyeron en 2-4.5 veces de lo esperado. Esto es sinergia.

10 Más inesperadamente, el efecto anti-candida de la combinación de extractos de romero y *Punica*, excedieron sus efectos adicionales esperados cuando los extractos se aplicaron solos. De hecho, cabría esperar que para conseguir el mismo efecto anti-candida e inhibir el crecimiento microbiano, la MIC hubiera sido, en el mejor de los casos, la MIC más baja en comparación con la MIC cuando los extractos se aplicaron solos. Sorprendentemente, aquí, las MIC disminuyeron 4 veces de lo esperado. Esto es sinergia.

15 Y, aún más inesperadamente, el efecto anti-saccharomyces de la combinación de extractos de romero y *Punica*, excedieron sus efectos adicionales esperados cuando los extractos se aplicaron solos. De hecho, cabría esperar que para conseguir el mismo efecto anti-saccharomyces e inhibir el crecimiento microbiano, MIC habría sido, en el mejor de los casos, la MIC más baja en comparación con la MIC cuando los extractos se aplicaron solos. Sorprendentemente, aquí las MIC disminuyeron 4 veces de lo esperado. Esto es sinergia.

Se observa que *P. aeruginosa* y *S. typhimirium* son bacterias Gram negativas. *C. perfringens*, *S. mutans*, *S.aureus* y *L. monocytogenes* son bacterias Gram positivas. *C. albicans* y *S. cerevisiae* son levaduras.

20 Romero en combinación con extracto de *Punica* claramente presenta efectos antimicrobianos sinérgicos contra el crecimiento de bacterias Gram positivas (incluyendo *L. monocytogenes* (en carne), *C. perfringens*, *S. mutans*, *S.aureus*), Gram negativas (incluido *S. typhimirium*, *P. aeruginosa*) y levaduras (incluyendo *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*).

Tabla 21: Se resumen a continuación los efectos inesperados/sinérgicos de la combinación de extractos R/P sobre diferentes microorganismos.

Microorganismo	Naturaleza del microorganismo.	Gram (+ o -)	Efecto antimicrobiano
<i>L. monocytogenes</i>	Bacterias	G+	Inesperado, sinergia
<i>S. typhimirium</i>	Bacterias	G-	Inesperado, sinergia
<i>P. aeruginosa</i>	Bacterias	G-	Inesperado, sinergia
<i>C. perfringens</i>	Bacterias	G +	Inesperado, sinergia
<i>S. mutans</i>	Bacterias	G +	Inesperado, sinergia
<i>S. aureus</i>	Bacterias	G +	Inesperado, sinergia
<i>C. albicans</i>	Levadura		Inesperado, sinergia
<i>S. cerevisiae</i>	Levadura		Inesperado, sinergia

25 Obsérvese que la hesperidina en combinación con romero no tuvo efecto bactericida *in vitro* en *Listeria monocytogenes* incluso a las concentraciones más altas aquí probadas: 2,5%.

Sin embargo, sorprendentemente, dicha combinación de extractos, que es comparativa, inhibió de manera significativa y eficiente el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos de manera sinérgica.

30 Se podría hacer una observación similar al comparar los efectos de la hesperidina (también comparativa) *in vitro* según lo descrito en el estado de la técnica frente al crecimiento de la *Listeria monocytogenes* y en la carne (este estudio). De hecho, aunque la hesperidina *in vitro* no tuvo efectos antilistéricos, inhibió el crecimiento listérico en la carne de vacuno.

Uso de los extractos de romero/*punica* y de romero/hesperidina de referencia en matrices de carne/aves de corral/pescados

Métodos de elaboración, incorporación de extractos, contaminación listérica e inhibición del crecimiento.

35 Se produjeron salchichas de cerdo y aves de corral frescas según las recetas habituales utilizadas por la industria. En lo que respecta a los pescados y mariscos, aquí ejemplificados por salmón ahumado, su elaboración también se realizó según los procedimientos industriales.

Lotes de carne/aves/pescado

40 Siempre que sea posible, para superar la variabilidad de las materias primas en cuanto a pH y flora endógena (proporción y naturaleza de la flora constituyente) para cada carne/categoría, la elaboración se llevó a cabo en 3 lotes

de materias primas procedentes de diferentes proveedores/ granjas de carnes/aves/pescado (salmón). Los extractos vegetales o sus combinaciones se incorporaron al comienzo de cada receta, junto con los ingredientes básicos de elaboración. Los extractos vegetales o sus combinaciones se incorporaron en matrices alimentarias a 1-3 concentraciones diferentes, como se explica en las tablas 23, 24, 26, 27, 29 y 30 a continuación.

- 5 En lo que respecta a cada categoría de producto, se probaron referencias, es decir, productos que no comprenden extractos de plantas.

Naturaleza y origen de cepas de listeria monocytogenes./condiciones de preparación bacteriana

10 Se estudiaron dos cepas de *Listeria monocytogenes* mezcladas (50/50) según el Standard Operating Procedure NF V01-009 y referente el a cualquier producto de carne/aves/pescado. En cuanto a las pruebas en productos cárnicos: se usaron la cepa de referencia CIP 7838 (serovar 4b) y la llamada cepa de campo aislada de cerdo (colección ADIV) serotipo 1/2a, la que predomina en más del 50% de la carne de cerdo fresca.

15 En cuanto se refiere a la carne de aves de corral, la cepa de referencia 7838 se acopló a una cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la carcasa de aves de corral (colección ADIV; serotipo 1/2b). En cuanto se refiere a las pruebas en salmón: la cepa de referencia CIP 7838 se mezcló con una cepa aislada de salmón que ADIV fue donada por un socio de su red. En lo que respecta a cualquier matriz estudiada aquí, las dos cepas se prepararon e inocularon según las directrices de los Standard Operating Procedures NF V01-009 (Versión 2014).

20 Las cepas congeladas, preservadas como criobillas (-80°C se revivieron y se cultivaron individualmente. Cada cepa se revivió trasplantando 0,1 ml en 10 ml de medio de cultivo BHI (durante 24 ha 30°C). Dos subcultivos sucesivos han producido un precultivo de cada cepa. Posteriormente, cada cepa se cultivó nuevamente durante 24 horas a 30°C. El último cultivo se usó en la contaminación del producto matriz (al final de la fase exponencial o fase estacionaria inicial). Después de dos centrifugaciones sucesivas, los gránulos se pusieron en suspensión en 10 ml de agua con peptona tamponada (BPW), se hicieron recuentos en medio BHI y la solución bacteriana se mantuvo a 0°C durante 24 horas antes de la inoculación. Después de leer el crecimiento bacteriano, las concentraciones se ajustaron para inocular el producto de la matriz alimentaria con la mezcla de las dos cepas (50/50) a 2-3 log cfu/g.

25 *Método de inoculación*

30 Como se especifica en el NF V01-009, el modo de inoculación de los productos debe coincidir con la realidad de la contaminación industrial. Por lo tanto, las salchichas (cerdo o aves de corral) se infectaron por inoculación en la masa de la mezcla de carne para simular la contaminación de la carne. Como la contaminación del salmón ahumado ocurre durante el manejo de las materias primas o al rebanar/envasar, aquí se aplicó la contaminación de la superficie de las lonchas de salmón.

35 El método de inoculación en la superficie de los productos ha sido desarrollado por ADIV y se ha proporcionado un peso exacto del inóculo, calculado de manera que se obtenga la concentración deseada en la superficie de los productos. Independientemente del método de inoculación (suelo o superficie), para mantener la actividad adecuada del agua de los productos alimenticios, se calculó el volumen acuoso que debe añadirse a la matriz alimentaria para no exceder una relación peso/volumen de 1/100 (NF V01-009).

Elaboración de productos de carne/aves/pescado e incorporación de extractos

Salchichas de cerdo

40 Las salchichas de cerdo se elaboraron según un proceso convencional, de conformidad con el código de prácticas, de carne de cerdo magra (86%) y grasa de cerdo (14%). La mezcla inicial de carne destinada a la fabricación de salchichas se obtuvo moliendo/picando grasa y partes magras de carne de cerdo a baja temperatura a través de una rejilla (rejilla de 6 mm). Luego, aquí se agregaron extractos vegetales probados cuando era aplicable, según la tabla 24 y la tabla 25. Después de la homogeneización, la mezcla se rellenó en tripas naturales (menús de ovejas, diámetro 24/26).

Contaminación/envasado

45 Para un lote dado, se preparó una mezcla de carne de 42 kg y a continuación se dividió en diferentes conjuntos de 5 kg cada uno para la producción de series de prueba. Se agregaron cinco (5) kg de mezcla de carne a una mezcla preparada que no contenía ningún agente antimicrobiano ni aditivo (Mix Fraiche 230 South a 23 g/kg) y 50 g de agua/kg. Después de la homogeneización, la mezcla así obtenida se dividió en partes. Una porción sin contaminación listérica artificial se colocó en bandejas (6 salchichas por bandeja) que se envasaron en condiciones MAP (70% O₂/30% CO₂) con un escenario de tiempo de conservación 1/3 del tiempo de conservación a 4°C y 2/3 del tiempo de conservación a 8°C. La otra parte estaba artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes* en una proporción media de 3 log cfu/g (inoculación en la masa de carne picada) antes de ser envasada y conservada como se describió anteriormente. Las muestras de carne contaminada que no contenían extractos vegetales se denominaron referencia.

Control analítico durante la conservación.

Se realizaron análisis microbiológicos en DO y JDLC (D14) y se referían a la enumeración de *Listeria monocytogenes*,

la flora acidificante mesófila total (FAM) y la flora láctica. En cada punto de análisis, se realizó un único lote de repetición mediante el análisis de una bandeja (n = 3 para los 3 lotes).

Elaboración de salchichas de aves

5 Se produjeron salchichas de aves según las mismas condiciones experimentales que se describen para las salchichas de cerdo. La única diferencia sigue siendo la naturaleza de las materias primas utilizadas y la naturaleza de los compuestos que pueden haberse agregado. De hecho, en este caso, el magro se hizo utilizando partes superiores del 85% de muslos de pollo y grasa representada por la piel.

10 La mezcla de carne picada no incluía ningún antimicrobiano clásico, pero contenía una mezcla de la cual se eliminaron los ingredientes que tenían actividad antimicrobiana o antioxidante (Mix Chipó Flight 310 a 31 g/kg). La mezcla preparada de este modo comprendía extractos vegetales o no (referencias) y seguía las mismas condiciones experimentales y análisis listéricos/bacterianos que los descritos para la carne de cerdo.

Preparación e inoculación de salmón ahumado.

15 La elaboración de salmón ahumado se realizó según procedimientos clásicos bien conocidos y disponibles para una persona experta en la técnica. En cuanto a los productos cárnicos, se hicieron tres lotes diferentes de salmón de tres orígenes diferentes durante la misma semana. Los productos se envasaron en lonchas en bandejas al vacío (aproximadamente 200 g por bandeja) en el sitio industrial antes del análisis listérico/bacteriano.

20 A alimentos marinos probados, es decir, salmón ahumado, se les incorporaron combinaciones de extractos de romero y extractos de hesperidina, y extractos de romero y *Punica* según las proporciones y concentraciones descritas en las tablas 29 y 30. El salmón se pesó y luego se inoculó en la superficie por pulverización, con la mezcla de las dos cepas (50/50) a una proporción media de $3 \pm 0,5 \log/g$. Después de la inoculación, las placas se volvieron a envasar al vacío y se almacenaron a 8°C durante 30 días. El crecimiento de *Listeria* se controló tras la inoculación (día 0) y el día 30° de crecimiento. Las referencias no inoculadas se mantuvieron en almacenamiento en frío para todas las matrices de carne/aves/pecado probadas aquí para comparación.

25 El pH, la flora acidificante mesófila total, la flora láctica se midieron en todos los experimentos en carne de vacuno, cerdo, carne de ave o pescado. La presencia de extractos botánicos probados aquí en estas matrices de alimentos no tuvo un impacto significativo en el pH, la flora acidificante mesófila total, la flora láctica.

Ejemplo: Efectos antimicrobianos de R/P y R/H de referencia en salchichas de aves

El método clásico, disponible para personas expertas en la técnica y basado en el protocolo descrito para carne picada y anteriormente, se aplicó a salchichas procesadas de aves de corral.

30 Como se describió anteriormente, brevemente, se inocularon tres lotes diferentes de aves de corral frescas procesadas en salchichas, que comprenden combinaciones de extractos R/P y R/H a diferentes concentraciones con *Listeria monocytogenes*. Las referencias no comprendían extractos vegetales. Las muestras de carne fresca de aves de corral se mantuvieron en condiciones frescas y el crecimiento de *Listeria* se midió el día 14.

Tabla 22: Carga inicial de *Listeria* por lote de salchichas de aves

Lote	<i>L. monocytogenes</i> (cfu/g)
Lote 1	1,95E+03
Lote 2	2,93E+03
Lote 3	2,75E+03

35 Los extractos se prepararon de la siguiente manera: la mitad de las cantidades de R (0,5 R) y la mitad de las cantidades de H (0,5 H) o la mitad de los extractos de P (0,5 P) como se definió anteriormente, se mezclaron según la tabla 21 y la mezcla se completó hasta el 100% con maltodextrina. Estas mezclas en polvo se agregaron a la carne fresca de aves de corral después de la elaboración en salchichas en proporciones como se describe en las tablas 23 y 24. Las tablas 23 y 24 también indican los contenidos finales en extractos y compuestos de extractos en % y en ppm, en extracto y en la matriz de carne.

40 Obsérvese que el 0,5% de 0,5R + 0,5H correspondería a las cantidades en los compuestos de extractos denominados 0,5R + 0,5H que se probaron en carne picada. Además, obsérvese que el 0,3% de 0,5R + 0,5P correspondería a las cantidades en los compuestos de extractos denominados 0,5R + 0,5P que se probaron en carne picada. Todos los datos obtenidos se analizaron y expresaron (s decir, delta log, etc.) según las explicaciones comunicadas sobre la carne picada.

Tabla 23:

		Referencia	0,5R + 0,5H
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	0,00	3,05
	<i>Ácido carnósico</i>	0,00	1,34
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0,00	1,48
	Extracto de hesperidina	0,00	56,70
	<i>Hesperidina</i>	0,00	53,87
			0,6%
Composición en aves de corral (ppm)	Extracto de romero	0	183
	<i>Ácido carnósico</i>	0	80
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0	89
	Extracto de hesperidina	0	3402
	<i>Hesperidina</i>	0	3232

Tabla 24:

		Referencia LM	0,5R + 0,5P
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	0,00	5,33
	<i>Ácido carnósico</i>	0,00	2,35
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0,00	2,58
	Extracto de granada	0,00	21,60
	<i>Ácido elágico</i>	0,00	0,43
	Punicalagins	0,00	1,94
			0,2% 0,4%
Composición en aves de corral (ppm)	Extracto de romero	0	107 213
	<i>Ácido carnósico</i>	0	47 94
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0	52 103
	Extracto de granada	0	432 864
	<i>Ácido elágico</i>	0	9 17
	Punicalagins	0	39 78

5 Resultados:

L. monocytogenes ha crecido claramente en la carne de referencia (Fig. 12.) Cuando se agregaron combinaciones de extractos a la carne, inhibieron eficientemente el crecimiento de *Listeria* (figura 13 y figura 14). Esos datos confirman los datos encontrados en la carne picada que demostraron claramente el efecto antilistérico sinérgico de los extractos de romero y hesperidina, que son comparativos, y de romero y *Punica*, que están de acuerdo con la presente invención.

10 Ejemplo: Efectos antimicrobianos de R/P y R/H de referencia en salchichas de cerdo.

A las salchichas de cerdo procesadas se aplicó el método clásico, disponible para cualquier experto en la técnica y basado en el protocolo descrito para carne picada anteriormente.

15 En resumen, se inocularon con *Listeria monocytogenes* tres lotes diferentes de carne de cerdo fresca procesada en salchichas, que comprenden combinaciones de extractos R/P y R/H a diferentes concentraciones. Las referencias no comprendían extractos vegetales. Las muestras de carne de cerdo fresca se mantuvieron en condiciones frescas (8°C) y el crecimiento de *Listeria* se midió el día 14^o.

Tabla 25: Carga inicial de Listerial por lote

Lote	<i>L. monocytogenes</i> (cfu/g)
Lote 1	1,55E+03
Lote 2	2,96E+03
Lote 3	2,36E+03

5 Los extractos se prepararon de la manera siguiente: la mitad de las cantidades de R (0,5 R) y la mitad de las cantidades de H (0,5 H) o la mitad de los extractos de P (0,5 P) como se definió anteriormente, se mezclaron según la tabla 24 y, la mezcla se completó hasta el 100% con maltodextrina. Estas mezclas en polvo se agregaron a la carne fresca de cerdo después de la elaboración en salchichas en proporciones como las descritas en las tablas 26 y 27. Las Tablas 26 y 27 también indican los contenidos finales en extractos y compuestos de extractos en% y en ppm, en extracto y en la matriz de carne.

10 Obsérvese que el 0,5% de 0,5R + 0,5H correspondería a las cantidades en los compuestos de extracto denominados 0,5R + 0,5H que se probaron en carne picada. También obsérvese que el 0,3% de 0,5R + 0,5P correspondería a las cantidades en los compuestos de extractos denominados 0,5R + 0,5P que se probaron en carne picada. Todos los datos obtenidos se analizaron y expresaron (es decir, delta log, etc.) según las explicaciones dadas anteriormente para la carne picada.

Tabla 26:

		Referencia	0,5R + 0,5H		
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	0,00	3,05		
	<i>Ácido carnósico</i>	0,00	1,34		
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0,00	1,48		
	Extracto de hesperidina	0,00	56,70		
	<i>Hesperidina</i>	0,00	53,87		
		Referencia	0,4%	0,5%	0,6%
Composición en carne de cerdo (ppm)	Extracto de romero	0	122	153	183
	<i>Ácido carnósico</i>	0	54	67	80
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0	59	74	89
	Extracto de hesperidina	0	2268	2835	3402
	<i>Hesperidina</i>	0	2155	2694	3232
		Referencia	0,4%	0,5%	0,6%
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	0,00	3,05		
	<i>Ácido carnósico</i>	0,00	1,34		
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0,00	1,48		
	Extracto de hesperidina	0,00	56,70		
	<i>Hesperidina</i>	0,00	53,87		
			0,4%	0,5%	0,6%
Composición en carne de cerdo (ppm)	Extracto de romero	0	122	153	183
	<i>Ácido carnósico</i>	0	54	67	80
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0	59	74	89
	Extracto de hesperidina	0	2268	2835	3402
	<i>Hesperidina</i>	0	2155	2694	3232

15

Tabla 27:

		Referencia LM		0,5R + 0,5P	
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	0,00		5,33	
	<i>Ácido carnósico</i>	0,00		2,35	
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0,00		2,58	
	Extracto de granada	0,00		21,60	
	<i>Ácido elágico</i>	0,00		0,43	
	Punicalagins	0,00		1,94	
			0,2%	0,3%	0,4%
Composición en carne de cerdo (ppm)	Extracto de romero	0	107	160	213
	<i>Ácido carnósico</i>	0	47	71	94
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0	52	77	103
	Extracto de granada	0	432	648	864
	<i>Ácido elágico</i>	0	9	13	17
	Punicalagins	0	39	58	78

Resultados:

- 5 *L. monocytogenes* ha crecido claramente en la carne de referencia (figura 15). Cuando se agregaron combinaciones de extractos a la carne, inhibieron eficazmente el crecimiento de *Listeria* en todas las concentraciones aquí probadas (figura 16 y figura 17). Esos datos confirman los datos encontrados en la carne picada que demostraron claramente un efecto antilistérico sinérgico de extractos de romero y hesperidina, y de romero y *Punica*.

El método clásico, disponible para personas expertas en la técnica y basado en el protocolo descrito para la carne picada y antedichas, se aplicó a los salmones ahumados.

- 10 Como se describió anteriormente, en resumen, se inocularon con *Listeria monocytogenes* tres lotes diferentes de salmón ahumado, que comprenden combinaciones de extracto R/P y R/H a diferentes concentraciones. Las referencias no comprendían extractos vegetales. Las muestras de salmón ahumado se mantuvieron en condiciones frías y el crecimiento de *Listeria* se midió el día 14.

La carga inicial de *Listeria* por lote de salchichas de aves fue como se presenta en la tabla 28:

- 15 Tabla 28: Carga inicial de *Listeria* en salmón ahumado

Lote	<i>L. monocytogenes</i> (cfu/g)
Lote 1	1,46E + 03
Lote 2	4,93E + 03
Lote 3	5,64E + 03

Tabla 29:

		Referencia		0,5R + 0,5H	
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	0,00		3,05	
	<i>Ácido carnósico</i>	0,00		1,34	
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0,00		1,48	
	Extracto de hesperidina	0,00		56,70	
	<i>Hesperidina</i>	0,00		53,87	

		Referencia	0,4%	0,5%
Composición en salmón ahumado (ppm)	Extracto de romero	0	122	153
	<i>Ácido carnósico</i>	0	54	67
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0	59	74
	Extracto de hesperidina	0	2268	2835
	<i>Hesperidina</i>	0	2155	2694

Tabla 30:

		Referencia LM	0,5R + 0,5P
Composición de extractos (%)	Extracto de romero	0,00	5,33
	<i>Ácido carnósico</i>	0,00	2,35
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0,00	2,58
	Extracto de granada	0,00	21,60
	<i>Ácido elágico</i>	0,00	0,43
	Punicalagins	0,00	1,94
			0,3%
Composición en salmón ahumado (ppm)	Extracto de romero	0	160
	<i>Ácido carnósico</i>	0	71
	<i>Ácido carnósico + carnosol</i>	0	77
	Extracto de granada	0	648
	<i>Ácido elágico</i>	0	13
	Punicalagins	0	58

5 Obsérvese que 0,3% de 0,5R + 0,5P corresponde a las mismas proporciones y dosis de la combinación de extractos agregada en la carne picada y denominada 0,5R + 0,5P.

Resultados:

10 *L. monocytogenes* ha crecido claramente en salmón ahumado de referencia (figura 18). Cuando se agregaron combinaciones de extractos a la carne, inhibieron eficientemente el crecimiento de *Listeria* (figura 19 y figura 20). Esos datos confirman los datos encontrados en la carne picada que demostraron un efecto antilistérico sinérgico de los extractos de romero y hesperidina (comparativo), y de romero y *Punica* (según la presente invención).

Referencias

Se han citado numerosas referencias a lo largo de esta descripción. También se hace referencia a los documentos enumerados a continuación.

15 Kai Reineke, Henning Weich, Dietrich Knorr, "The Influence of Sugars on Pressure-Induced Gelatinization Starch", *Procedia Food Science*, vol. 1, (2011), páginas 2040-2046.

Shivangi Kelkar, Scott Stella, Carol Boushey, Martin Okos, "Development of novel 3D measurement techniques and prediction method for food density determination", *Procedia Food Science*, vol. 1, (2011), páginas 483-491.

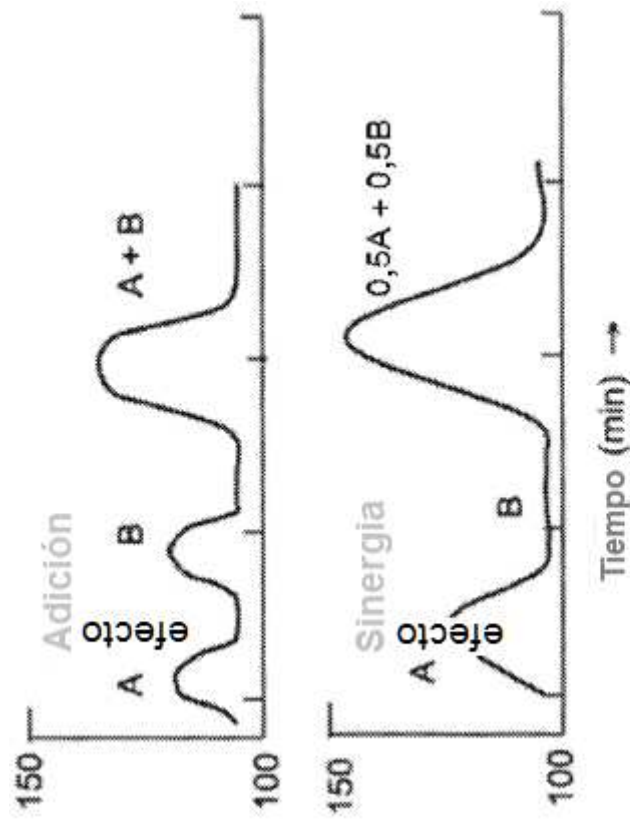
20 S. Chaillou, S.Christieans, M. Rivollier, I. Lucquin, M.C. Champomier-Vergès, M. Zagorec; "Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef"; *Meat Science* 97, (3) (2014), páginas 332-338.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y un extracto de Lamiaceae que contiene los diterpenos fenólicos, ácido carnósico y carnosol, en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae.
- 5 2. La composición según la reivindicación 1, en donde la relación en peso de extracto de *Punica* a extracto de Lamiaceae está comprendida entre 0,625 y 48.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde el extracto de Lamiaceae se selecciona entre extracto de romero, extracto de orégano, extracto de tomillo, extracto de salvia, extracto de menta, extracto de Salvia, extracto de Rosmarinus, extracto de Lepechinia, extracto de Oreganum, extracto de Thymus, extracto de Hyssopus y sus mezclas.
- 10 4. La composición según la reivindicación 1, además comprende un vehículo seleccionado de goma arábiga, dextrosa, sal, mono y diglicéridos de ácidos grasos, MPG, polisorbato 80, dextrosa, aceite vegetal, jarabe de glucosa, glicerina, monooleato de decaglicérol, ésteres de ácidos grasos, alcohol bencílico alcohol etílico, propilenglicol, polisorbatos, sorbitanos, trioleato de sorbitán, triglicéridos cápricos/caprílicos y sus combinaciones.
- 15 5. La composición según la reivindicación 4, en donde la composición está en forma de polvo seco o está en forma líquida.
6. La composición según la reivindicación 4, en donde la composición comprende uno o más aromatizantes y adyuvantes.
7. La composición según la reivindicación 1, en donde la composición es eficaz contra levaduras seleccionadas del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* y/o bacterias Gram positivas seleccionadas del grupo que consiste en *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus hirae* y *Mycobacterium bovis* y/o bacterias Gram negativas seleccionadas del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Enterobacter cloacae*.
- 20 8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el extracto de Lamiaceae está esencialmente exento de aceite esencial natural.
- 25 9. Un producto alimenticio que comprende un alimento y la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un producto alimenticio según la reivindicación 9, en donde el alimento se selecciona del grupo que consiste en carne, aves de corral y pescado.
- 30 11. Un producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene entre 12 y 188 ppm de diterpeno fenólico de Lamiaceae y entre 4 y 24 ppm de ácido elágico y entre 19 y 120 ppm de punicalaginas de extracto de *Punica*.
12. Un producto alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la relación en peso de extracto de *Punica* al extracto de Lamiaceae presente en el alimento está comprendida entre 0,625 y 48.
13. Un método para elaborar alimentos que comprende:
 35 aplicar o incorporar a un alimento, una composición que comprende un extracto de *Punica* que contiene punicalaginas y ácido elágico y un extracto de Lamiaceae que contiene diterpenos fenólicos ácido carnósico y carnosol de, en donde la mayoría de los componentes volátiles del aceite se han eliminado del extracto de Lamiaceae.
14. El método según la reivindicación 13, en donde el alimento se selecciona del grupo que consiste en carne, pescado o aves de corral frescos.
- 40 15. El método según la reivindicación 13, en donde aplicar o incorporar en los alimentos comprende aplicar la composición, en forma de polvo seco, al alimento, opcionalmente en donde la composición es una composición única que comprende tanto el extracto de Lamiaceae como el extracto de *Punica*.
16. Método según la reivindicación 13, en donde la relación en peso de compuestos de Lamiaceae a extracto de *Punica* está comprendida entre 0,625 y 48.
- 45 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde la relación en peso de extracto de *Punica* al diterpeno fenólico de Lamiaceae presente en el alimento está comprendido entre aproximadamente 0,625 y 48, y en donde el extracto de *Punica* está presente en los alimentos en una cantidad comprendida entre 4 y 24 ppm de ácido elágico de extracto de *Punica* y entre 19 y 120 ppm de punicalaginas de extracto de *Punica*.
18. El método de la reivindicación 17, en donde el método alarga la vida del color, inhibe, disminuye y/o limita el crecimiento bacteriano en el producto alimenticio.
- 50 19. El método de la reivindicación 18, en donde el crecimiento bacteriano inhibido, disminuido y/o limitado se

selecciona del grupo que consiste en *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus hirae* y *Mycobacterium bovis* o se selecciona del grupo que consiste en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Enterobacter cloacae*.

- 5 20. El método según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en donde el extracto de Lamiaceae está esencialmente exento de aceite esencial natural.



TÉCNICA ANTERIOR

FIG. 1

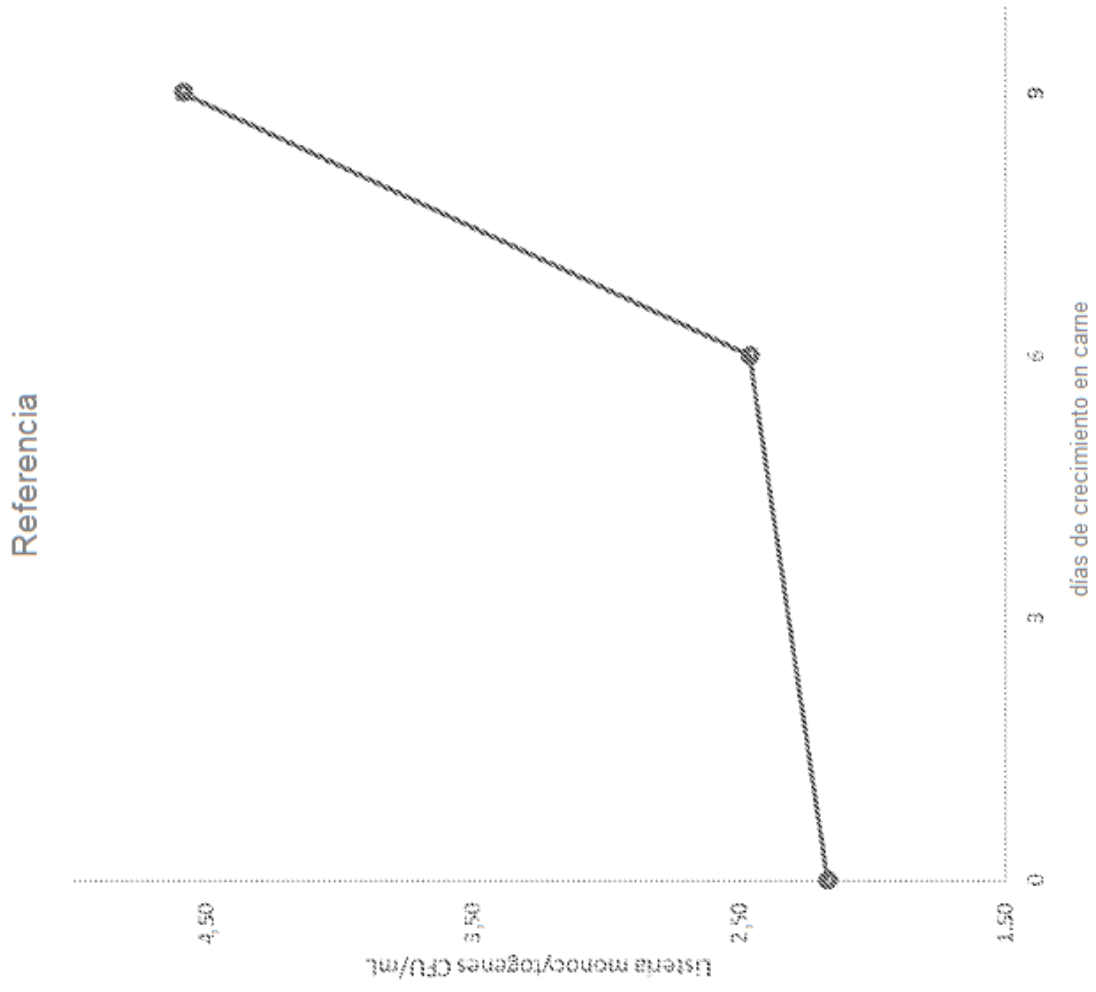


FIG. 2

Efectos sinérgicos antilistéricos de combinaciones de extractos de hesperidina y romero

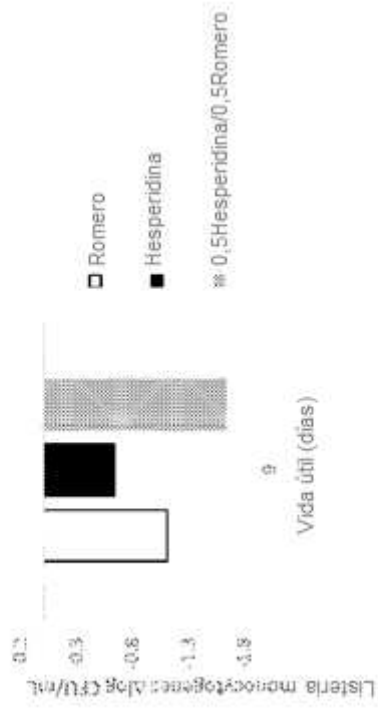


FIG. 3

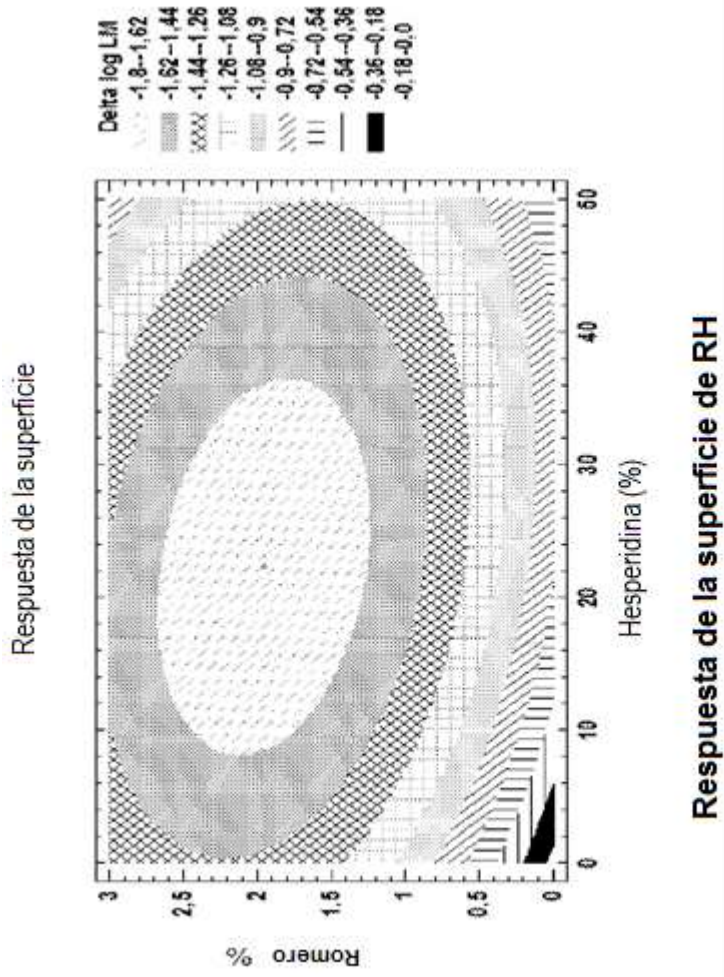


FIG. 4

COLOR ROJO EN CARNE PICADA EL 6º DÍA A 8°C

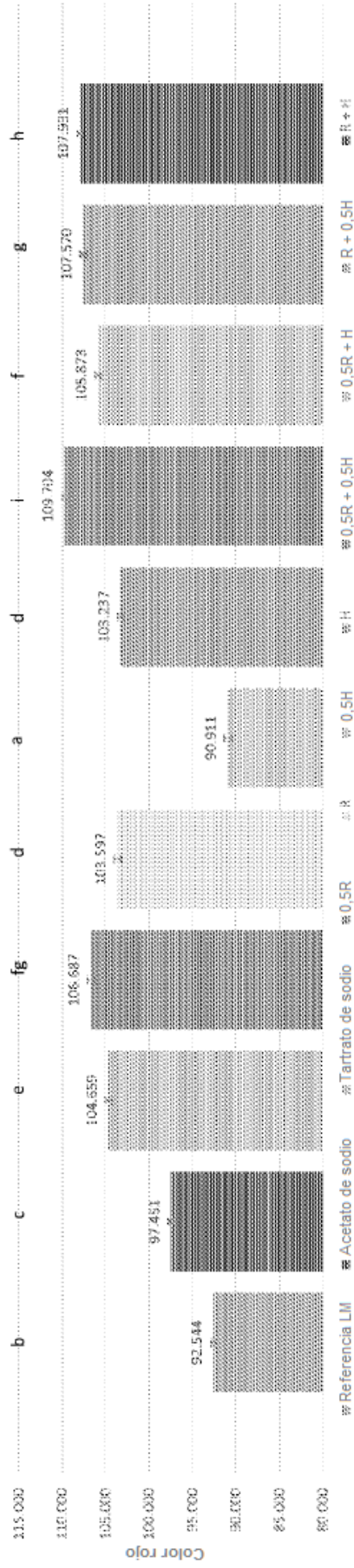


FIG. 5

COLOR ROJO EN CARNE PICADA EL 6º DÍA A 8°C

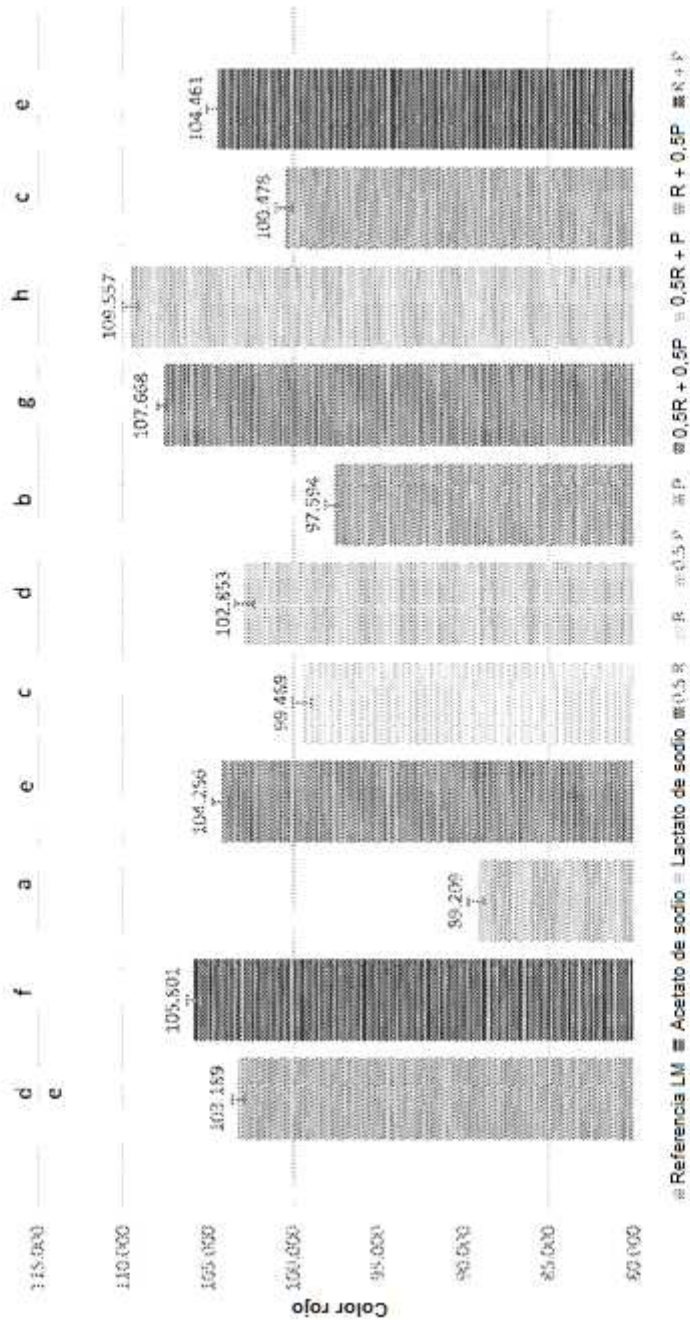


FIG. 6

Inhibición de *Listeria monocytogenes* por extractos vegetales en carne de vacuno picada a 8°C el 6º día de crecimiento

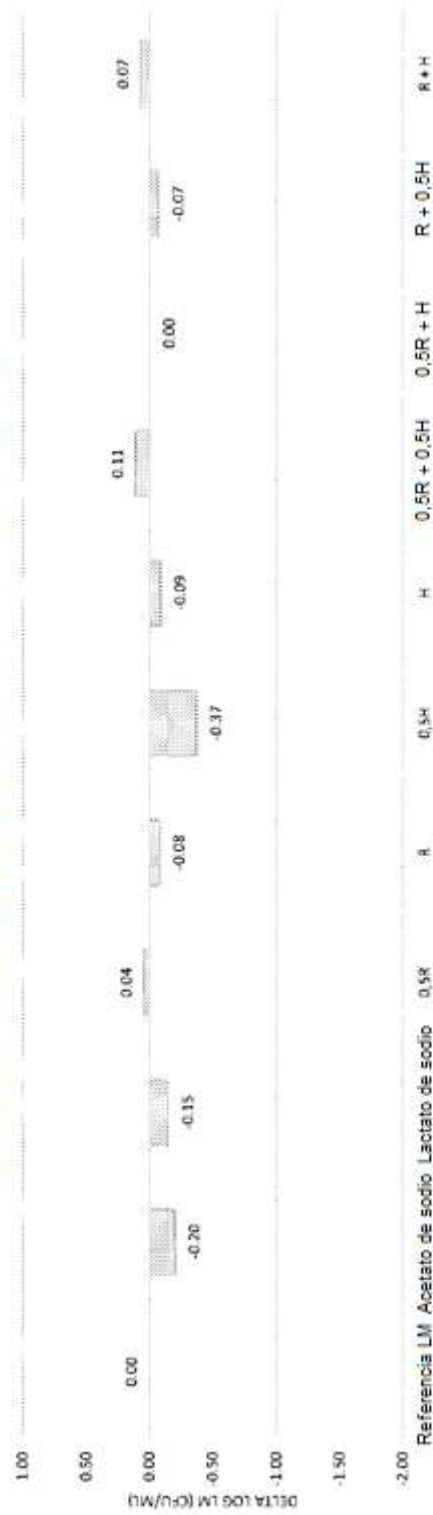


FIG. 7

**Inhibición de *Listeria monocytogenes* por extractos vegetales
e carne de vacuno picada a 8°C el 9º día de crecimiento**

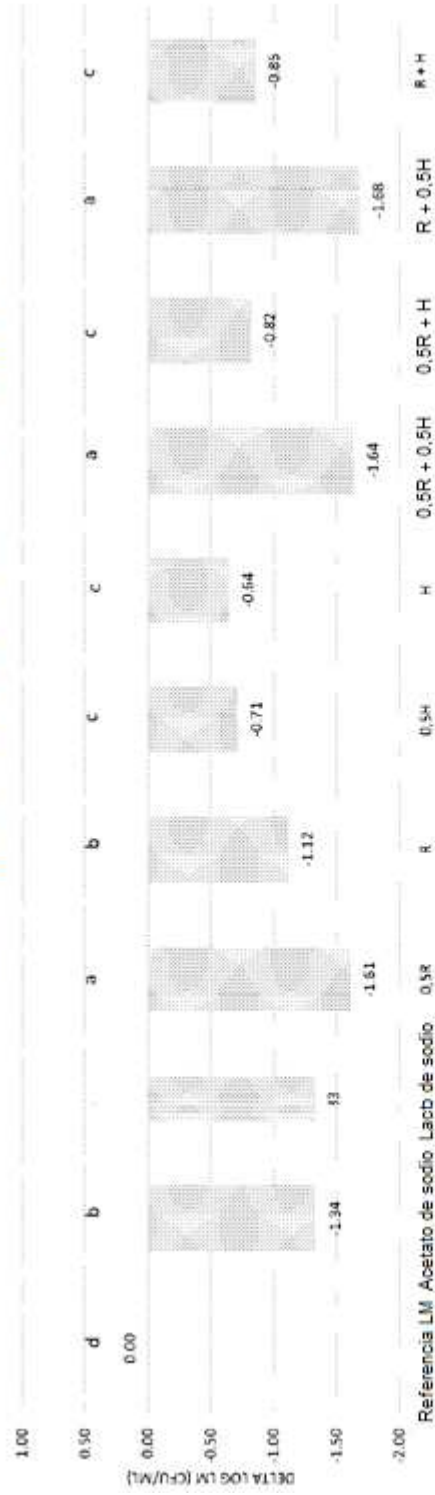


FIG. 8

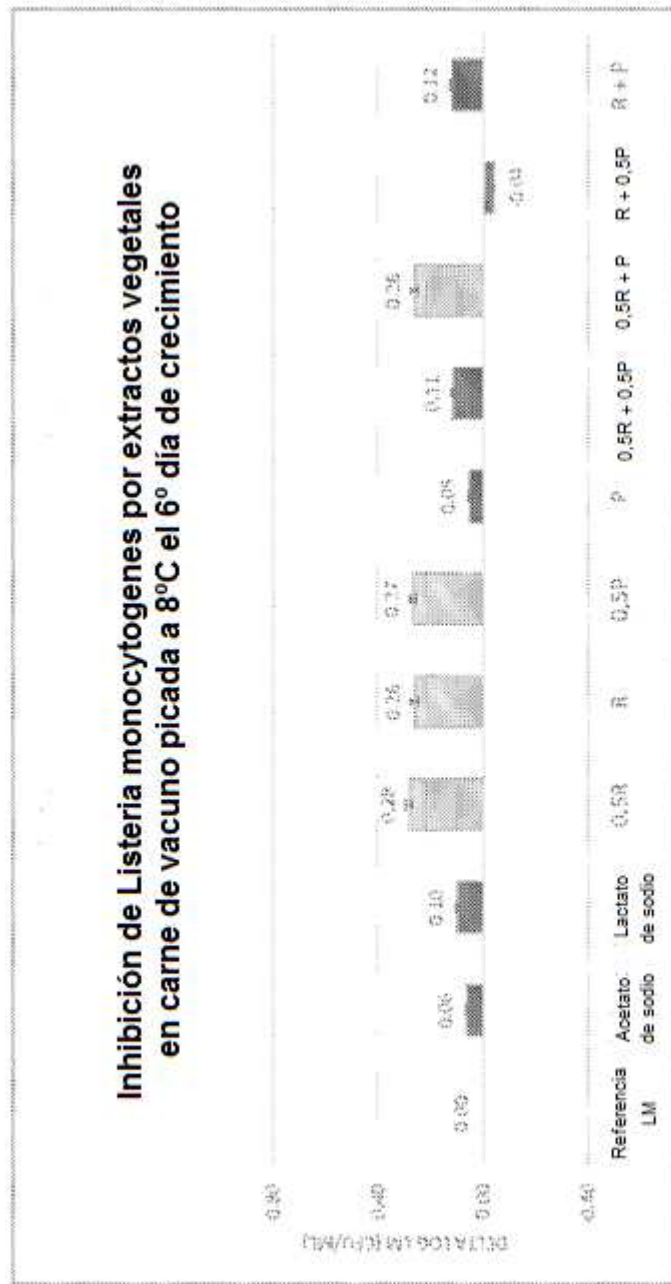


FIG. 9

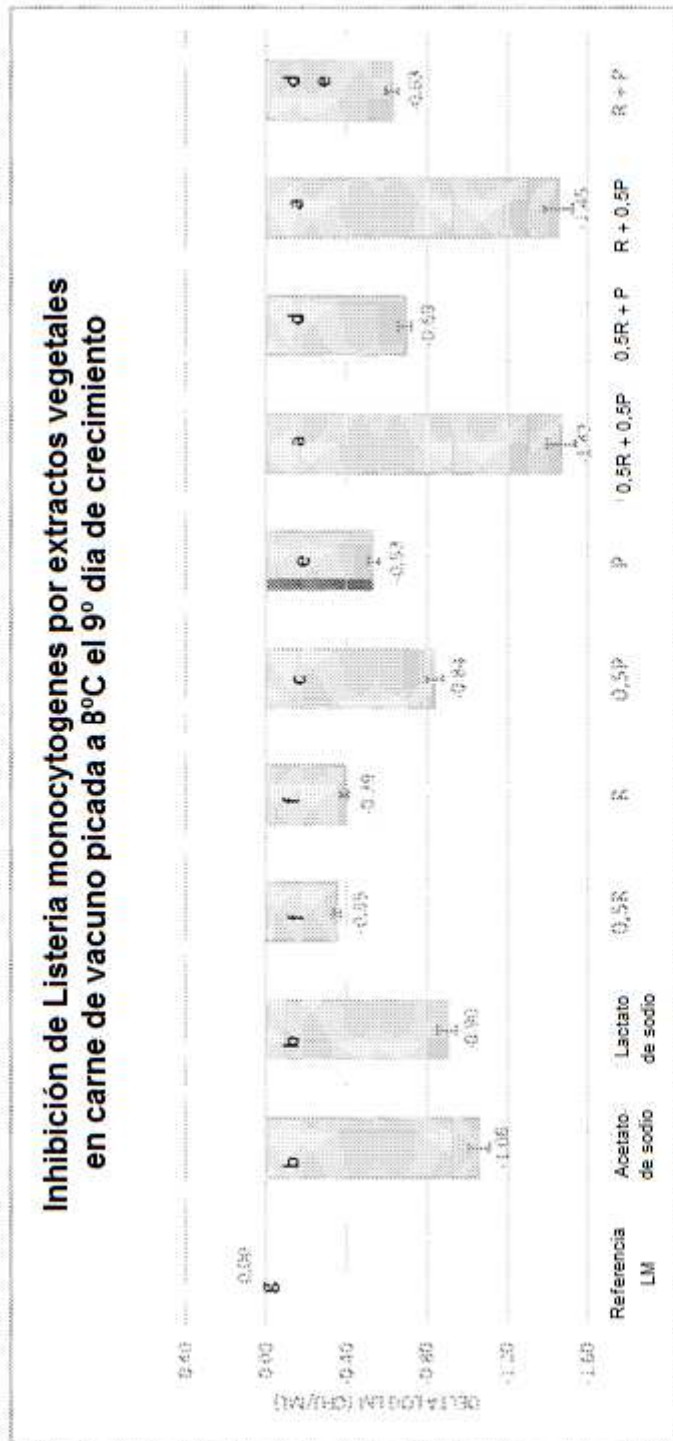


FIG. 10

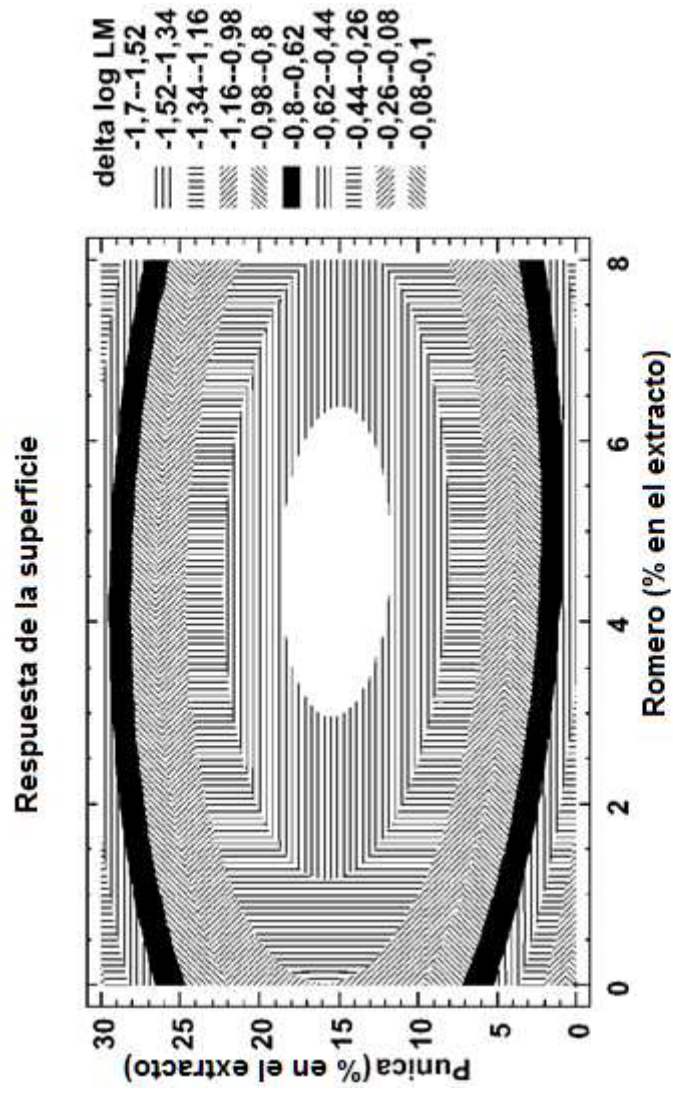


FIG. 11

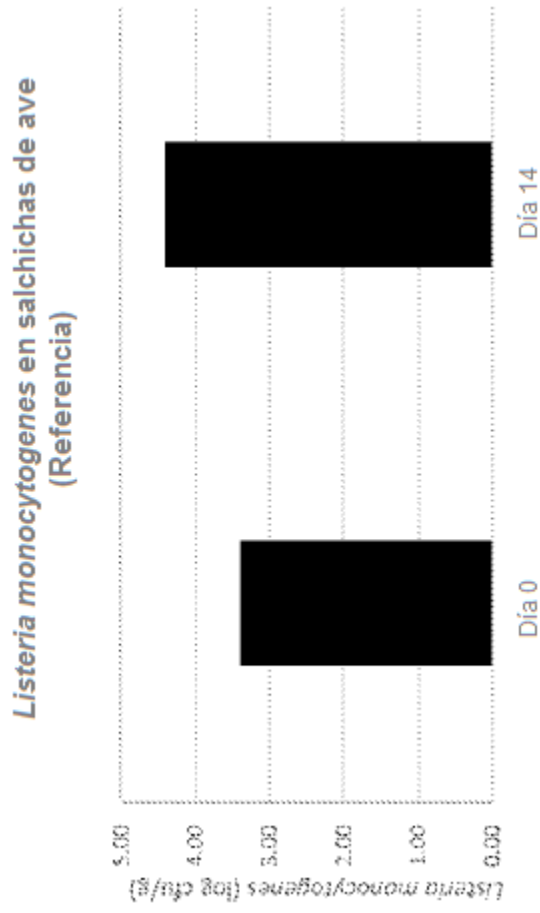


FIG. 12

Inhibición del crecimiento listérico en salchichas de ave por combinación de extractos de R/P

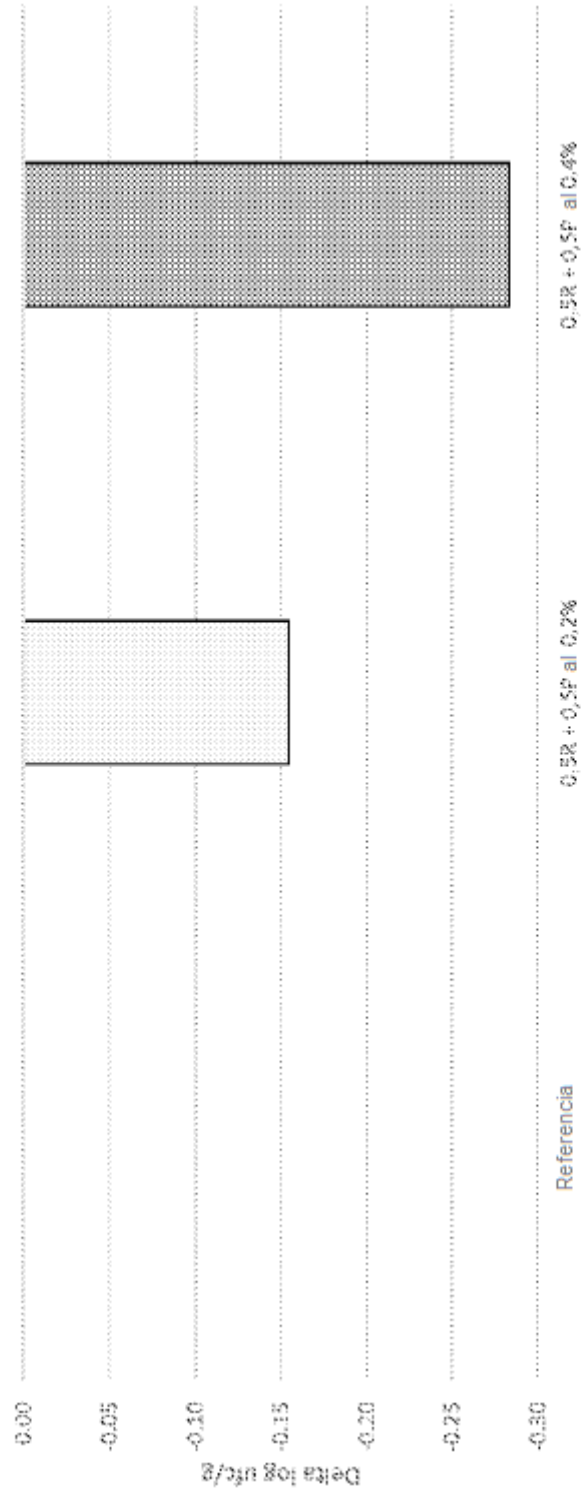


FIG. 13

Inhibición del crecimiento listérico en salchichas de ave por combinación de extractos de R/H

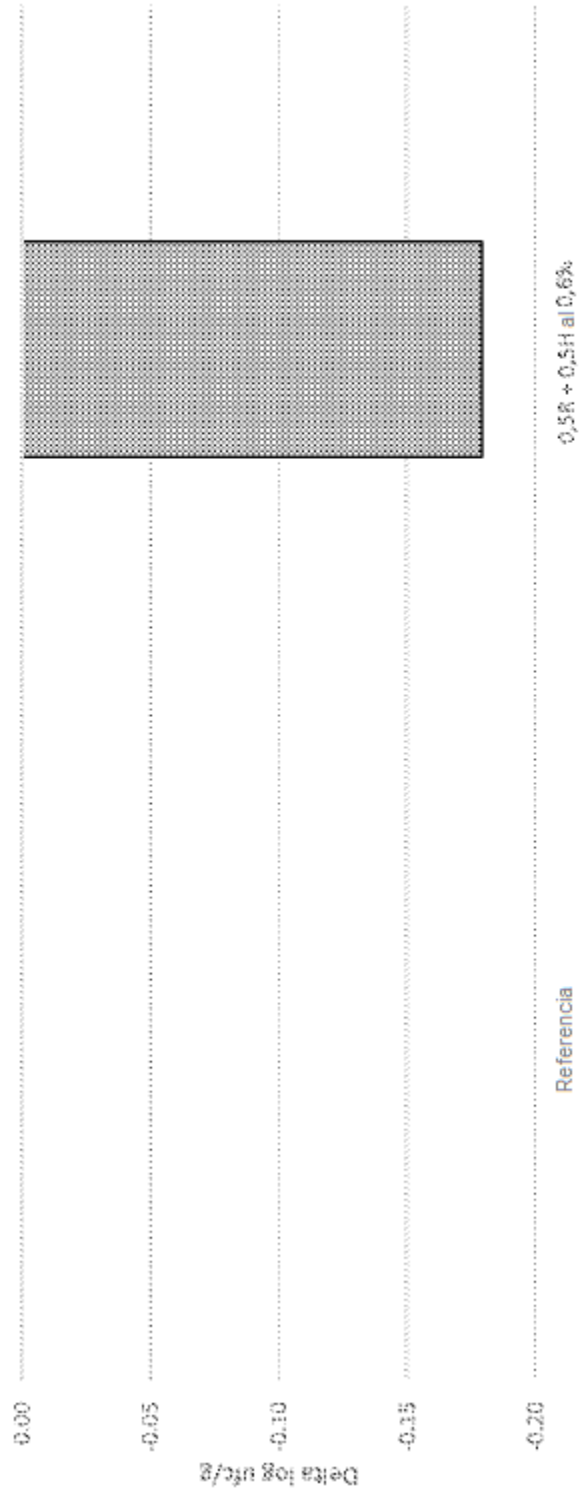


FIG. 14

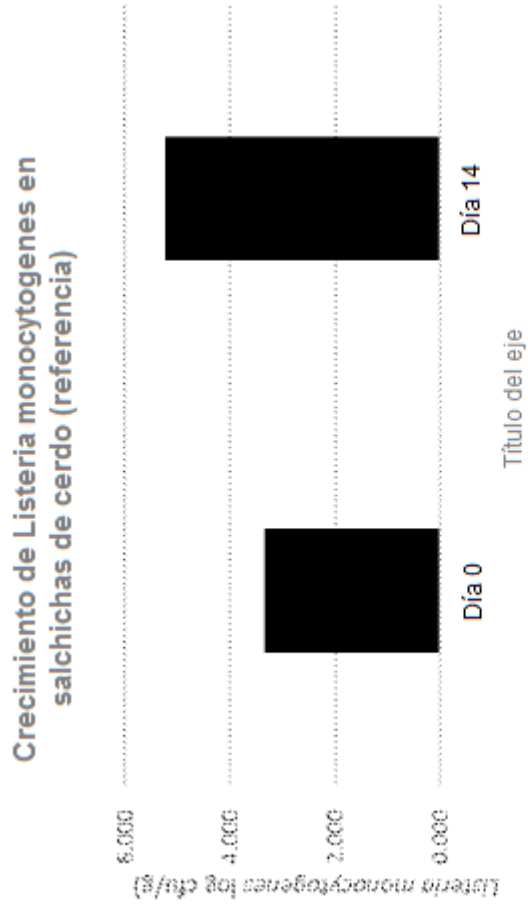


FIG. 15

Inhibición del crecimiento de *Listeria* en salchichas de cerdo por extractos combinados de R/P

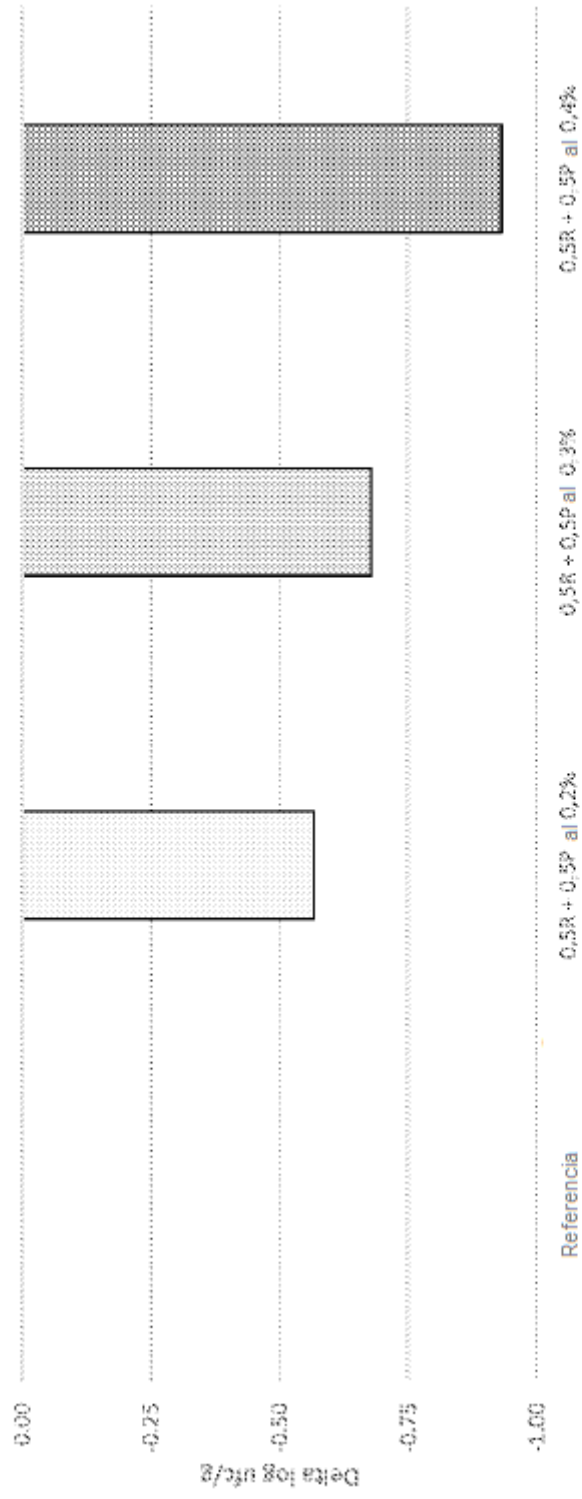


FIG. 16

Inhibición del crecimiento de *Listeria* en salchichas de cerdo por extractos combinados de R/H

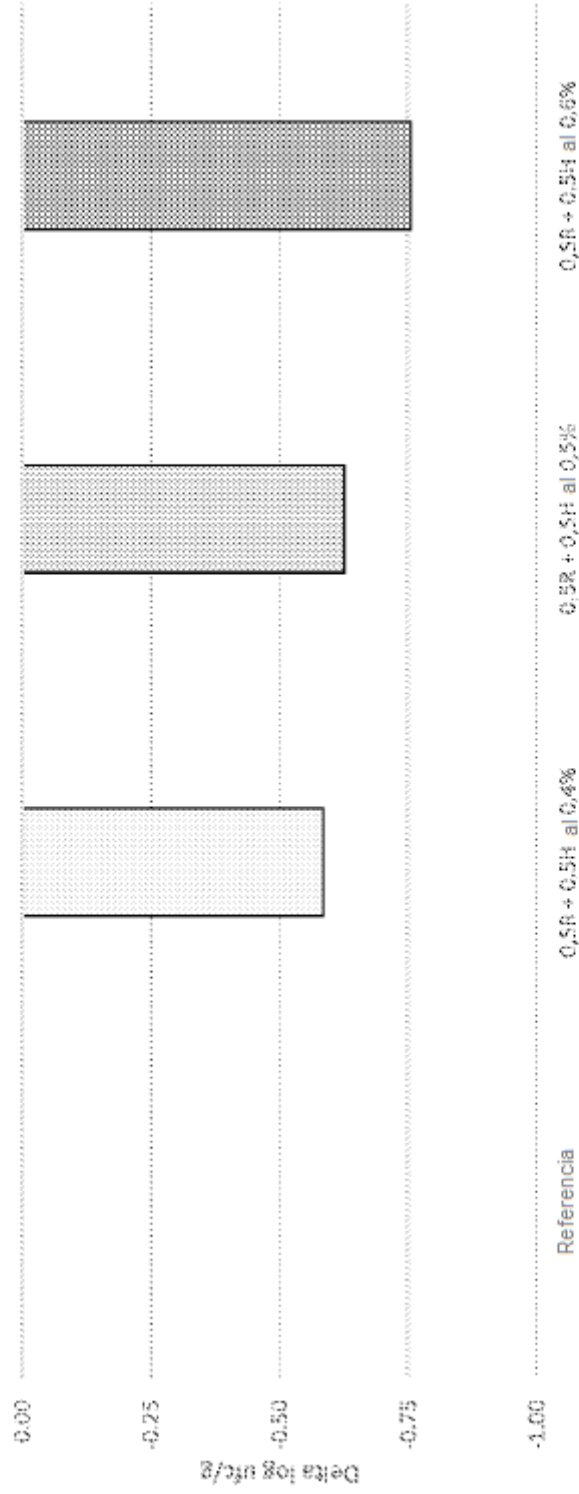


FIG. 17

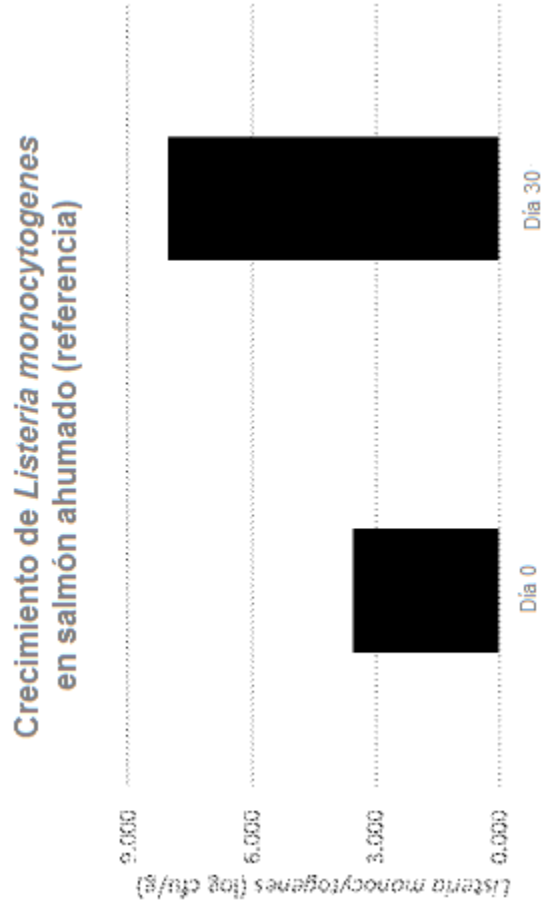


FIG. 18

Inhibición de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado
el día 30º de crecimiento

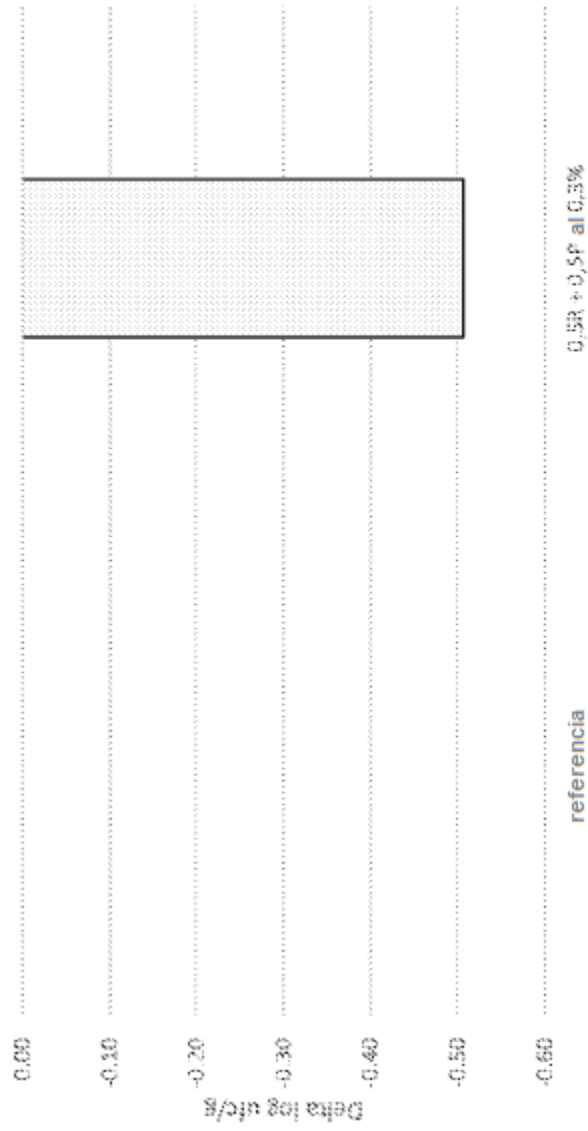


FIG.19

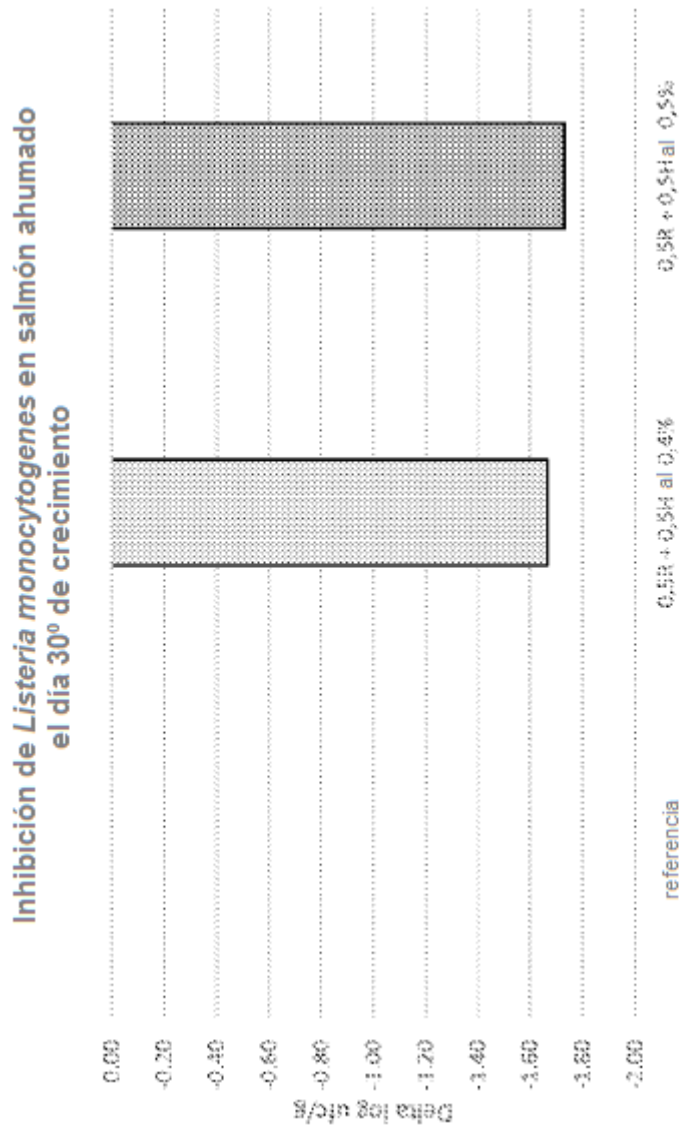


FIG.20