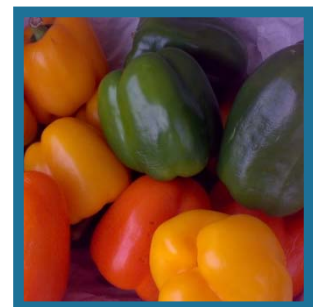
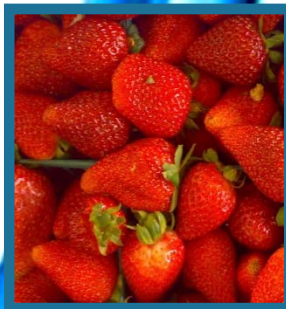
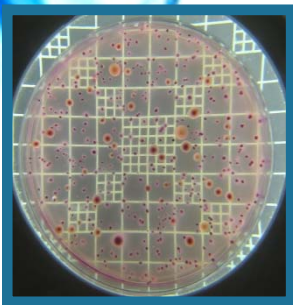


Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos





Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 3 – 1 (2009)



Cuerpo editorial

Dra. María Eugenia Bárcenas Pozos

Dra. María Teresa Jiménez Munguía

M. C. Fidel Vergara Balderas

M. C. Emma Mani López

M. C. Verónica Rodríguez Martínez



Contenido

Cuerpo editorial	i
Editorial	iv
Eficacia de diversos agentes desinfectantes en la sanitización de hortalizas frescas <i>M.O. Ramírez-Sucre</i> *, <i>A. López-Malo</i> y <i>E. Palou-García</i>	5
Modelos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana en alimentos	
<i>C.P. Coronel – Aguilera</i> *, <i>M.T. Jiménez-Munguía</i> y <i>A. López-Malo-Vigil</i>	11
Aceites esenciales: métodos de extracción	
<i>H.A. Paredo-Luna</i> *, <i>E. Palou-García</i> y <i>A. López-Malo</i>	24
Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) y canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	
<i>A.I. Gómez-Sánchez</i> * y <i>A. López-Malo</i>	33
Viabilidad de <i>Lactobacillus acidophilus</i> encapsulado en matrices de alginato incorporado a helado	
<i>R. Villa-Rojas</i> *, <i>A. López-Malo</i> y <i>S.C. Beristain-Bauza</i>	46
Aplicaciones del ultrasonido en el tratamiento de alimentos	
<i>J. Gómez-Díaz</i> * y <i>A. López-Malo</i>	59
Inactivación de microorganismos por homogenización a alta presión.....	
<i>G.G. Amador-Espejo</i> * y <i>H. Ruiz-Espinosa</i>	74
Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas.....	
<i>E. Vega-Portocarrero</i> * y <i>A. López-Malo</i>	85
Extracción supercrítica de antioxidantes naturales a partir de hierbas y especias.....	
<i>L.A. Conde-Hernández</i> * y <i>J.A. Guerrero-Beltrán</i>	96

Viabilidad de un microorganismo probiótico en un producto cárnico fermentado tipo salami <i>R.I. Soto-del Castillo*</i> , <i>A. López-Malo</i> , <i>F. San Martín</i> y <i>E. Palou-García</i>	111
Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos..... <i>A.P. Porras-Loaiza*</i> y <i>A. López-Malo</i>	121



Editorial

La actividad científica y de investigación en las universidades es parte de su razón de ser. No solamente estamos comprometidos en la adquisición de conocimientos por nuestros estudiantes, sino que también es nuestra labor la creación de nuevos conocimientos y su difusión.

Uno de nuestros orgullos en la escuela de Ingeniería de la Universidad de las Américas Puebla, es el Departamento de Ingeniería Química y Alimentos; una entidad académica de reconocimiento nacional e internacional que continuamente pone en alto el nombre de nuestra institución, y que sobresale no solamente por la cantidad, sino también por la calidad de sus proyectos de investigación.

En nuestros Seminarios de Investigación, con la asesoría y el apoyo de investigadores de nivel internacional, nuestros estudiantes de la Maestría y el Doctorado en Ciencia de Alimentos llevan a cabo su trabajo de tesis, cuyos resultados son publicados en esta revista, para la difusión de conocimientos en la comunidad.

Quisiera aprovechar este espacio para agradecer a los colegas investigadores que dedican gran parte de su tiempo en la asesoría a estos jóvenes investigadores, así como al cuerpo editorial por su entusiasmo en la edición y publicación de la revista. Estamos muy orgullosos de la calidad de los artículos que publicamos en “Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos”, y esperamos incrementar su publicación, difusión e impacto.

Sinceramente,

Dr. Gerardo Ayala San Martín

Decano

Escuela de Ingeniería

Universidad de las Américas Puebla



Eficacia de diversos agentes desinfectantes en la sanitización de hortalizas frescas

M. O. Ramírez-Sucre*, A. López-Malo y E. Palou-García

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla,
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

La sanitización es una opción importante para disminuir la carga microbiana presente en los alimentos. Por lo que se desarrolló una mezcla eficaz para la sanitización de hortalizas frescas. Se determinó el número de microorganismos mesófilos aerobios y coliformes totales (UFC/g) de muestras de espinacas y melones sometidos a diversos sanitizantes (ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, cloro y peróxido de hidrógeno). En espinacas las mayores reducciones fueron de 4.4 y 5.5 ciclos logarítmicos (mesófilos aerobios y coliformes totales, respectivamente). Por otro lado, en melones, las mayores reducciones fueron de 4.2 y 5.8 ciclos logarítmicos (mesófilos aerobios y coliformes totales, respectivamente). El análisis experimental mediante superficie de respuesta muestra la mezcla de 4.0 % de ácido láctico y 0.6 % de ácido acético como la más eficiente en la reducción microbiana de espinacas y la mezcla de 4.0 % de ácido láctico y 200 ppm de cloro como la más eficiente en la reducción de la población microbiana nativa de melones. Estas mezclas pueden prolongar el periodo de almacenamiento, la calidad y la seguridad alimentaria de ambas hortalizas, permitiendo elevar su precio de venta; sin embargo, el uso de sanitizantes se encuentra en función del tipo de alimento y de los microorganismos de interés.

Palabras clave: sanitización, melón, espinacas, hortalizas, coliformes, mesófilos.

Abstract

Sanitation is an important option for reducing the native microbial population in food. Therefore an effective mixture for the sanitization of fresh vegetables was developed. Counts of total coliforms and aerobic mesophilic microorganisms (CFU/g) were determined in samples of spinach and cantaloupes treated with selected sanitizers (citric acid, acetic acid, lactic acid, chlorine and hydrogen peroxide). In spinach the most significant reductions were as 4.4 and 5.5 log (aerobic mesophiles and total coliform, respectively). Furthermore, in cantaloupes, the largest reductions were as 4.2 and 5.8 log units (aerobic mesophiles and total coliforms, respectively). Experimental analysis using response surfaces demonstrated that a mixture of 4.0 % lactic acid and 0.6 % acetic acid was the most efficient in reducing the native microbial population of spinach and the mixture of 4.0% lactic acid and 200 ppm of chlorine as the most efficient in reducing the native microbial population of cantaloupes. These mixtures can extend the storage period, quality and safety of both vegetables, improving their selling price; however, the use of sanitizers is based on the type of food and on microorganisms of interest.

Keywords: sanitizers, cantaloupe, spinach, vegetables, coliforms, mesophiles.

* Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 2292000, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: manuelo.ramirezse@udlap.mx

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos son en general de origen microbiano y constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Adams y Moss, 1997; ICMSF, 1998; González et al., 2006). Más de 200 enfermedades conocidas son transmitidas a través de alimentos. En Estados Unidos cada año se presentan 76 millones de personas con enfermedades de origen alimentario (Mead et al., 1999). Por su parte, en México en el año 2002 se reportaron 3612 casos de intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano (Secretaría de Salud, 2002). México es el exportador más grande de productos de horticultura a los EE. UU. En 2005, los productos de horticultura importados de México sumaron \$6200 millones de dólares, de los cuales \$3500 millones se debieron a la importación de hortalizas frescas, excluyendo la papa (USDA-FAS, 2006). Uno de los principales factores a resolver cuando se trata de exportar productos naturales es reducir el contenido de gérmenes y bacterias (Padilla, 2001).

Por otro lado, el consumo de hortalizas es fomentado por las instituciones de salud (USDHHS, 2005), lo que ha aumentado el consumo de hortalizas frescas (Vásquez-Arroyo y Cabral-Martell, 2003) conjuntamente con brotes de enfermedades asociados con la producción de alimentos frescos.

La contaminación de hortalizas puede ocurrir en cualquier etapa de la producción al consumo (Johnston et al., 2005). Además, cada hortaliza tiene una composición y características físicas únicas y está expuesta a diferentes condiciones durante su producción, almacenamiento y distribución (NACMCF, 1999), todo lo cual puede afectar significativamente el tamaño de la población microbiana nativa de los alimentos frescos.

Varios estudios reportan las condiciones que afectan el crecimiento y la supervivencia de microorganismos en vegetales frescos (Campbell et al., 2001; Castillo et al., 2004; Kim y Beuchat, 2005) y también la efectividad de los sanitizantes en patógenos (Han et al., 2001; Kenney y Beuchat, 2002; Du et al., 2003; Rodgers et al., 2004); sin embargo, existe una gran variación en los métodos experimentales.

La sanitización consiste en la acción biocida de diferentes agentes. Agentes oxidantes, que interfieren con la síntesis de proteínas celulares; o ácidos orgánicos, que penetran a la célula provocando un efecto depresor del pH y prolongan los periodos de almacenamiento (Beuchat et al., 2001).

Debido a que los agentes sanitizantes operan por contacto, su aplicación es en sistemas que aseguren mantener dicho contacto para que la acción biocida sea efectiva (Castro, 2003). Es importante que la sanitización de alimentos sea acompañada de un lavado con agua. Esta agua debe ser de calidad potable y contener algún tipo de desinfectante, como por ejemplo cloro en bajas concentraciones (FAO, 2007), ya que el objetivo del lavado es remover la tierra, los restos de tejidos vegetales, los fluidos celulares ricos en nutrientes generados como consecuencia del corte, los residuos de pesticidas y numerosos microorganismos causantes de deterioro (Nguyen-the y Carlin, 1994). Por esto, el lavado es considerado un punto crítico de control (IFPA, 2003) en la sanitización de hortalizas frescas.

Actualmente, las espinacas forman parte de la dieta de casi todas las poblaciones del mundo y se cultivan en la mayoría de los países del planeta. Su cultivo se realiza durante todo el año y se pueden consumir frescas, cocidas o fritas. Las espinacas son una de las verduras que más habitualmente se encuentran congeladas. Sin embargo, estas

hortalizas se han asociado con distintos brotes de enfermedades causadas por la cepa de *Escherichia coli* O157: H7, y brotes de salmonelosis (FDA, 2006).

Así mismo, otra hortaliza, el melón, también ha sido asociada con los brotes de enfermedades de origen alimentario. La contaminación del producto pueden derivarse de una variedad de fuentes, incluidos el suelo, el agua, el equipo, los animales y los seres humanos (Beuchat, 1996). Además, los melones pueden contaminarse durante el cultivo, el manejo poscosecha, el empaque, el transporte, la distribución, o durante la preparación en el hogar. Durante el manejo poscosecha y empaque existe la posibilidad de que los melones sean contaminados por el equipo utilizado para el transporte, la limpieza, el empaque o por el lavado con agua (Parnell *et al.*, 2005). Así también, es probable que la transferencia de bacterias de la corteza del melón a la pulpa comestible ocurra durante el proceso de corte (Ukuku y Sapers, 2001). De ser así, se alcanzarían altos niveles de microorganismos patógenos antes de que los signos de deterioro fueran evidentes. Por lo tanto, son necesarios nuevos planteamientos para la sanitización de melones.

En el presente estudio se probó el efecto de diferentes agentes sanitizantes sobre la microflora de dos hortalizas frescas, melones y espinacas, mediante el estudio de la efectividad de sanitizantes tradicionales (cloro, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno) y mezclas de estos agentes, con el objetivo de desarrollar una mezcla de agentes sanitizantes que sea utilizada de manera eficaz en la reducción de la microflora nativa de hortalizas frescas.

Materiales y métodos

Materia prima

Dos hortalizas, melón tipo Valencia (*Cucumis melo reticulatus*) y espinacas (*Espinacea oleracea*) fueron obtenidas del mercado local y recolectadas en condiciones asépticas en bolsas estériles para muestreo (Nasco, Whirlpack, EE. UU.), por triplicado.

Pretratamiento de las hortalizas

Los melones fueron partidos a la mitad y se retiraron las semillas. Posteriormente se cortaron y se pesaron 10 g de muestra, incluyendo la pulpa y la cáscara. Por otro lado, las espinacas fueron cortadas y se pesaron 10 g de muestra, incluyendo el tallo y las hojas. Inmediatamente se realizó una inmersión de estas muestras en agua potable (200 mL) durante 1 min con agitación manual. Las muestras se dejaron secar durante 10 min para su tratamiento posterior.

Empleo de agentes sanitizantes

Una vez que las muestras de materia prima fueron preparadas se realizó el tratamiento por inmersión en soluciones de ácido cítrico al 4.0 %, ácido acético al 2.0 %, ácido láctico al 2.0 % (Hycel, México), 200 ppm de cloro (Reasol, México) o 500 ppm de peróxido de hidrógeno (Merk, Alemania), como sanitizantes, en bolsas estériles para muestreo (Nasco, Whirlpack, EE. UU.), con tiempos de contacto de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 min, preparando las soluciones al momento de llevar a cabo la sanitización.

Análisis microbiológicos

Se realizó el recuento de la carga microbiana de mesófilos aerobios de acuerdo a lo establecido en la NOM-092-SSA1 (1994) y coliformes totales de acuerdo a lo establecido en la NOM-113-SSA1 (1994), mediante la

técnica de recuento en placas de agar nutritivo y rojo bilis violeta (Merk, Alemania), respectivamente, tanto para la caracterización de la materia prima como para el agua de lavado del pretratamiento y en las muestras después de la inmersión. Los recuentos se realizaron por triplicado.

Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental siguiendo el modelo Box- Behnken, mediante el software estadístico Minitab (v. 15, Minitab Inc.), utilizando tres factores (ácido láctico, ácido acético, y cloro) y dos variables de respuesta, número de unidades formadoras de colonias de mesófilos aerobios (MA) y coliformes totales (CT) por gramo de muestra, después de 5 min de tratamiento.

Resultados y discusión

Pretratamiento

Los recuentos microbianos del agua de lavado de melón y espinacas se realizaron con el fin de tener mayor información acerca de la carga microbiana inicial en dichas hortalizas. Como se presenta en la Tabla I, se obtuvieron poblaciones similares de mesófilos aerobios en el agua de lavado de melón y de espinacas, con recuentos de hasta 106 UFC/mL.

Únicamente al cuantificar la carga de coliformes totales se obtuvieron mayores recuentos microbianos en melón, siendo superiores en 5 ciclos logarítmicos sobre los recuentos en espinacas. En otros trabajos de investigación (Izumi, 1999), el lavado con agua potable redujo los recuentos microbiológicos en aproximadamente 0.4-1.4 ciclos logarítmicos en hojas de espinacas enteras acondicionadas en ensayos de laboratorio. Mientras que a escala industrial

se han logrado reducciones de 0.3 ciclos logarítmicos en hojas de espinacas, realizando lavados con agua potable (Garg et al., 1990). Por lo que el efecto de la reducción microbiana resultante del lavado sin sanitizantes dependerá del producto.

Tabla I. Cargas microbianas del agua de lavado de melón y espinaca

Hortaliza	Microorganismo (UFC/mL)	
	Mesófilos aerobios	Coliformes totales
Melón	1.80E+06	1.04E+05
Espinacas	1.28E+06	<10

Si el agua de lavado no es apropiadamente sanitizada puede convertirse en una fuente de contaminación cruzada para cada pieza de producto que pase a través de ella (IFPA, 2003). Por lo tanto, la adición de sanitizantes al agua de lavado es un requisito esencial para mantener la seguridad de la misma. La concentración de sanitizante, el tiempo de contacto, la temperatura de la solución de lavado, la cantidad de materia orgánica, la agitación y el pH, son todos parámetros claves durante el lavado (Izumi, 1999).

Sanitización tradicional

Efecto del tipo de sanitizante. Una vez realizado el pretratamiento se llevó a cabo la aplicación de los agentes sanitizantes por inmersión de las hortalizas en soluciones de ácido láctico (0.5 %) + cloro (200 ppm); peróxido de hidrógeno (500 ppm); ácido cítrico (4.0 %); ácido láctico (4.0 %) o ácido acético (2.0 %), de acuerdo a la metodología. Posteriormente se efectuaron los recuentos de células viables tomando muestras al tiempo cero y al final del tiempo de tratamiento (5 min). Como se observa en la Tabla II, las mayores reducciones logarítmicas de microflora nativa se

obtuvieron con los tratamientos de ácido láctico (0.5 %) + cloro (200 ppm); ácido láctico (4.0 %) y ácido acético (2.0 %), para las dos hortalizas estudiadas. Es decir, para estas hortalizas los sanitizantes tradicionales más eficaces fueron dos ácidos orgánicos débiles (ácido láctico y ácido acético) y un agente oxidante fuerte (cloro).

Debido a que estos compuestos causaron importantes inactivaciones microbianas, se probaron nuevamente cuantificando el efecto del tiempo de tratamiento en la carga de microorganismos.

Tabla II. Reducción de cargas microbianas con distintos desinfectantes (5 min de tratamiento)

Agente	Reducción microbiana (ciclos logarítmicos)			
	Melón		Espinaca	
	MA ^e	CT ^f	MA ^e	CT ^f
AL ^a (0.5 %) + Cl ^b (200 ppm)	2	3	3	0
H ₂ O ₂ (500 ppm)	1	0	0	0
AC ^c -4.00%	1	0	1	1
AL ^a -4.00%	2	2	1	1
AA ^d -2.00%	1	5	1	3

^a Ácido láctico. ^b Cloro. ^c Ácido cítrico.

^d Ácido acético. ^e Mesófilos aerobios.

^f Coliformes totales.

Efecto del tiempo de tratamiento. Con los tres desinfectantes más eficaces de la parte anterior, ácido láctico (0.5 %) + cloro (200 ppm), ácido láctico (4.0%) y ácido acético (2.0%), se realizó una segunda experiencia para cuantificar la reducción microbiana con un tiempo de tratamiento de 5 min, efectuándose el recuento microbiano en cada minuto del tratamiento. Como se aprecia en la Tabla III, las mayores reducciones de la carga microbiana se obtuvieron con el ácido láctico (4.0%) para ambos tipos de

microorganismos (mesófilos aerobios y coliformes totales); el ácido acético y el ácido láctico (0.5 %) + cloro (200 ppm), también causaron reducciones importantes.

La carga microbiana nativa se redujo en función del tiempo de tratamiento debido al incremento del tiempo de contacto de la muestra con el agente sanitizante. Dicha reducción resultó más o menos importante dependiendo del tipo de hortaliza y de la carga microbiana inicial. Debido a que estos tres agentes (ácido acético al 2.0 %, ácido láctico al 4.0 % y 200 ppm de cloro + ácido láctico 0.5 %) presentaron la mayor eficacia en la sanitización y reducciones microbianas similares, sus componentes se eligieron para preparar mezclas y usarlas como agentes sanitizantes.

Tabla III. Reducciones microbianas causadas por diferentes sanitizantes, aplicados durante distintos tiempos de tratamiento

Agente	Tiempo (min)	Ciclos logarítmicos			
		Melón		Espinacas	
		MA ^d	CT ^e	MA ^d	CT ^e
AA ^c 2.00%	0	0	0	0	0
	1	0.21	0	0	0.63
	2	0.3	0	0.12	0.74
	3	0.78	0.08	1.08	2.52
	4	0.95	0.26	1.25	2.57
	5	1.05	0.37	1.35	2.82
AL ^a 4.00%	0	0	0	0	0
	1	0.51	0.32	0.11	0.5
	2	0.78	0.78	0.25	2
	3	1.07	1.56	0.48	2.33
	4	1.26	2.07	1.68	2.66
	5	1.56	2.28	1.77	3.48
Cl ^b 200 ppm	0	0	0	0	0
	1	0.26	0	0.9	0.63
+ AL ^a 0.5 %	2	0.35	0.1	1	0.74
	3	0.48	0.15	1.08	2.52
	4	0.59	0.23	1.23	2.57
	5	0.88	0.26	1.34	2.82

^a Ácido láctico. ^b Cloro. ^c Ácido acético

^d Mesófilos aerobios. ^e Coliformes totales.

Mezclas de agentes sanitizantes

Para determinar las mezclas de cloro (100 o 200 ppm), ácido láctico (2.0, 3.0 o 4.0 %) y ácido acético (1.0 o 2.0 %), que fueron los

sanitizantes con los que se obtuvieron las mayores reducciones microbianas, se elaboró un diseño experimental aplicando el modelo Box-Behnken. Dicho diseño arrojó 17 experimentos, cuyas composiciones se obtuvieron haciendo combinaciones binarias y ternarias de los tres sanitizantes. Las composiciones se presentan en la Tabla IV.

Tabla IV. Composición de las mezclas de sanitizantes probados

Mezcla	Sanitizante		
	Cl ^b (ppm)	AL ^a (%)	AA ^c (%)
1	0	2	1
2	200	2	1
3	0	4	1
4	200	4	1
5	0	3	0
6	200	3	0
7	0	3	2
8	200	3	2
9	100	2	0
10	100	4	0
11	100	2	2
12	100	4	2
13	100	3	1
14	100	3	1
15	100	3	1
16	100	3	1
17	100	3	1

^a Ácido láctico. ^b Cloro. ^c Ácido acético.

Los recuentos microbianos obtenidos después de tratar las hortalizas con las mezclas de sanitizantes (Tabla V), indicaron que en el melón la mayor reducción se logró con la mezcla 10 para mesófilos aerobios y con las mezclas 4 y 6 para la población de coliformes. Estas mezclas presentan actividad sanitizante del cloro y del ácido láctico en sus niveles altos o medios y con actividad de ácido acético nula o en su nivel más bajo.

Por otro lado, en espinacas, la mezcla 4 provocó la mayor inactivación microbiana

tanto de mesófilos aerobios como de coliformes totales. Esta mezcla presenta los niveles más altos tanto de cloro como de ácido láctico (200 ppm y 4.0 %, respectivamente) y el nivel medio de ácido acético (1.0 %). Con estos resultados se realizó el análisis estadístico del diseño experimental.

Tabla V. Reducciones microbianas logradas después de tratar las hortalizas con diferentes mezclas de sanitizantes^c (5 min de tratamiento)

Mezcla	Ciclos logarítmicos			
	Melón		Espinacas	
	MA ^a	CT ^b	MA ^a	CT ^b
1	3.21	4.34	4.21	5.45
2	1.64	4.82	4.34	5.45
3	3.77	4.82	4.16	5.45
4	3.52	5.82	4.37	5.45
5	2.6	3.67	3.81	3.97
6	3.41	5.82	3.09	3.05
7	3.23	3.62	1.47	1.81
8	2.29	3.01	1.37	2.12
9	3.61	3.59	2.21	2.97
10	4.16	4.22	3.16	5.45
11	1.62	1.4	3.07	3.32
12	0.65	1.12	1.78	3.52
13	2.75	5.75	2.97	4.82
14	2.84	4.05	3.07	3.22
15	2.43	4.27	1.24	2.52
16	2.52	3.32	1.37	2.39
17	3.43	3.71	1.44	1.96

^a Mesófilos aerobios. ^b Coliformes totales.

^c La composición de las mezclas se presenta en la Tabla IV.

Análisis estadístico del diseño

Se generaron gráficos de superficie de respuesta con diversos pares de los sanitizantes (cloro-ácido láctico, cloro-ácido acético y ácido láctico-ácido acético), para evaluar su efecto en la reducción microbiana

tanto de mesófilos aerobios como de coliformes totales.

Espinacas. Como se observa en la Figura 1, en espinacas las reducciones más importantes en la familia de microorganismos mesófilos se obtuvieron con mezclas en las que la concentración de ácido láctico fue la más alta (4.0 %) y la concentración de ácido acético estuvo en niveles bajos (0-0.5 %). De igual manera, al aumentar las concentraciones de ácido láctico, con concentraciones medias de ácido acético en el tratamiento, se obtuvieron menores cargas microbianas de coliformes totales.

A pesar de esperarse una mayor reducción logarítmica en ambas respuestas (reducciones de mesófilos aerobios y coliformes totales) al aumentar la concentración de los tres desinfectantes, el análisis estadístico señala que la mezcla más eficaz para la reducción microbiana conjunta de mesófilos aerobios y de coliformes totales es una mezcla binaria de 4.0% de ácido láctico con 0.6% de ácido acético y cuyas reducciones máximas alcanzadas resultan de 4.4 y 5.5 ciclos logarítmicos de microorganismos mesófilos aerobios y coliformes totales, respectivamente.

Entre algunos otros estudios realizados sobre la sanitización de hortalizas frescas similares, se encuentra el realizado por Pirovanni *et al.* (2000) en hojas de espinacas; estos autores señalan que la mayor reducción de *Salmonella* fue de 1.3 ciclos logarítmicos mediante un tratamiento por inmersión en una solución de 125 ppm de cloro durante 8 min. Según los resultados, la desinfección con cloro pudo reducir la población de *Salmonella* hadar sin eliminarla por completo. Sin embargo, otros estudios señalan que al sumergir hojas de espinacas en una mezcla de tres cepas del microorganismo patógeno *Escherichia coli* O157:H7, durante 3 min, con dos niveles

diferentes de solución de hipoclorito de sodio (300 y 600 ppm), no se consiguieron reducciones significativas en la población de la bacteria (Niemira, 2007).

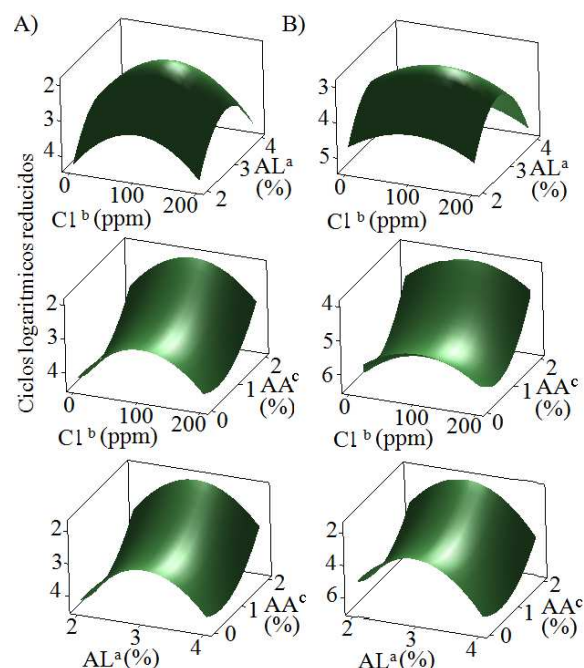


Figura 1. Superficies de respuesta para la reducción microbiana de A) mesófilos aerobios y B) coliformes totales, con pares de sanitizantes aplicados: a ácido láctico, b cloro y c ácido acético, en espinacas

Melón. Como se observa en la Figura 2 para melón, las reducciones más importantes en la familia de microorganismos mesófilos se obtuvieron con mezclas en las que la concentración de ácido láctico y la concentración de cloro fueron las más altas

(4.0 % y 200 ppm, respectivamente). El mismo comportamiento fue observado para las bacterias coliformes totales.

De acuerdo al análisis estadístico, el melón presentó las mayores reducciones de microflora nativa en su superficie con la combinación binaria de 200 ppm de cloro y 4.0% de ácido láctico. Las reducciones

máximas alcanzadas fueron de 4.2 ciclos logarítmicos para mesófilos aerobios y de 5.8 para microorganismos coliformes totales.

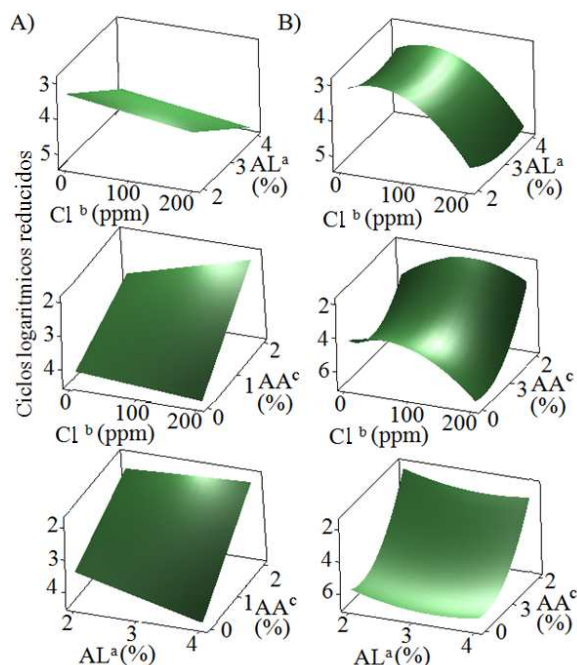


Figura 2. Superficies de respuesta para la reducción microbiana de A) mesófilos aerobios y B) coliformes totales, con pares de sanitizantes aplicados: a ácido láctico, b cloro y c ácido acético, en melón

Estudios realizados anteriormente indican que melones desinfectados con soluciones de 200 ppm de cloro o 2.5% de peróxido de hidrógeno durante 2 min, causaron reducciones microbianas de 2.6 ciclos logarítmicos en la superficie del melón (Ukuku, 2005). En otro estudio (Barak et al., 2003), la inmersión en una solución de 150 ppm de hipoclorito de sodio redujo el 90 % de la carga inicial de las bacterias en la superficie de melón. Por otro lado, Parnell et al. (2005) lograron reducciones de 1.8 ciclos logarítmicos después de la inmersión de melón durante 60 s en una solución de 200 ppm de cloro. Sin embargo, los melones sumergidos en 20 ppm de cloro a 10 °C durante 20 min, no presentaron una

reducción significativa de la población microbiana (Fan et al., 2008). Por lo que debe ser reconocido que cada tipo de fruta u hortaliza tiene una composición y características físicas únicas y está expuesta a diferentes condiciones durante su producción, almacenamiento y distribución (NACMCF, 1999).

Cabe mencionar que entre los factores que limitan la eficacia de los tratamientos sanitizantes están la adherencia bacteriana a la superficie del producto, la presencia de bacterias en sitios inaccesibles, la formación de biofilms resistentes y la internalización de microorganismos en el producto (Salveit, 2001).

Conclusiones

Las mezclas de sanitizantes tienen un mayor efecto de reducción en la población microbiana nativa de los melones y las espinacas que los sanitizantes utilizados individualmente, lo que sugiere un probable efecto sinérgico.

Debido a las características físicas y químicas específicas de cada tipo de hortaliza, la eficacia de los sanitizantes y las mezclas de éstos se encuentra en función de dichas características y de los microorganismos de interés de los que se busca reducir la población.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto TAMU por el financiamiento de esta investigación. M.O. Ramírez-Sucre agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento para la culminación de sus estudios de maestría.

Referencias

- Adams, M. y Moss, M. 1997. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 171-182
- Barak, C. J., Chue, B. y Mills, D. 2003. Recovery and sanitation of surface bacteria on cantaloupes. *Journal of Food Protection*. 66(10):1805-1810.
- Beuchat, L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*. 59:204-216.
- Beuchat, L., Farber, J., Garrett, E., Harris, L., Parish, M., Suslow, T. y Busta, F. 2001. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *Journal of Food Protection*. 64:1079-1084.
- Campbell, J., Reporter, R., Abbott, S., Farrar, J., Brandl, M., Mandrell, M. y Werner, S. 2001. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. *Journal of Infectious Disease*. 183:984-987.
- Castillo, A., Mercado, I., Lucia, M., Martínez-Ruiz, Y., Ponce de León, J., Murano, E., y Acuff, G. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. *Journal of Food Protection*. 67:713-720.
- Castro, E. 2003. Principios de control microbiológico con oxidantes. <http://www.agualatinoamerica.com/NewsView.cfm?pkArticleID=115>, accesada 01/03/2008.
- Du, J., Han, Y. y Linton, R. 2003. Inactivation by chlorine dioxide gas (ClO₂) of *Listeria monocytogenes* spotted onto different apple surfaces. *Journal of Food Microbiology*. 19:481-490.
- Fan, X., Annous, B. A., Beaulieu, J. C. y Sites, J. E. 2008. Effect of hot water surface pasteurization of whole fruit on shelf life and quality of fresh-cut cantaloupe. *Journal of Food Science*. 73(3):M91-M98(1).
- FAO. 2007. Manual para el curso sobre procesamiento de frutas y hortalizas a pequeña escala en Perú. Aspectos microbiológicos. Food and Agriculture Organization of the United States. <http://www.fao.org/docrep/x5063S/x5063S04.htm#5.6%20La%20calidad>, accesada 01/06/2008.
- FDA. 2006. Statement on foodborne *E. coli* O157:H7 outbreak in spinach. <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01453.html>, accesada 27/05/2008.
- Garg, N., Churey, J. y Splittstoesser, D. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*. 53:701-703.
- González, A., Camargo, N., Castellanos, P., González, G., Perdomo, M., Grillo, M. y Romero, A. 2006. Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxiinfecciones alimentarias. <http://www.cepis.ops-oms.org/bvstox/e/fulltext/guiaveta/guiaveta.pdf>, accesada 23/10/2008.
- Han, Y., Linton, R., Nielsen, S. y Nelson, P. 2001. Reduction of *Listeria monocytogenes* on green peppers (*Capsicum annuum* L.) by gaseous and aqueous chlorine dioxide and water washing and its growth at 7°C. *Journal of Food Protection*. 64:1730-1738.
- ICMSF. 1998. Microorganismos de los Alimentos. Características de los Patógenos Microbianos. 1a edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 612 p.
- IFPA. 2003. Guía de seguridad alimentaria para la industria de productos vegetales frescos cortados. En: Gil, M., y Gorny, J. (Eds.), Asociación Internacional de Productores de Vegetales Frescos Cortados. 251. Virginia, EE. UU. 251 p.
- Izumi H. 1999. Electrolyzed water as a disinfectant for freshcut vegetables. *Journal of Food Science and Technology*. 64:536-539.
- Johnston, L., Jaykus, L., Moll, D., Martínez, M., Anciso, J., Mora, B. y Moe, C. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*. 68:1840-1847.
- Kenney, S. y Beuchat, L. 2002. Comparison of aqueous commercial cleaners for effectiveness in removing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella muenchen* from the surface of apples. *Journal of Food Microbiology*. 74:47-55.
- Kim, H. y Beuchat, L. 2005. Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature. *Journal of Food Protection*. 68:2541-2552.
- Mead, P., Slutsker, L., Diert, V., McCaig, L., Bresee, J. y Shapiro, C. 1999. Food-related illness and

- death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 5:607-25.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1999. Microbial safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Journal of Food Control*. 10:117-143.
- Nguyen-the, C. y Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 34:371-401.
- Niemira, B. 2007. Relative efficacy of sodium hypochlorite wash versus irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of romaine lettuce and baby spinach. *Journal of Food Protection*. 70(11):2526-2532.
- NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. México D.F.
- NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Diario Oficial de la Federación. México D.F.
- Padilla, M. 2001. Reducción microbiana. Investigación y desarrollo. Periodismo de Ciencia y Tecnología. <http://www.invdes.com.mx/antiores/Noviembre2001/htm/microbio.html>, accesada 24/09/2005.
- Parnell, T.L., Harris, L. J. y Suslow, T. V. 2005. Reducing *Salmonella* on cantaloupes and honeydew melons using wash practices applicable to postharvest handling, foodservice, and consumer preparation. *International Journal of Food Microbiology*. 99(1):59-70.
- Pirovanni M., Güemes D., Di Pentima J. y Tessi M. 2000. Survival of *Salmonella* hadar after washing-disinfection of minimally processed spinach. *Letters in Applied Microbiology* 31:143-148.
- Rodgers, S., Cash, J., Siddiqui, M. y Ryser, E. 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries and cantaloupe. *Journal of Food Protection*. 67:721-731.
- Salveit G. 2001. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biothecnology*. 39(4):305-311.
- Secretaría de Salud. 2002. Sistema Nacional de Información en Salud <http://sinais.salud.gob.mx/publicaciones/publicaciones.htm#>, accesada 25/05/2004.
- Ukuku, D. 2005. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. *Journal of Food Microbiology*. 23(3):289-293.
- Ukuku, D.O. y Sapers, G.M. 2001. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella stanley* attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. *Journal of Food Protection*. 64:1286– 1291.
- US. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. FAS Agricultural import commodity aggregations. 2006. <http://www.fas.usda.gov/ustrade/USTImFAS.asp?QI=> , accesada 11/05/2007.
- US. Department of Health and Human Services. US. Department of Agriculture. 2005. Dietary guidelines for Americans. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/pdf/DGA2005.pdf>, accesada 14/01/2006.
- Vásquez-Arroyo, J. y Cabral-Martell, A. 2003. La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. <http://www.fao.org/DOCREP/003/Y0600M/y0600m02.htm>, accesada 25/11/2004.



Modelos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana en alimentos

C. P. Coronel – Aguilera^{*}, M.T. Jiménez – Munguía y A. López-Malo – Vigil

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

Tradicionalmente, la eficacia de los procesos de preservación ha sido evaluada con base en la suposición de que la muerte microbiana sigue la cinética de primer orden. Este criterio, el cual ha sido de gran utilidad en microbiología, no siempre es aplicable a la inactivación/inhibición microbiana ya que no todas estas curvas de inactivación microbiana siguen una cinética de primer orden. Es por esto que una variedad de modelos alternativos han sido desarrollados para describir curvas de supervivencia semi-logarítmicas. Varios autores han reportado que la distribución de Fermi y la de Weibull describen satisfactoriamente curvas de supervivencia no lineales de esporas y células microbianas. Estos modelos son adecuados para curvas que presentan concavidades hacia abajo y/o concavidades hacia arriba, sin el empleo de los tradicionales valores D y z , que requieren la aproximación lineal. Estos modelos predictivos de inactivación permiten cuantificar la respuesta microbiana en tratamientos con agentes letales convencionales o no convencionales y combinados. Este artículo presenta una revisión acerca de los modelos de cinética de primer orden, de distribución de Fermi y Weibull, así como algunas ventajas y desventajas de su aplicación.

Palabras clave: *Sobrevivencia microbiana, modelos de inactivación, cinética de primer orden, distribución de Fermi, distribución de Weibull.*

Abstract

Traditionally, the efficacy of preservation processes has been evaluated with the basis of the assumption that microbial mortality follows a first-order kinetics. This hypothesis, which has been of great utility in microbiology, not always is applicable to the microbial inactivation/inhibition because not all of these microbial inactivation curves follow first order kinetics. This is why a variety of alternative models has been developed to describe semilogarithmic survival curves. Several authors have reported that Fermi's distribution and Weibull's distribution describe satisfactorily non linear survival curves of microbial cells and bacterial spores. These models are suitable for downward concavity curves, as well as for upward concavity curves, without the use of the traditional D and z values, which require linear approximation. These predictive inactivation models allow to quantify the microbial response in treatments with conventional/not conventional lethal agents or in combination. This article presents a review of the models of first order kinetics, Fermi's distribution and Weibull's distribution, and it's advantages and disadvantages of their application as well.

Keywords: *Microbial survival kinetics, inactivation models, first order kinetics, Fermi's distribution, Weibull's distribution.*

^{*} Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: claudiap.coronela@udlap.mx

Introducción

En la industria de alimentos, la introducción de cualquier tecnología alternativa o la combinación de varias tecnologías tradicionales y no tradicionales, así como la optimización de métodos tradicionales para el procesamiento de alimentos, requieren de datos científicos acerca de la respuesta microbiana. En particular, modelos y parámetros cinéticos son esenciales para desarrollar procesos de preservación de alimentos que garanticen la inocuidad. Estos parámetros también permiten comparar la habilidad de distintos procesos tecnológicos para reducir poblaciones microbianas. No hay duda de que la microbiología cuantitativa es uno de los enfoques más útiles, no sólo en la determinación del impacto microbiológico de diferentes pasos asociados con la producción, la distribución y la venta de un alimento, sino también en la determinación de condiciones óptimas para muchos procesos de conservación. La microbiología predictiva proporciona herramientas para comparar el impacto de diferentes factores y dosis aplicada sobre la reducción de una población microbiana, siendo una ayuda para entender el comportamiento de sistemas biológicos (Alzamora *et al.*, 2008).

Actualmente existen diversos modelos matemáticos utilizados para evaluar los procesos de conservación en alimentos, al aplicar diferentes factores, dentro de los cuales el más utilizado por los investigadores es la cinética de primer orden. Esta cinética se basa en que las curvas de supervivencia de células y esporas microbianas están regidas por una relación lineal entre el logaritmo decimal del número de microorganismos sobrevivientes y el tiempo de tratamiento a una temperatura dada. Sin embargo, existen curvas de supervivencia microbiana que no siguen esta tendencia lineal. Debido a las desviaciones de la linealidad (concavidades) que pueden presentar las cinéticas de

inactivación se puede ocasionar un sobreprocesamiento o subprocesamiento, ya que los parámetros de dichos procesos convencionalmente se aplican a partir de la cinética de primer orden y haciendo referencia a un microorganismo en particular. La dificultad para explicar cada desviación de la linealidad de dichas cinéticas ha ocasionado que varios autores desarrollen otros modelos cinéticos que sean compatibles con las formas reales de las curvas de supervivencia (Whiting, 1995; Körmendy y Körmendy, 1997; Peleg y Pechina, 2000; Alzamora *et al.*, 2008).

Un punto de vista alternativo consiste en que la curva de supervivencia no debería ser tratada en el término cinético absoluto, sino como una forma acumulativa de una distribución temporal de eventos letales. Estos representan las diferentes resistencias de la población expuesta o tratada al espectro del agente letal. Según este punto de vista, las diferentes formas de las curvas de supervivencia son una manifestación de las propiedades de la distribución como pueden ser su mediana, moda, desviación estándar, sesgo, entre otros. Los cambios de forma que ocurren al ir cambiando las condiciones externas (la temperatura, la concentración de agentes antimicrobianos, el pH), son interpretados como cambios que se reflejan en los parámetros de la distribución (Peleg y Pechina, 2000; Couvert *et al.*, 2005).

Algunos modelos matemáticos relativamente simples que permiten la cuantificación de los efectos de varios agentes letales para la inactivación microbiana y su uso para el procesamiento de alimentos son por ejemplo el modelo de Fermi y de Weibull. Sin embargo, existe la necesidad de mayor investigación para avanzar en el entendimiento de la cinética de inactivación microbiana y los modelos para curvas de supervivencia no lineales (Heldman y Newsome, 2003).

En esta revisión se presentan algunos modelos matemáticos para la descripción de curvas de supervivencia microbiana en alimentos, como son: la cinética de primer orden, la distribución de Fermi y la de Weibull.

Revisión bibliográfica

Curvas de respuesta a la dosis

Una curva de respuesta a la dosis consiste en una gráfica que describe la relación entre el número o la fracción de microorganismos sobrevivientes y la dosis de un agente letal a la cual han sido expuestos. La dosis es expresada en unidades del factor a evaluar como tiempo, partes por millón, rads, intensidad de un campo eléctrico, etc. (Peleg, 2006). Las curvas de respuesta a la dosis tienen típicamente una forma sigmoidea, caracterizada por una región marginal de inhibición o letalidad casi imperceptible, seguida de una región claramente lineal, representando un decaimiento exponencial. Este comportamiento tradicionalmente ha sido separado en dos regiones, una con efecto marginal (o ningún efecto), a bajas intensidades de exposición del factor de preservación y una segunda región con un comportamiento lineal (después de una transformación logarítmica), que es modelado por la cinética de primer orden. Un enfoque alternativo para modelar la respuesta a la dosis microbiana es el de considerarla continua para el rango entero del factor de preservación aplicado, sin cambios abruptos de la cinética de respuesta, pero con transición gradual a partir del efecto marginal (o no efecto) a intensidades relativamente bajas hasta efectos inhibitorios o letales en altas intensidades del factor de preservación. La población microbiana decae como resultado de la exposición a agentes letales (por ejemplo, alta temperatura, dosis de

irradiación, tratamientos con altas presiones), y pueden ser descritas por la función de Fermi (López-Malo *et al.*, 2002), la distribución de Weibull, la cinética de primer orden, entre otros modelos.

La adquisición de datos para aclarar las interacciones de múltiples variables asociadas con sistemas de alimentos ha estado en proceso durante varias décadas, particularmente para determinar cómo la actividad antimicrobiana es afectada por otros parámetros (López-Malo *et al.*, 2002). El tratamiento matemático de la curva de respuesta a la dosis es muy similar a las de las curvas de supervivencia, pero el tiempo de exposición es sustituido por la dosis administrada. A altas dosis de un agente letal se puede causar la mortalidad casi instantánea de la población microbiana expuesta, por el contrario con dosis bajas podría tenerse un efecto retrasado. La diferencia desde el punto de vista de modelado, radica en que, en el primer caso (dosis altas), el tiempo no es el factor primario, pero en el segundo (dosis bajas) si lo es (Peleg, 2006).

a. Cinética de primer orden

En inactivación térmica o no térmica de microorganismos, por lo general cuatro tipos comunes de curvas de supervivencia semi-logarítmicas pueden encontrarse (Figura 1): curvas lineales (inactivación de primer orden), curvas con hombro o período inicial lag, curvas con una cola (o curvas bifásicas) y curvas sigmoideas (Alzamora *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, la inactivación microbiana ha sido considerada un proceso que sigue la cinética de primer orden (Figura 1c), suponiendo que las células o esporas tienen idéntica resistencia a un agente letal y cada microorganismo tiene la misma

probabilidad de morir (Alzamora *et al.*, 2008). Siguiendo este enfoque mecanístico, la ecuación propuesta por Chick (1908) ha sido usada extensamente para calcular la esterilidad en métodos térmicos de preservación:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -kN(t) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, $N(t)$ es el número de células al tiempo t , y k es la constante de velocidad de inactivación (Alzamora *et al.*, 2008).

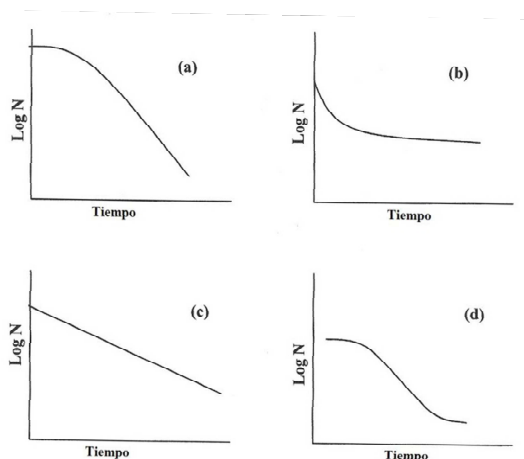


Fig. 1. Diferentes curvas de inhibición/inactivación: a) con hombro, b) con cola, c) logarítmica lineal, d) sigmoidea (Adaptada de Alzamora *et al.*, 2008).

El concepto conocido como el tiempo de reducción decimal, o valor D , se derivó de esta ecuación, después de su integración y transformación logarítmica:

$$\log \left(\frac{N_0}{N(t)} \right) = \frac{t}{D} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde, N_0 es el número inicial de células, $N(t)$ es el número de células al tiempo t , donde $D=2.303/k$. Esta ecuación puede expresarse en la forma más familiar:

$$\log N(t) = \log N_0 - t/D \quad (\text{Ec. 3})$$

La dependencia de la temperatura en el valor D , es expresada usando el valor de z , es decir, el aumento de la temperatura que reduciría el tiempo de reducción decimal por un factor de 10 (Alzamora *et al.*, 2008).

b. Modelo de distribución de Fermi

Este modelo supone que la curva de respuesta a la dosis de un microorganismo individual, i , es una función escalón $S_i(X)$, donde X es la intensidad del agente letal en las unidades pertinentes y X_{ci} es el nivel en el cual un microorganismo es destruido (Peleg, 2006):

Si $X \leq X_{ci}$, entonces

$$S_i(X) = 1 \text{ o } \log S_i(X) = 0$$

Y si $X > X_{ci}$, entonces

$$S_i(X) = 0 \text{ o } \log S_i(X) \rightarrow -\infty$$

(Ec. 4)

Según esta definición, X_{ci} es una medida de la resistencia o la sensibilidad del microorganismo al agente letal. A mayor X_{ci} , más tolerante es el microorganismo; a menor X_{ci} , más susceptible es el microorganismo. La curva de respuesta a la dosis de una población microbiana $S(X)$, compuesta de individuos con resistencias diferentes de X_{ci} , se expresa como:

$$S(X) = \sum S_i(X) \Delta\phi_i \quad (\text{Ec. 5})$$

donde $\Delta\phi_i$ es la fracción de microorganismos, o esporas, que sucumben a la misma dosis letal, $\sum(\Delta\phi_i) = 1$ (Peleg, 2006).

Cuando la población microbiana es suficientemente grande y su espectro de resistencia es suficientemente denso, la ecuación 5 puede ser aproximada por una expresión basada en una distribución paramétrica, que describe el espectro de resistencia o sensibilidad del microorganismo, definido en términos de los niveles de dosis de los agentes que causan su mortalidad (Fig. 2). La distribución de Fermi se puede expresar entonces como:

$$S(X) = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{X - X_c}{k}\right)} \quad (\text{Ec.6})$$

donde k es una constante representando la extensión de la distribución y X_c es la moda y mediana para distribuciones normales sin sesgo. En la ecuación 6, cuando k es grande en relación con $X - X_c$, la distribución es angosta; por lo contrario cuando k es pequeña, la distribución es amplia. De tal forma, la distribución de Fermi es siempre simétrica (Peleg, 2006).

La función de distribución de Fermi es continua, por lo tanto, ésta puede ser ajustada por medio de procedimientos de regresión estándar no lineales aún para las curvas de respuesta a la dosis con mucha pendiente. Sin embargo, debido a que la magnitud de k tiene poca importancia, especialmente cuando datos experimentales en y cerca de X_c no están disponibles, sería prudente fijar el valor de k por adelantado, dejando a X_c como único parámetro ajustable para ser determinado por la regresión (Peleg, 2006). El uso particular de la función de Fermi es que sus constantes (X_c y k) pueden ser directamente relacionados con la forma de la curva de supervivencia, lo que hace posible la comparación entre microorganismos o la evaluación de la intensidad del factor que determina la

supervivencia microbiana (Alzamora *et al.*, 2008).

Las curvas de respuesta a la dosis también pueden ser descritas por la distribución de Weibull que a continuación se describe.

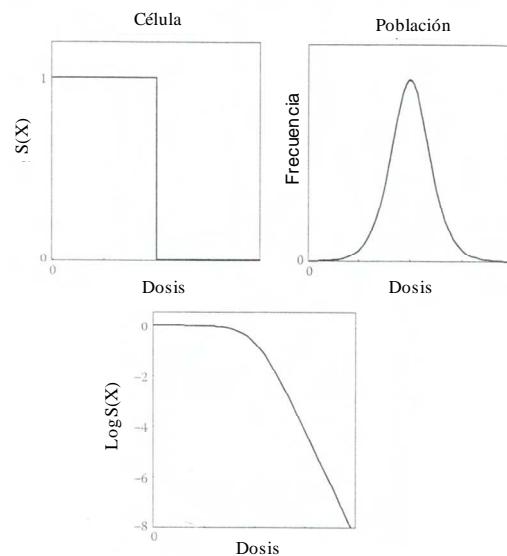


Fig. 2. Vista esquemática de la curva de respuesta a la dosis de un microorganismo descrito por la función de Fermi (arriba izquierda), la distribución de las dosis letales a las cuales individuos de una población sucumben (arriba derecha), y la correspondiente curva de respuesta a la dosis (abajo) (Adaptada de Peleg, 2006).

c. Modelo de distribución de Weibull

La función de distribución de Weibull toma en consideración la variación biológica de una población de microorganismos y es usada para describir el espectro de las resistencias de dicha población a un agente letal en diferentes condiciones (Mafart *et al.*, 2002; Alzamora *et al.*, 2008). Las principales ventajas del modelo basado en la distribución de Weibull son su simplicidad y su capacidad de modelar las curvas de supervivencia que son lineales y aquellas que contienen hombro o regiones con cola (Peleg *et al.*, 1997; Peleg y Cole,

1998; Peleg, 1999; Peleg y Pechina, 2000; Mafart *et al.*, 2002). Con los parámetros apropiados, la función de distribución de Weibull puede explicar distribuciones claramente sesgadas y distribuciones casi absolutamente simétricas (Mafart *et al.*, 2002; Couvert *et al.*, 2005; Peleg, 2006).

Una curva de respuesta a la dosis de una población microbiana, que refleja un espectro de resistencias o sensibilidades que tiene una distribución de Weibull tendría la forma:

$$S(X) = (N/N_o) = \exp(-bX^n) \quad (\text{Ec.7})$$

donde, $S(X)$ es la fracción de microorganismos sobrevivientes; N_o es el número inicial de células y N el número de células al tiempo t ; b y n son constantes, los cuales pueden ser obtenidos empleando una técnica de regresión no lineal; $\beta = 1/b$ como el factor de posición de la distribución y n como el factor de forma. (Guerrero *et al.*, 2004; Peleg, 2006).

Peleg y Cole (1998) escribieron este modelo en la siguiente forma de logaritmo decimal:

$$\log \frac{N}{N_o} = -bX^n \quad (\text{Ec. 8})$$

La moda de la distribución, X_m , es

$$X_m = \left(\frac{n-1}{nb} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Ec. 9})$$

Su mediana es:

$$\bar{X} = \frac{\Gamma\left(\frac{n+1}{n}\right)}{b^{\frac{1}{n}}} \quad (\text{Ec. 10})$$

Y su varianza es:

$$\sigma_x^2 = \frac{\Gamma\left(\frac{n+2}{n}\right) - \left[\Gamma\left(\frac{n+1}{n}\right)\right]^2}{b^{\frac{2}{n}}} \quad (\text{Ec. 11})$$

donde Γ es la función gamma (Peleg, 2006).

El coeficiente de sesgo (oblicuidad), v_1 , está dado por:

$$v_1 = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}} \quad (\text{Ec. 12})$$

donde $\mu_3 = \Gamma(1 + 2/n)/b^{3/2}$ y $\mu_2 = \Gamma(1 + 2/n)/b^{2/n}$ (Peleg, 2006).

La moda, X_m , representa el tiempo de tratamiento al cual la mayoría de la población muere o se inactiva. La mediana, \bar{X} , corresponde al tiempo de inactivación promedio. El coeficiente de sesgo, v_1 , representa el sesgo de la distribución (Alzamora *et al.*, 2008).

Cuando curvas de respuesta a la dosis son ajustadas con la ecuación 7 como modelo, se espera que la n adquiera valores del orden de 1.5 a 5. Por ejemplo, si $n > 1$, indica la existencia de un pico de frecuencia (moda) en algún sitio en medio del rango de la dosis aplicada; por consiguiente, el valor de b correspondiente podría tener un valor numérico muy pequeño. Por ejemplo, si la distribución no es demasiado sesgada y tiene una dosis promedio del orden de 25 unidades arbitrarias y un factor de forma $n=3$, la b estará sobre el orden de 10^{-5} en las unidades correspondientes. Tales valores, especialmente cuando se combina con una n de número no entero, el modelo es muy poco atractivo para ser presentado

en su forma original. Sin embargo, la conversión de sus parámetros b y n en promedio, moda, varianza o la desviación estándar, y un coeficiente de sesgo (Ec. 9-12) facilitaría enormemente la comparación entre diferentes organismos. Esto también puede ser usado para cuantificar la influencia de condiciones de crecimiento u otros factores sobre el mismo organismo (Peleg, 2006).

De acuerdo con el modelo (Ec. 8), la gráfica $\log S(X)$ vs t presenta concavidad hacia abajo siempre que $n > 1$ y una concavidad hacia arriba siempre que $n < 1$; mientras que cuando $n = 1$ la curva de supervivencia es lineal y la distribución de Weibull se reduce a una distribución exponencial. Un coeficiente de sesgo $v_1 > 1$ indica que la curva es sesgada a la derecha, mientras que $v_1 < 1$ indica que está sesgada a la izquierda; y una distribución con un valor de $v_1 = 1$ indica que ésta es simétrica (Alzamora *et al.*, 2008).

Diferentes formas de este modelo han sido reportadas en la literatura (Mafart *et al.*, 2002, van Boekel, 2002); sin embargo la forma logarítmica decimal (ecuación 13), la cual es similar a la ecuación 3, parece ser más apropiada para describir curvas de supervivencia semi-logarítmicas:

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (\text{Ec. 13})$$

donde δ es el primer tiempo de reducción que conlleva a la reducción de la décima parte de la población sobreviviente y p es el parámetro de forma (n del modelo de Weibull). Para el caso tradicional, cuando la curva de supervivencia es de primer orden, la n es igual a uno y el parámetro δ corresponde al valor clásico D . Este

sencillo modelo puede ser considerado como una extensión de la ecuación de primer orden convencional. Como el valor de D , la influencia de la temperatura de calentamiento sobre el valor δ conduce a una relación logarítmica lineal. De la misma manera que con la cinética de primer orden, el valor clásico de z puede ser evaluado (Mafart *et al.*, 2002; Couvert *et al.*, 2005).

Aplicación de los modelos

La aplicación del modelo de cinética de primer orden en curvas de respuesta a la dosis ha dominado el campo de la microbiología cuantitativa por muchos años. El concepto del valor D ha sido utilizado en procesos de conservación térmicos así como no térmicos. El objetivo de investigar la dependencia de la temperatura en inactivación térmica es para poder calcular el tratamiento necesario en combinaciones tiempo-temperatura en la pasteurización o esterilización de alimentos (Mafart *et al.*, 2002). Por ejemplo, para tratamientos de pasteurización Jay (1992) reporta valores de D de 0.20-2.20 min a 66°C para *Staphylococcus aureus* y D de 0.50-0.60 min a 66°C para *Coxiella burnetti*.

El concepto tradicional de $12D$, que significa la reducción de 12 ciclos logarítmicos del número inicial de microorganismos, es considerado suficiente para el procesamiento de los alimentos. El valor D se vuelve problemático cuando curvas de supervivencia semi-logarítmicas experimentalmente determinadas son claramente no lineales. La explicación común para hombros y colas en las curvas de supervivencia ha sido el considerar la presencia de sub-poblaciones de diferente resistencia, cada uno con su propia cinética de inactivación de primer orden (Peleg y Cole, 1998; Peleg y Pechina, 2000; Mafart *et al.*, 2002; Alzamora *et al.*, 2008).

En la figura 3 se muestran tres ejemplos típicos de inactivación térmica de diferentes microorganismos (van Boekel, 2002) cuando son descritos por la distribución de Weibull,

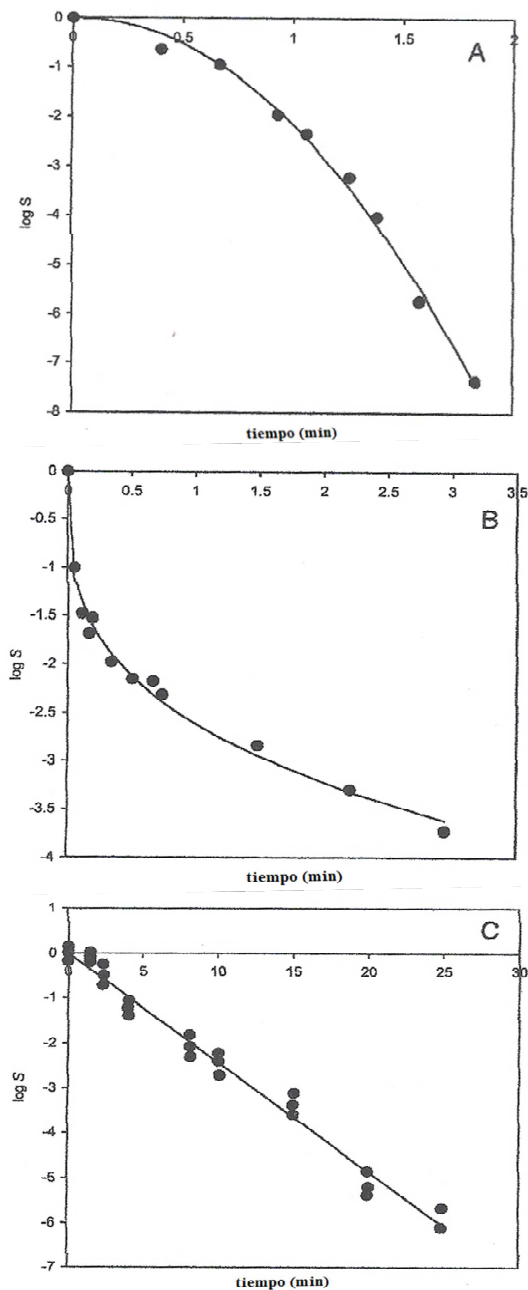


Fig. 3. Aplicaciones del modelo de Weibull: (A) inactivación de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo a 70°C; $\beta=0.46$, $n=2.1$ (Murphy *et al.*, 2000); (B) inactivación de *Salmonella enteritidis* en yema de huevo + 5% NaCl + 5% sacarosa a 64°C, $\beta=0.0025$, $n=0.3$ (Michalski *et al.*, 1999). (C) inactivación de *S. typhimurium* en carne molida a 57.2 °C, $\beta=1.78$, $n=1.0$ (Goodfellow y Brown, 1978) (Adaptada de van Boekel, 2002).

empleando valores de $n > 1$, $n < 1$ y $n = 1$. Es posible observar que los ajustes obtenidos por la distribución de Weibull son bastante aceptables y que para el caso de $n > 1$ (Fig. 3A) y $n < 1$ (Fig. 3B), en donde la tendencia no es lineal, la aplicación de la cinética de primer orden no sería adecuada.

Una de las pruebas clásicas para evaluar la aplicabilidad del modelo de Weibull consiste en una gráfica doble logarítmica de $\ln(-\ln S(X))$ en función de $\ln t$. Se establece que el modelo de Weibull aplica adecuadamente, si se obtiene una línea recta (Fig. 4). Esta prueba fue recientemente aplicada por Hutchinson (2000) para el análisis de muerte no térmica de *Escherichia coli*. Otra manera de evaluar el ajuste de un modelo, es el estudiar los residuales (la diferencia entre las predicciones del modelo y los valores experimentales) los cuales deben estar distribuidos al azar. También es frecuente usar el análisis de confiabilidad de los modelos con la prueba de la χ^2 (van Boekel, 2002).

Peleg y Cole (1998) probaron también con éxito la aplicación del modelo de distribución de Weibull para esporas de *Clostridium botulinum* y *Bacillus stearothermophilus* y células de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Similarmente, Fernández *et al.* (1999), aplicaron el mismo modelo con buenos resultados en la destrucción térmica de *B. cereus*. Este modelo presenta la principal ventaja de ser muy sencillo y suficientemente robusto para describir tanto curvas de supervivencia cóncavas hacia abajo ($n > 1$) (Fig. 5) como curvas de supervivencia cóncavas hacia arriba ($n < 1$) (Fig. 6) (Mafart *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que el modelo de Weibull puede ser más realista que la cinética de primer orden para describir la cinética de

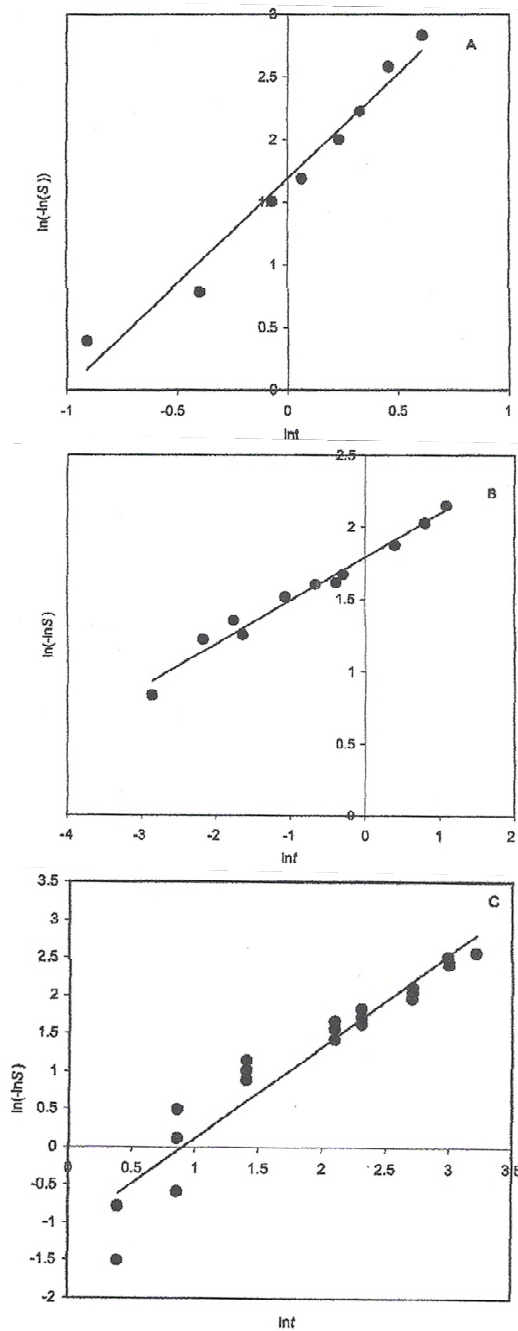


Fig. 4. Aplicabilidad del modelo de Weibull para los casos presentados en la Figura 3 (Adaptada de van Boekel, 2002).

supervivencia (Tabla I), por lo que van Boekel (2002) sugiere que éste podría establecer las condiciones de proceso. Resulta interesante mostrar las comparaciones del valor D obtenido del modelo de Weibull, ($D = \square$ en la Ecuación

13) y los valores D obtenidos a partir de la cinética de primer orden, realizadas por van Boekel (2002) (Tabla II). En esta comparación se muestra una gran diferencia entre los valores D de la cinética de primer orden, comparados con el obtenido con el modelo de Weibull.

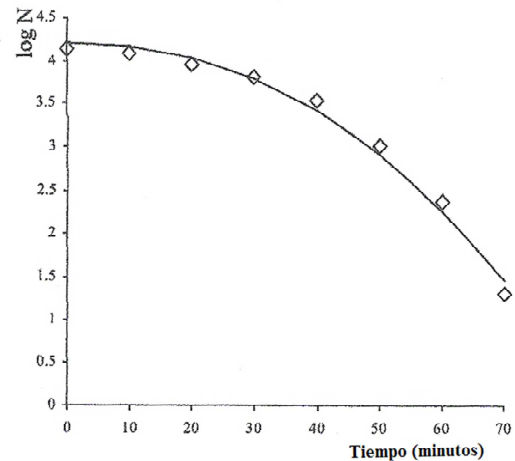


Fig. 5. Ajuste con la ecuación 8 con datos de Mafart *et al.* (2002) de la cinética de muerte de *B. pumilus* calentado a 89°C (Adaptada de Mafart *et al.*, 2002).

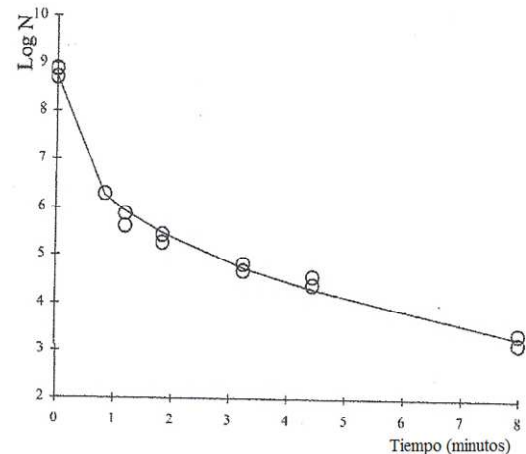


Fig. 6. Ajuste con la ecuación 8 con datos de Anderson *et al.* (1996) de la cinética de muerte de *C. botulinum* calentado a 111°C (Adaptada de Mafart *et al.*, 2002).

Los datos mostrados en la Tabla II indica que es muy relevante usar el modelo de

Weibull en lugar de los valores clásicos de D , ya que éstos pueden causar tanto subprocesamiento como sobreprocesamiento (van Boekel, 2002). De hecho, si el modelo de Weibull puede ser extrapolado, se hace aún posible considerar un tiempo térmico de muerte absoluto para los casos donde el parámetro de forma n es > 1 (probablemente la mayoría de los casos), como es reportado por Peleg (2000).

Por otra parte, López-Malo *et al.* (2002), probaron la aplicabilidad de la ecuación 6 del modelo de Fermi a curvas de respuesta a la dosis antimicrobiana de *Aspergillus flavus* (Figuras 7 y 8). Los parámetros de regresión y los parámetros del modelo, X_c y k , se

presentan en la Tabla III. El ajuste fue evaluado con criterio estadístico ($r > 0.90$), siendo éste bastante satisfactorio para este caso. A partir de estos datos se concluye que el modelo de Fermi es un modelo que puede ser usado para describir y comparar modelos de inhibición. Dado que el ajuste es adecuado, esto permite comparar el efecto de los distintos factores (pH y concentración del agente antimicrobiano) y sus dosis, en la supervivencia de los microorganismos. Por ejemplo, en la figura 7 el modelo permite observar el efecto de la disminución del pH en la inactivación del microorganismo en estudio, y en la figura 8 permite comparar el efecto de tres diferentes tipos de agentes antimicrobianos naturales utilizados en la reducción de la población microbiana.

Tabla I. Resultados con $\pm 95\%$ intervalos de confianza del ajuste del modelo de Weibull a los datos reportados *

Caso no.	Microorganismo	Medio de calentamiento	T(°C)	β (min)	n	Fuente
1	<i>Streptococcus faecalis</i>	carne de pollo molida	60	19.3 \pm 4.3	1.5 \pm 0.2	Ott <i>et al.</i> , 1961
2	<i>Listeria monocytogenes</i>	carne de res picada	55	30.6 \pm 11.1	1.8 \pm 0.5	Mackey y Derrick, 1990
			70	0.2 \pm 0.05	1.6 \pm 0.3	
3	<i>Escherichia coli</i>	cerveza sin alcohol	56	1.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3	L'Anthoën e Ingledew, 1996
4	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	solución acuosa, $a_w = 0.963$	50	25.7 \pm 3.8	0.6 \pm 0.09	Jermimi, 1986
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	cerveza	51	22.1 \pm 1.3	2.9 \pm 0.4	L'Anthoën e Ingledew, 1996

*Adaptada de van Boekel (2002)

Tabla II. Comparación del tiempo (min) necesario de calentamiento para alcanzar una reducción 7D y 12 D en el número de células usando el clásico valor D y el modelo de Weibull, respectivamente *

Caso no.	T (°C)	Concepto 7D basado en el valor D^a	Concepto 7D basado en el modelo de Weibull	Concepto 12D basado en el valor D^a	Concepto 12D basado en el modelo de Weibull
1	60	94.5	123.1	162	176.4
2	55	147	143.4	252	193.4
	70	0.7	1.1	1.2	1.6
3	56	5.3	6.5	9	12.7
4	50	560	2643	960	6490
5	51	78.4	57.6	134.4	69.4

El no. de caso corresponde a los referidos en la Tabla I

^aComo fue publicado en el artículo original

*Adaptada de van Boekel (2002)

Se pueden observar diferencias en los valores obtenidos de X_c y k para cada agente antimicrobiano evaluado, donde a mayor valor de X_c , menor es el efecto del agente antimicrobiano. Así también se puede observar que el incremento de la concentración del agente antimicrobiano en el caso del eugenol tiene un efecto significativo en la inactivación de *A. flavus*, ya que sus valores de k son pequeños, en comparación con los valores de k de la vainillina y el citral (Tabla III y Fig. 8). Por lo tanto, los parámetros de Fermi, X_c y k , resultan de gran utilidad para comparar el efecto de distintos factores (pH y concentración del agente antimicrobiano).

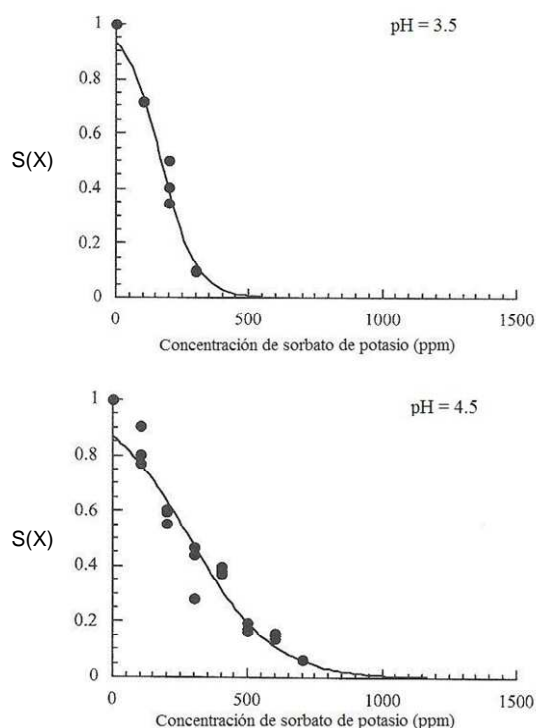


Fig. 7. Curva de respuesta a la dosis de *A. flavus* en agar papa dextrosa formulado con a_w 0.99, pHs seleccionados (3.5 o 4.5) y sorbato de potasio. Los círculos son datos experimentales; las líneas son el ajuste con el modelo de Fermi (Adaptada de López-Malo *et al.*, 2002).

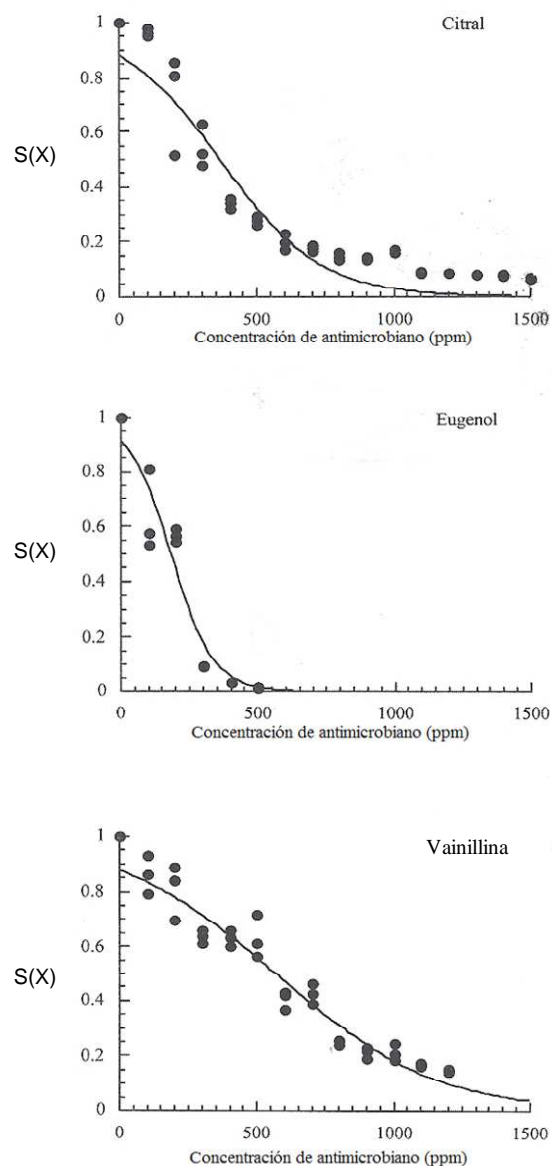


Fig. 8. Curva de respuesta a la dosis de *A. flavus* en agar papa dextrosa formulado con actividad de agua (a_w) 0.99, pH 3.5, y antimicrobianos seleccionados. Los círculos son datos experimentales; las líneas son el ajuste con el modelo de Fermi (Adaptada de López-Malo *et al.*, 2002).

Tabla III. Parámetros de regresión del modelo de Fermi aplicado en inactivación de *A. flavus* con antimicrobianos seleccionados en agar papa dextrosa formulada con a_w de 0.99 y diferentes pHs*

Antimicrobiano	pH	X_c (ppm)	k (ppm)	r^2
Vainillina	4.5	720±27	328±30	0.928
	3.5	567±17	289±18	0.969
Eugenol	4.5	212±12	51±11	0.958
	3.5	182±13	77±13	0.952
Citral	4.5	251±23	175±24	0.900
	3.5	364±18	181±18	0.945
Sorbato de potasio	4.5	285±13	151±14	0.969
	3.5	170±6	66±6	0.987

*Coeficiente de regresión

*Adaptada de López-Malo *et al.* (2002)

Conclusiones

Los modelos de distribución de Weibull y Fermi son convenientes para describir curvas de supervivencias logarítmicas lineales y no lineales. Sin embargo, existe poca información publicada en revistas científicas acerca de la aplicación de los modelos predictivos de curvas de respuesta a la dosis en tratamientos de agentes no convencionales y en combinación. Además muy pocas investigaciones comparan la aplicabilidad de los distintos modelos que se han desarrollado.

Actualmente se están desarrollando modificaciones a las ecuaciones matemáticas de los modelos para obtener parámetros que puedan compararse con los valores tradicionales de cinética de primer orden, como son el valor D y z . Esto significa que todavía hay necesidad para la optimización de procesos y de productos empleando mejores modelos de inactivación que los valores clásicos D y z .

Aunque el modelo clásico de inactivación de primer orden ha sido exitoso en el pasado de la industria de enlatado, puede conducir a dificultades a la industria de alimentos en las actuales tendencias de procesados mínimos

para garantizar la seguridad microbiana y por consiguiente mejorar la calidad de los alimentos.

Evaluar con mayor exactitud las curvas de supervivencia microbiana resultaría en un mejor entendimiento de los procesos que se aplican a los alimentos para su conservación.

Referencias

- Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., López-Malo, A., Palou, E., Char, C. D., y Raffellini, S. 2008. Models for microorganism inactivation: application in food preservation design. En "Processing Effects on Safety and Quality of Foods". E. Ortega (ed.). Taylor and Francis. Estados Unidos. En prensa.
- Anderson, W.F., McClure, A., Baird-Parker, A. C. y Cole, M.B. 1996. The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213B at temperatures below 121.1°C. *Journal of Applied Bacteriology*. 80(3): 283-290.
- Chick, H. 1908. An investigation of the laws of disinfection. *Journal of Hygiene*. Cambridge University Press. 8(1): 92-158.
- Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N. Mafart, P. y Leguerinel, I. 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology*. 101:73-81.
- Fernández, A., Salmeron, C., Fernández, P. S. y Martínez, A. 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strain of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science and Technology*. 10(4):158-162.
- Goodfellow, S. J. y Brown, W. L. 1978. Fate of *Salmonella* inoculated into beef for cooking. *Journal of Food Protection*. 41: 598-605.
- Guerrero, S., Tognon, M. y Alzamora, S. M. 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the combined action of ultrasound and low weight chitosan. *Journal of Food Protection*. 16 (2): 131-140.

- Heldman, D. R. y Newsome, R. I. 2003. Kinetic models for microbial survival during processing. *Food Technology*. 57(8): 40-100.
- Hutchinson, T. P. 2000. Graphing the death of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 62(1): 77-81.
- Jay, J. 1992. Modern Food Microbiology. 4a. Edición. Chapman & Hall, New York. Pg. 701.
- Jermini, M. F. G. 1986. Osmotolerant Yeasts – Their detection, isolation and properties related to food processing. Swiss Federal Institute of Technology (ETH). Zurich. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 139.
- Körmendy, I. y Körmendy, L. 1997. Considerations for calculating heat inactivation processes when semilogarithmic thermal inactivation models are nonlinear. *Journal of Food Engineering*. 34(1): 33-40.
- L'Anthoën, N. C. e Ingledew, W. M. 1996. Heat resistance of bacteria in alcohol free beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 54(1): 32-36. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M., y Palou, E. 2002. *Aspergillus flavus* dose response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*. 73(2): 213-218.
- Mackey, B. M. y Derrick, C. M. 1990. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Letters in Applied Microbiology*. 10(6): 251-255. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. y Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*. 72(1): 107-113.
- Michalski, C. R., Brackett, R. E., Hung, Y. C. y Eizeke, G.O.I. 1999. Use of capillary tubes and plate heat exchanger to validate U.S. Department of Agriculture pasteurization protocols for elimination of *Salmonella enteritidis* from liquid egg products. *Journal of Food Protection*. 62: 112-117.
- Murphy, R. Y., Marks, B. P., Johnson, E. R. y Johnson, M.G. 2000. Thermal inactivation kinetics of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat and liquid medium. *Journal of Food Research International*. 32: 375-379.
- Ott, T. M., El-Bisi, H. M. y Esselen, W. B. 1961. Thermal destruction of *Streptococcus faecalis* in prepared frozen foods. *Journal of Food Science*. 26(2): 1-10. Citado en: van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- Peleg, M. 1999. On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. *Food Research International*. 32(4): 271-278.
- Peleg, M. 2000. Microbial survival curves – the reality of flat “shoulders” and absolute thermal death times. *Food Research International*. 33(7): 531-538.
- Peleg, M. 2006. “Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems. Models for predicting growth and inactivation”. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Ratón, Florida. Pg. 417.
- Peleg, M. y Cole, M. B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38(5): 353-380.
- Peleg, M., Normand, M. D. y Damrau, E. 1997. Mathematical interpretation of dose-response curves. *Bull. Math. Biol.* 59(4): 747-761.
- Peleg, M. y Pechina, C. M. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(2):159-172.
- van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74(1): 139-159.
- Whiting, R. C. 1995. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35(6): 467-494.



Aceites esenciales: métodos de extracción

H. A. Peredo - Luna^{*}, E. Palou – García y A. López - Malo

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas que se encuentran en numerosas plantas. Estos pueden ser extraídos de diferentes partes de las plantas como hojas, tallos, flores y raíces. Aquellos provenientes de especias y condimentos son cada vez más utilizados en la industria de los alimentos y farmacéutica. De los diferentes métodos de extracción de aceites esenciales, la destilación por arrastre de vapor, la extracción con disolventes, la extracción por fluidos supercríticos y por medio del uso de microondas se revisarán en este trabajo, estableciendo algunas de sus ventajas y limitaciones. También se abordará brevemente el uso de ultrasonido como pre-tratamiento para la extracción de aceites esenciales. Los métodos convencionales, arrastre de vapor y el uso de disolventes, requieren de tiempos de extracción prolongados; mientras que los métodos alternativos, fluidos supercríticos y microondas, no sólo requieren menores tiempos sino que también consumen menos energía.

Palabras clave: Aceites esenciales, extractos, destilación por arrastre de vapor, extracción por disolvente, fluidos supercríticos, microondas, ultrasonido.

Abstract

Essential oils are aromatic substances found in several plants, which can be extracted from leaves, twigs, flowers, and roots. Essential oils from spices and condiments are increasingly used in food and pharmaceutical industry. There are different methods for essential oil extraction; steam distillation, solvent extraction, supercritical fluid extraction and microwave extraction will be examined in this paper, including some of their advantages and limitations. In addition, ultrasound as a pre-treatment to enhance extraction will be pointed out. Conventional methods such as steam distillation and solvent extraction require long extraction times while alternative methods as supercritical fluid and microwave extraction reduce extraction time and energy requirements.

Keywords: essential oils, plant extracts, steam distillation, solvent extraction, supercritical fluids, microwaves, ultrasound.

Introducción

Los aceites esenciales y extractos de plantas se han utilizado desde hace mucho tiempo

para obtener aromas y sabores. En años recientes se han estudiado los extractos y aceites esenciales de condimentos y especias desde un punto de vista funcional. Es decir, se ha estudiado si los extractos o aceites esenciales tienen actividad antimicrobiana, si actúan como agentes antioxidantes o si

^{*} Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: hareli.pluna@gmail.com

aportan nutrimentos. Los métodos de obtención de los aceites esenciales determinan el uso de los mismos. El tipo de disolvente puede contaminarlos o limitar su uso, dependiendo de la toxicidad del disolvente y de las técnicas utilizadas para su eliminación. De ahí la importancia de investigar métodos nuevos y/o alternativos para la obtención de extractos y aceites esenciales.

Las propiedades funcionales de los extractos varían con la proporción de los compuestos presentes. Para especias diferentes se obtienen respuestas diferentes en su actividad antimicrobiana de acuerdo a las condiciones en las que se procesan (Thongson *et al.*, 2004). Diversas investigaciones demuestran que la composición de los aceites esenciales y extractos puede variar de acuerdo al método de extracción utilizado. Aunque estas variaciones pueden no ser importantes, son detectables por técnicas sensibles como la cromatografía de gases. Las variaciones radican en diferencias en la proporción de los compuestos e incluso en diferencias en el número de los compuestos (Sefidkon *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007; Da Porto *et al.*, 2009). Es importante identificar los efectos de diversos métodos de extracción sobre las propiedades y composición de los aceites esenciales y otros extractos obtenidos.

Por todo lo anterior, en este trabajo se revisarán algunos de los métodos de extracción convencionales más utilizados y algunos métodos alternativos, así como sus principales ventajas y limitaciones. Concretamente, se revisarán la destilación por arrastre de vapor, extracción con disolventes, extracción por fluidos supercríticos y extracción por microondas. También se discutirán brevemente los efectos de pre-tratamientos con ultrasonido de baja frecuencia sobre la extracción de aceites esenciales.

Revisión bibliográfica

Aceites esenciales y otros extractos

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de base lipídica encontradas prácticamente en todas las plantas; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en las distintas partes de la planta: raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Los aceites esenciales son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; separables por métodos químicos o físicos, como la destilación, la refrigeración, la centrifugación, entre otros (Vásquez *et al.*, 2001).

El uso de los aceites esenciales de condimentos y especias en las industrias de alimentos y farmacéutica es cada vez más generalizado, debido en parte a la homogeneidad del aroma y a la minimización de las posibilidades de contaminación microbiana, cuando se compara con el uso directo de tales especias y condimentos (Vásquez *et al.*, 2001).

Otro tipo de extracto derivado de las especias son las oleorresinas que están constituidas por aceites esenciales, resinas orgánicamente solubles y otros materiales relacionados como ácidos grasos no volátiles. La cantidad de lípidos depende de la materia prima y el disolvente usado en la extracción. Las semillas tendrán una fracción lipídica mayor que otras partes de la planta (Farrel, 1985). En las oleorresinas, los componentes deben estar en la misma proporción que en la especia original. Las resinas y lípidos actúan como fijadores naturales de los compuestos más volátiles de los aceites esenciales. Algunas son difíciles de manejar por su viscosidad y su adherencia. Pueden agregarse otros compuestos como aceite esencial, triacilglicéridos con el fin de estandarizar las oleorresinas para obtener productos de mayor calidad (Farrel, 1985).

Los aceites esenciales son los principales constituyentes del aroma y sabor de las especias. Estos son destilados por arrastre de vapor sencillo, en seco, a vacío u obtenidos por presión en frío (Farrel, 1985). Las especias y sus aceites esenciales presentan la propiedad de inhibir el crecimiento de microorganismos, expresada como actividad antimicrobiana, actuando como agentes bacteriostáticos o antifúngicos. Estas propiedades se han conocido durante siglos. La canela, el comino y el tomillo se utilizaban en el antiguo Egipto en los embalsamamientos; en India y China para conservar alimentos y como remedios medicinales. Otra propiedad funcional de los aceites esenciales es la de actuar como antioxidantes, retrasando o inhibiendo la oxidación de aceites y lípidos en general. La canela presenta este tipo de actividad, pero no es tan efectiva como la mostrada por los aceites de romero, salvia y orégano (Hirasa y Takemasa, 2002).

Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físicas, como densidad, viscosidad, índice de refracción y actividad óptica. La mayoría de los aceites esenciales tiene una densidad menor a la del agua excepto los aceites de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo. El índice de refracción es una propiedad característica de cada aceite esencial y cambia cuando éste se diluye o mezcla con otras sustancias (Ortuño, 2006).

Métodos de extracción

Destilación por arrastre de vapor

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por éste y otros "no volátiles". Lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla, denominándose este "vapor de

arrastre", pero en realidad su función no es la de "arrastrar" el componente volátil, sino condensarse formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. En este caso se tendrá la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia (Wankat, 1988). La condición más importante para que este tipo de destilación pueda ser aplicado es que tanto el componente volátil como una impureza sean insolubles en agua, ya que el producto destilado (volátil) formará dos fases al condensarse, lo cual permitirá la separación del producto y del agua fácilmente. La presión total del sistema será la suma de las presiones de vapor de los componentes de la mezcla orgánica y del agua. Sin embargo, si la mezcla a destilar es un hidrocarburo con algún aceite, la presión de vapor del aceite al ser muy pequeña se considera despreciable.

En la destilación por arrastre es posible utilizar un gas inerte para el arrastre (Fair, 1987). Sin embargo, el empleo de vapores o gases diferentes al agua implica problemas adicionales en la condensación y recuperación del destilado o gas. El comportamiento que tendrá la temperatura a lo largo de la destilación será constante, ya que no existen cambios en la presión de vapor o en la composición de los vapores de la mezcla, es decir, el punto de ebullición permanecerá constante mientras ambos líquidos estén presentes en la fase líquida. En el momento que uno de los líquidos se elimine por la propia ebullición de la mezcla, la temperatura ascenderá bruscamente (Wankat, 1988). Existe una gran diferencia entre una destilación por arrastre y una simple, ya que en la primera no se presenta

un equilibrio de fases líquido-vapor entre los dos componentes a destilar como se da en la destilación simple. Por lo tanto, no es posible realizar diagramas de equilibrio, ya que en el vapor nunca estará presente el componente "no volátil" mientras esté destilando el volátil. Además, en la destilación por arrastre de vapor el destilado obtenido será puro en relación al componente no volátil (aunque requiera de una decantación para ser separado del agua), algo que no sucede en la destilación simple, en la cual el destilado sigue presentando ambos componentes aunque más enriquecido en alguno de ellos. Por otra parte, si este tipo de mezclas con aceites de alto peso molecular fueran destiladas sin la adición del vapor se requeriría de gran cantidad de energía para calentarlas y se emplearía mayor tiempo, pudiéndose descomponer si se trata de aceites esenciales.

La destilación por arrastre de vapor son que es un método sencillo y de bajo costo, pero su inconveniente es que requiere largos periodos de tiempo y tiene rendimientos bajos en comparación con otros métodos (Sefidkon *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007; Da Porto *et al.*, 2009).

Extracción con disolventes

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleoresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio

característicos de muchos disolventes orgánicos volátiles (Martínez, 2003).

Algunos disolventes utilizados en este método de extracción tienen restricciones en cuanto a los residuos máximos que pueden dejarse cuando los aceites esenciales son la materia prima en las industrias de los perfumes o alimentos. Estos límites varían de acuerdo a las diferentes legislaciones. Los disolventes derivados del petróleo, como éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de metilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlos y al contacto con la piel, y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos. Los extractos obtenidos con este tipo de disolventes suelen ser más oscuros, ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos, su solubilidad en alcohol diluido es menor y se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. El disolvente con el aceite esencial se filtra y se evapora a presión atmosférica y/o a vacío. Los restos de disolvente deben separarse a temperatura baja (Ortuño, 2006).

En este tipo de procedimientos se obtienen masas viscosas, según la materia prima, que contienen el aceite esencial, grandes cantidades de ceras, resinas y pigmentos, que se eliminan realizando extracciones con alcohol, enfriando a -13°C , filtrando y evaporando el alcohol (Ortuño, 2006). Los métodos más usados a nivel laboratorio son extracción por reflujo y mediante equipo Soxhlet (Thongson *et al.*, 2004; Proestos y Komaitis, 2006). Otro tipo de extracción por disolventes, mayormente usada a nivel laboratorio, es la maceración o extracción alcohólica, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempo definidos. Los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol, generalmente en rotavapores (Chua *et al.*, 2008).

La extracción con disolventes tiene importantes desventajas. Además de que requiere de periodos de tiempo relativamente largos, los aceites esenciales obtenidos contienen trazas de los disolventes utilizados; limitando su uso en la industria de los alimentos, la industria cosmética o farmacéutica (Khajeh *et al.*, 2004; Danjanović *et al.*, 2005; Khajeh *et al.*, 2005; Vági *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2007).

Extracción por fluidos supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos es una operación unitaria que explota el poder disolvente de fluidos supercríticos en condiciones encima de su temperatura y presión críticas. Es posible obtener extractos libres de disolvente usando fluidos supercríticos y la extracción es más rápida que con la utilización de disolventes orgánicos convencionales. Estas ventajas son debidas a la alta volatilidad de los fluidos supercríticos (gases en condiciones ambientales normales) y a las propiedades de transporte mejoradas (alta difusividad y baja viscosidad). Usando dióxido de carbono, en particular, el tratamiento es a temperatura moderada y es posible lograr una alta selectividad de micro-componentes valiosos en productos naturales. La selectividad del CO₂ también es apropiada para la extracción de aceites esenciales, pigmentos, carotenoides antioxidantes, antimicrobianos y sustancias relacionadas, que son usadas como ingredientes para alimentos, medicinas y productos de perfumería y que son obtenidas de especias, hierbas y otros materiales biológicos (Del Valle y Aguilera, 1999).

La extracción de compuestos fenólicos y pigmentos se ve favorecida con el uso de co-disolventes, como etanol, junto al CO₂ según Vatai *et al.* (2009). La eficiencia de la extracción se mejora de forma importante cuando la muestra se pre-trata con CO₂

comprimido, disminuyendo la cantidad de ceras en el extracto (Gaspar *et al.*, 2000). La Figura 1 esquematiza un proceso de extracción con CO₂. El gas es enfriado y después presurizado con una bomba. La presión y temperatura de extracción son controlados por un regulador de contrapresión y un calentador. A la salida del recipiente de extracción el gas es expandido en una válvula antes de entrar al primer colector, que se encuentra casi a temperatura ambiente. La corriente de salida es llevada a una temperatura de 40°C a 45°C y expandida a presión atmosférica en otra válvula, después pasa a dos colectores fríos en paralelo. La velocidad de flujo en la última parte del proceso es monitoreada con un rotámetro y un flujómetro de gas, antes de descargar el CO₂. El extracto es colectado a intervalos cerrando la válvula que está a la salida del recipiente de extracción para lavar la tubería al primer colector con disolvente caliente, de la bureta, que se encuentra en la parte superior. El extracto obtenido del primer colector es mezclado con el del segundo para un volumen dado de disolvente y retenido para analizar los aceites esenciales y ceras cuticulares contenidas (Gaspar *et al.*, 2000).

Entre las ventajas de la extracción por fluidos supercríticos se encuentran: (a) que los tiempos de extracción se reducen; (b) se obtienen rendimientos mayores; (c) es posible seleccionar sustancias y la composición de los extractos, cambiando los parámetros de extracción; y (d) se requiere menos energía. La principal desventaja es que ceras cuticulares y compuestos de alto peso molecular son extraídos junto con el aceite esencial (Khajeh *et al.*, 2004; Danjanović *et al.*, 2005; Khajeh *et al.*, 2005; Vági *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2007; Yamini *et al.*, 2008).

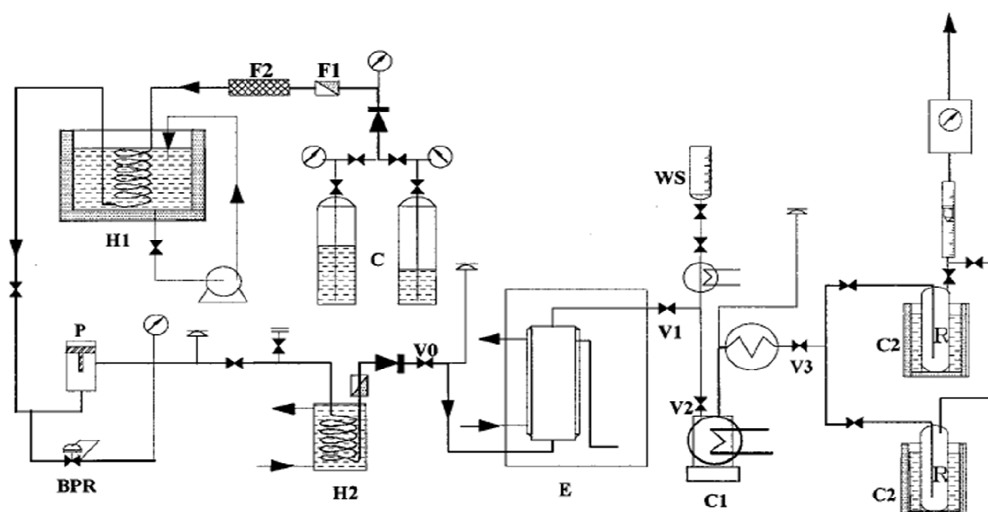


Fig. 1. Esquema de un aparato de extracción con CO_2 . C: Contenedor de CO_2 ; H1: intercambiador para enfriamiento; P: bomba; BPR: regulador de contrapresión; H2: intercambiador para suministrar calor; E: recipiente de extracción; WS: bureta con disolvente; C1: primer colector; C2: colectores en paralelo; V(0,1,2,3): válvulas. Adaptado de Gaspar *et al.* (2000)

Extracción por microondas

El uso de microondas es otra alternativa para la extracción de aceites esenciales. Esta técnica puede utilizarse asistiendo un método convencional como la hidro-destilación o adaptando un equipo para establecerlo como un método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente (Kimbaris *et al.*, 2006; Bayramoglu *et al.*, 2008; Golmakani y Rezaei, 2008; Bousbia *et al.*, 2009). La extracción por microondas sin disolvente, SFME (*solvent free microwave extraction*) por sus siglas en inglés, combina el calentamiento por microondas y la destilación seca. No se necesita agregar ningún disolvente o agua si se emplea material fresco. En caso de que el material esté seco, éste se rehidrata remojándolo en agua y drenando el exceso antes de la extracción. Los equipos para llevar a cabo esta técnica se pueden adaptar modificando un horno de microondas convencional, haciendo un orificio en la parte superior que

conecte un matraz de fondo plano con un aparato de refrigeración (un condensador conectado a un tubo de separación por gravedad, por el que pasa una corriente de agua fría), sellando la conexión con el horno para evitar la fuga de microondas (Bayramoglu *et al.*, 2008). De igual forma, la hidro-destilación asistida con microondas adapta un aparato de destilación a un horno de microondas (Kimbaris *et al.*, 2006; Golmakani y Rezaei, 2008). En la Figura 2 se muestra el esquema de un equipo de laboratorio para este tipo de método de extracción.

La extracción por microondas ofrece beneficios como una reducción considerable del tiempo y del consumo de energía (Kimbaris *et al.*, 2006; Bayramoglu *et al.*, 2008; Golmakani y Rezaei, 2008; Bousbia *et al.*, 2009). Este método puede realizarse a gran escala con reactores de microondas, pero se requieren altos niveles de seguridad (Bousbia *et al.*, 2009).

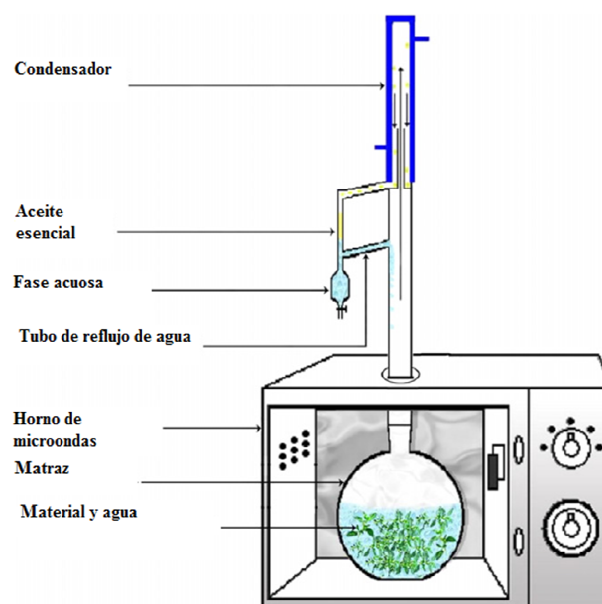


Fig. 2. Representación esquemática de un equipo de hidrodestilación asistida con microondas. Adaptado de Golmakani y Rezaei (2008).

Para el método conocido como hidro-difusión de microondas y gravedad, *microwave hydrodiffusion and gravity*, Bousbia *et al.* (2009) proponen que la transferencia de masa y de calor durante el proceso ocurre en la misma dirección, desde el interior del material hacia el exterior. Esto permite que el aceite esencial y el agua *in situ* del material, sean extraídos (hidro-difusión) y sean separados por gravedad.

Efecto de pre-tratamientos con ultrasonido de baja frecuencia

El ultrasonido se encuentra en la región de frecuencias entre 18 kHz y 100 MHz; puede dividirse en ultrasonido de alta intensidad, con frecuencias bajas, entre 20 y 100 kHz y ultrasonido de diagnóstico entre 1 y 10 MHz. El ultrasonido de alta intensidad tiene la capacidad de inducir cavitación. También se ha considerado una fuente potencial para incrementar la reactividad química. Puede usarse en diversos procesos químicos e industriales (Bendicho y Lavilla, 2000).

El ultrasonido se aplica como una alternativa de extracción o para asistir en procesos de extracción de componentes volátiles de plantas, incluyendo aceites esenciales. La proporción en la composición de los extractos y el rendimiento de éstos depende de la temperatura a la que se lleve a cabo el proceso y del disolvente, o mezcla de disolventes, que se utilicen (Proestos y Komaitis, 2006).

En general, la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia o alta intensidad, incrementa la eficiencia de la extracción y reduce el tiempo de ésta (Thongson *et al.*, 2004; Proestos y Komaitis, 2006). También disminuye el riesgo de degradación térmica, cuando la extracción se realiza a temperaturas de 25°C (Kimbaris *et al.*, 2006). La desventaja de la implementación de ultrasonido es que involucra el uso de disolventes orgánicos.

Conclusiones

Los métodos convencionales para la extracción de aceites esenciales son sencillos, pero suelen tener rendimientos bajos. Los métodos alternativos ofrecen ventajas reduciendo los tiempos de extracción y el consumo de energía; sin embargo, en algunos casos para llevarlos a escala industrial aún es necesario realizar mayor investigación. La elección del método de extracción depende de la finalidad para la que son requeridos los extractos o aceites esenciales y si existe un interés particular por la concentración y/o recuperación de algún compuesto en especial.

Referencias

- Bayramoglu, B., Shanin, S. y Sumnu, G. 2008. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*. 88:535-540.
- Bendicho, C. y Lavilla, I. 2000. Ultrasound Extraction. En I.D. Wilson, E. R. Adlard, M. Cooke, y C. F. Poole (Eds). *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press. Reino Unido. pp. 1448 - 1454
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*. 114:355-362.
- Chua, M. - T., Tung, Y. - T. y Chang, S. - T. 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology*. 99:1918-1925.
- Da Porto, C., Decorti, D. y Kikic, I. 2009. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing : Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*. 112:1072-1078.
- Danjanović, B., Lepojević, Ž., Živković, V. y Tolić, A. 2005. Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*. 92:143-149.
- Del Valle, J. M. y Aguilera, J. M. 1999. Review: high pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. *Food Science and Technology*. 5(1):1-24.
- Fair, J.R. 1987. Distillation. En R.W. Rousseau (Ed). *Handbook of separation Process technology*. Wiley. Nueva York. Estados Unidos de América. pp. 229-339.
- Farrel, K. T. 1985. *Spices, Condiments and Seasonings*. Avi. Connecticut. EE.UU. 414p.
- Gaspar, F., Santos, R. y King, M. B. 2000. Extraction of essential oils and cuticular waxes with compressed CO₂: effect of matrix pretreatment. *Industrial and Engineering Chemical Research*. 39:4603-4608.
- Golmakani, M. T. y Rezaei, K. 2008. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oil from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. 109:925-930.
- Guan, W., Li, S., Yan, R., Thang, S. y Quan, C. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*. 101:1558-1564.
- Hirasa, K. y Takemasa, M. 2002. *Ciencia y Tecnología de las Especies*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 241p.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F. y Bahramifar, N. 2004. Comparison of essential oil composition of *Carun copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 86:587-591.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F. y Pirmoradei, M. R. 2005. Comparison of essential oils composition of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 91:639-644.
- Kimbaris, A. C., Siatas, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., y Polissiou, M. G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*. 13:54-60.

- Martínez, A. 2003. *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>, accesada: 04/12/2008.
- Ortuño, M. F. 2006. *Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes*. Aiyana. España. 274p.
- Proestos, C. y Komaitis, M. 2006. Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction techniques. *Quality Journal of Food*. 29:567-582.
- Sefidkon, F., Abbasi, K. y Khaniki, G. B. 2006. Influence of drying and extraction methods on ginger (*Zingiber officinale*), *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1(1):38 – 42. Universidad Nacional Amazónica del Perú. Perú.
- Vatai, T., Škerget, M. y Knez, Z. 2009. Extraction of phenolic compounds from elderberry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*. 90:246-254.
- Wankat, P.C. 1988. *Equilibrium Staged Separations*. Separations in Chemical yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. *Food Chemistry*. 99:19-23.
- Thongson, C., Davison, P.M., Mahakarnchanakul, W. y Weiss, J. 2004. Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*. 39:401-406.
- Vági, E., Simándi, B. Suhajda, Á. y Héthelyi, É. 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Oranigum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*. 38:51-57.
- Vásquez, O., Alva, A. y Marreros, J. 2001. Extracción y caracterización del aceite de jengibre. *Engineering*. Elsevier. Nueva York. EE.UU. 707p.
- Yamini, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Mirza, M. y Javidnia, K. 2008. Comparison of essential oil composition of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 108:341-346.



Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

A. I. Gómez – Sánchez* y A. López – Malo

Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México.

Resumen

Actualmente, el uso de antimicrobianos naturales en alimentos es de especial interés, debido a la creciente demanda de los consumidores por alimentos saludables y libres de aditivos sintéticos. Por ello, el objetivo de esta revisión es mostrar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Se presentan para las principales variedades de orégano y canela los métodos de obtención de sus aceites esenciales y se reporta su composición química, así como la actividad antimicrobiana y los mecanismos de acción de sus principales componentes. Finalmente, se mencionan algunas aplicaciones de estos antimicrobianos naturales en alimentos. Se concluye que el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela se debe a la acción individual o sinérgica de sus componentes sobre la integridad celular de los microorganismos; de tal forma, el conocimiento de los mecanismos de acción de sus componentes es de gran importancia y apoyo para su adecuada aplicación como antimicrobianos en las tecnologías de elaboración y conservación de alimentos.

Palabras clave: Aceites esenciales, canela, orégano, antimicrobianos.

Abstract

The use of natural antimicrobials in foods is actually of special concern, due to the increasing demand by consumers for healthy and synthetic additives free foods. Therefore, the focus of this review is to present the antimicrobial potential of the oregano (*Origanum vulgare*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oils. The main varieties of oregano and cinnamon spices are cited, and the extraction methods for obtaining them. Furthermore, studies showing chemical composition, antimicrobial activity and the antimicrobial action mechanisms of these are described. Finally, some applications of these essential oils in foods are cited. As a conclusion, it is remarked that the antimicrobial potential of the oregano and cinnamon essential oils is due to the individual or synergistic action of their components on the cell integrity of the microorganisms; thus, the knowledge on composition and antimicrobial activity of the essential oils is important in order to apply them for the processing and preservation of foods.

Keywords: Essential oils, cinnamon, oregano, antimicrobials.

* Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: aid_gom@hotmail.com

Introducción

El uso de agentes antimicrobianos en alimentos ha sido estudiado desde hace varias décadas y se ha demostrado que las hierbas, plantas y especias (o sus componentes y aceites esenciales) tienen propiedades bactericidas y fungicidas, además de actuar como ingredientes tradicionales y saborizantes en los alimentos. Actualmente, los consumidores demandan productos alimenticios más seguros, naturales y saludables, por lo que la investigación de los antimicrobianos naturales cada vez cobra mayor importancia.

Recientes investigaciones científicas indican que especias tales como la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y el orégano (*Origanum vulgare*) poseen propiedades antimicrobianas, lo cual justifica su adición como conservadores en los alimentos procesados; asimismo, y de manera complementaria, el sabor de estas especias puede contribuir a las características sensoriales de sabor y olor en los alimentos en los cuales se apliquen (Burt, 2004; Coronel, 2004; Cristani *et al.*, 2007; López-Malo *et al.*, 2007).

En este sentido, ha sido ampliamente estudiado y demostrado que los aceites esenciales de orégano y canela así como sus principales componentes, los monoterpenos carvacrol y timol en orégano, y aldehído cinámico (cinamaldehído) y eugenol en canela, poseen propiedades antibacterianas y fungicidas significativas. Por lo anterior, es importante conocer los mecanismos de acción antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes, ya que de ello depende su adecuada y correcta aplicación en los alimentos.

A pesar de las investigaciones realizadas, poco es conocido acerca de estos mecanismos. En términos generales, se atribuye la acción antimicrobiana al deterioro de la membrana celular de los microorganismos, afectando con ello su permeabilidad, favoreciendo el flujo de protones, la alteración de los sistemas enzimáticos y la producción de energía (Denyer y Hugo, 1991; Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 1999; Tassou *et al.*, 2000).

El uso potencial de los aceites esenciales como antimicrobianos naturales, aunado a la aceptación organoléptica, ha sido reportado en quesos, productos de panadería, carnes, pescados y mariscos, y frutas y verduras. (Smith-Palmer *et al.*, 2001; Quintavalla y Vicini, 2002; Roller y Seedhar, 2002; Guynot *et al.*, 2003).

El objetivo de este trabajo es mostrar el carácter antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela, mediante el estudio de su composición química, de los mecanismos de acción de sus principales componentes y de su actividad antimicrobiana ya reportada, así como su potencial aplicación en productos alimenticios.

Revisión bibliográfica

Generalidades

Los aceites esenciales derivados de plantas o especias han sido ampliamente estudiados por sus actividades fungicidas, insecticidas y antimicrobianas, y se ha encontrado que los aceites esenciales de tomillo, orégano, menta, canela, salvia y clavo poseen las más potentes propiedades antimicrobianas de entre muchos probados (Kalemba y Kunicka, 2003). Asimismo, ellos son compuestos GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) y se usan comúnmente en medicina naturista,

como saborizantes y aromatizantes en alimentos, y en la industria de fragancias.

Se ha reportado en forma general que en el orégano mediterráneo (*Origanum vulgare*) la concentración de aceite esencial es de 1.1% (Belitz *et al.*, 2004), o de alrededor del 2% (Tainter y Grenis, 1993), mientras que Russo *et al.* (1998) y Milos *et al.* (2000) indican que en la subespecie *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* el contenido de aceite esencial extraído a partir de las hojas secas varía entre 2% y 6%. Asimismo, existe otro tipo de orégano de género diferente al mediterráneo, *Lippia graveolens* o *Lippia berlandieri*, denominado orégano mexicano, el cual posee una concentración más alta de aceite esencial, de alrededor al 4% (Tainter y Grenis, 1993).

Respecto a la canela, las especies más comunes son: *Cinnamomum zeylanicum* o “canela verdadera”, *Cinnamomum loureirii* o “casia de Saigón o vietnamita”, *Cinnamomum cassia* o “casia o canela china”, y *Cinnamomum burmannii* o “canela de Batavia”. El reporte del contenido de aceite esencial extraído de la corteza de los árboles de dichas especies es variable entre autores, encontrándose entre 0.5% a 1.0% (López-Malo *et al.*, 2005a), o entre 1.5% a 3.0% (Tainter y Grenis, 1993).

Obtención y composición de los aceites esenciales de orégano y canela

Para la obtención a nivel comercial o en planta piloto de los aceites esenciales de especias y plantas, existen varios métodos, siendo la destilación con arrastre de vapor

y la extracción con disolventes orgánicos los métodos de extracción más comunes (Burt, 2004). Por otra parte, la extracción supercrítica con dióxido de carbono líquido a bajas temperaturas y altas presiones produce aceites esenciales con características sensoriales más aceptables, pero la desventaja de este método es su elevado costo (Simándi *et al.*, 1998). Adicionalmente, Packiyasothy y Kyle (2002) señalan que el tipo de método de extracción influye en la composición de los aceites esenciales, y por consiguiente en sus propiedades antimicrobianas. Por otra parte, con el fin de prevenir cambios en la composición de los aceites esenciales, se recomienda almacenarlos en recipientes sellados y en ausencia de luz (Burt, 2004).

Existen numerosos reportes en los cuales se ha analizado la composición de los aceites esenciales de especias y plantas, lo cual se lleva a cabo mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (Salzer, 1977; Wilkins y Madsen, 1991; Daferera *et al.*, 2000; Jerkovic *et al.*, 2001). Se ha encontrado que los principales componentes presentes en los aceites esenciales son mono y sesquiterpenos, fenoles y fenol-éteres (Belitz *et al.*, 2004).

Senatore (1996) y Russo *et al.* (1998) indican que puede haber más de 60 componentes individuales en los aceites esenciales. Asimismo, Bauer *et al.* (2001) señalan que los principales componentes constituyen hasta el 85% de la composición total de un aceite esencial, mientras que otros componentes se encuentran simplemente como trazas. A continuación, en la Tabla I, se presentan los principales compuestos en los aceites esenciales de orégano y canela, los cuales exhiben propiedades antimicrobianas.

Tabla I. Principales compuestos con actividad antimicrobiana en los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare*)

Nombre común	Nombre científico	Compuesto	Concentración (%)	Referencia
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Trans-cinamaldehído	50 - 80	Belitz <i>et al.</i> , 2004; Burt, 2004
		Eugenol	10	
		Safrol	0 - 11	
		Linalol	10 - 15	
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	0 - 80	Baratta <i>et al.</i> , 1998; Russo <i>et al.</i> , 1998;
		Timol	0 - 64	
		γ -Terpineno	2 - 52	Belitz <i>et al.</i> , 2004; Burt, 2004
		<i>p</i> -Cimeno	0 - 52	

Como se observa, los componentes del aceite esencial de orégano son los fenoles carvacrol y timol y los monoterpenos hidrocarburos γ -terpineno y *p*-cimeno, los cuales son precursores biológicos del carvacrol y el timol; estos cuatro compuestos constituyen entre el 80% y 90% de la composición total del aceite esencial (Kokkini *et al.*, 1997). Asimismo, el aceite esencial de canela está compuesto principalmente de trans-cinamaldehído o aldehído cinámico, y en menor grado de eugenol (Bullerman *et al.*, 1977; Juglal *et al.*, 2002).

Distintos estudios indican que la composición de los aceites esenciales de una especie particular de planta es afectada por diversos factores, entre ellos el origen geográfico de la planta, la estación del año de cosecha e incluso la parte de la planta de donde proviene el aceite (Arras y Grella, 1992; Marroti *et al.*, 1994; Russo *et al.*, 1998; Faleiro *et al.*, 2002). De igual forma, ha sido reportado que especies del género *Origanum* se caracterizan por tener diferencias tanto en el contenido de aceite esencial como en su composición química, y se ha observado que los contenidos de timol y carvacrol varían aún entre plantas de la misma especie (Kokkini y Vokou, 1989; Vokou *et al.*, 1993; Kokkini *et al.*, 1997).

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Una medida de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales que es reportada por la mayoría de los investigadores es la concentración mínima inhibitoria (CMI). Sin embargo, aún existen diferencias en la definición de este término entre los diversos autores; así, las definiciones más usadas se presentan en la Tabla II.

Algunas CMI reportadas para el aceite esencial de orégano, en unidades de $\mu\text{L/mL}$, obtenidas de pruebas *in vitro* contra bacterias patógenas son: 2.1 para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* y *Klebsiella pneumoniae*, de 2.5 para *Enterococcus faecalis*, y de 20.0 para *Pseudomonas aeruginosa* (Prudent *et al.*, 1995; Hammer *et al.*, 1999; Burt y Reinders, 2003); asimismo, Caccioni y Guizzardi (1994) reportan para carvacrol un valor de CMI de 250 $\mu\text{g/mL}$ en *Penicillium digitatum*. Respecto al aceite esencial de canela, aldehído cinámico y eugenol, se han reportado valores de CMI de 200 ppm, 150 ppm y 125 ppm, respectivamente, para *Aspergillus parasiticus* (Bullerman *et al.*, 1977), y valores de CMI en fase gaseosa de 438.6 a 877.19 $\mu\text{L/L}$ de

aire para los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Coronel, 2004).

citoplásmica de los microorganismos, la cual de esta forma pierde su impermeabilidad a los protones y a iones de tamaño superior,

Tabla II. Diversas definiciones de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)^a

Definición	Referencia
Mínima concentración para mantener o reducir la viabilidad del inóculo	Carson <i>et al.</i> (1995)
Mínima concentración requerida para la inhibición completa del organismo de prueba en 48 horas de incubación	Wan <i>et al.</i> (1998); Canillac y Mourey (2001)
Mínima concentración para inhibir el crecimiento visible del organismo de prueba	Karapinar y Aktug (1987); Onawunmi (1989) Hammer <i>et al.</i> (1999); Delaquis <i>et al.</i> (2002)
Mínima concentración para lograr una disminución significativa (mayor al 90%) en la viabilidad del inóculo	Consentino <i>et al.</i> (1999)

^aAdaptado de Burt (2004)

Debido al interés por el potencial uso de los aceites esenciales de especias y plantas como antimicrobianos naturales en alimentos, Lambert *et al.* (2001) señalan que existe actualmente una demanda creciente por obtener en forma precisa los valores de CMI de los diversos aceites esenciales, con la finalidad de establecer un balance entre la aceptación sensorial y la eficacia antimicrobiana, lo cual puede lograrse realizando estudios *in vitro* e *in vivo*, y considerando las limitaciones que existen en los métodos de determinación.

Mecanismos de acción de los principales componentes de los aceites esenciales

A pesar de que los posibles modos de acción de los compuestos presentes en los aceites esenciales han sido reportados en diversas investigaciones (Wilkins y Board, 1989; Beuchat, 1994; Nychas, 1995; Sofos *et al.*, 1998; Davidson, 2001), estos mecanismos aún no están completamente claros.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es debida al carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos que contienen. Estos actúan rompiendo los lípidos de la membrana

favoreciendo el flujo de electrones y de otros contenidos celulares. La pérdida prolongada de estas partículas y compuestos conduce a la muerte de los microorganismos (Denyer y Hugo, 1991; Davidson, 1993; Sikkema *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998).

Los componentes de los aceites esenciales parecen actuar también en las proteínas celulares de la membrana citoplásmica y afectar a enzimas del ATP, las cuales se encuentran rodeadas de moléculas lipídicas. Los mecanismos sugeridos indican que las moléculas de monoterpenos se acumulan en la bicapa lipídica, lo que hace posible la interacción directa de estos compuestos lipofílicos con las partes hidrofóbicas de las proteínas (Sikkema *et al.*, 1995; Gill y Holley, 2006; Turina *et al.*, 2006).

Carvacrol, timol y *p*-cimeno. Los principales componentes a los cuales se atribuye la acción antimicrobiana del aceite esencial de orégano son los monoterpenos carvacrol, timol, *p*-cimeno y γ -terpineno (Baratta *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1998; Belitz *et al.*, 2004; Burt, 2004). En la Fig.1 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

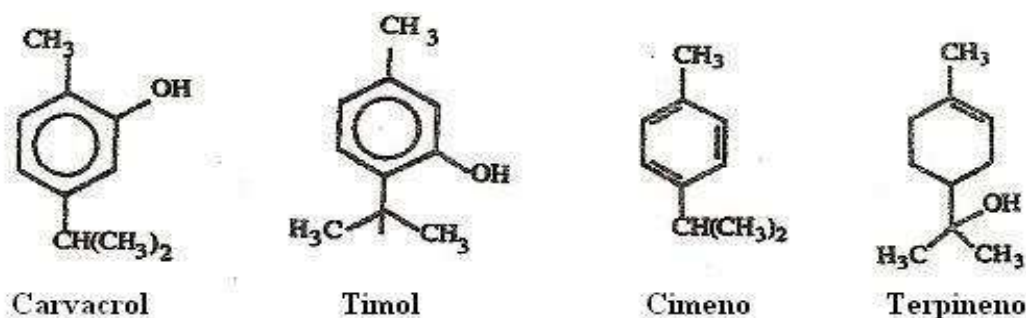


Fig. 1. Estructuras químicas de carvacrol, timol, cimeno y terpineno (Adaptado de López-Malo *et al.*, 2000)

Es sabido que la estructura química de los componentes de los aceites esenciales afecta su modo de acción y su actividad antimicrobiana, por lo que se confirma la importancia de la presencia del grupo hidroxilo en los compuestos fenólicos carvacrol y timol (Dorman y Deans, 2000; Ultee *et al.*, 2002; Veldhuizen *et al.*, 2006). El timol es estructuralmente similar al carvacrol, ya que difiere en la localización del grupo hidroxilo en el anillo fenólico; ambas sustancias parecen afectar la permeabilidad de la membrana celular (Lambert *et al.*, 2001).

Dorman y Deans (2000) y Veldhuizen *et al.* (2006) al trabajar con carvacrol en la inhibición de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas, sugieren que las principales características antimicrobianas del carvacrol se deben a la presencia del grupo hidroxilo y los electrones deslocalizados del anillo bencénico.

Estudios realizados por Ultee *et al.* (1999, 2000, 2002) referentes a la inhibición de *Bacillus cereus* por carvacrol muestran que este compuesto interactúa con la membrana celular, en la que se disuelve en la bicapa de los fosfolípidos y se alinea entre las cadenas de los ácidos grasos; esta distorsión de la estructura física de la membrana celular ocasiona su

expansión e inestabilidad, incrementando el flujo de iones y la permeabilidad pasiva. Asimismo, se observó que los niveles de ATP intracelular disminuyeron, lo cual indicó una disminución en la síntesis del ATP, o incremento en su velocidad de hidrólisis. Por otra parte, el gradiente de pH a través de la membrana celular se debilitó, y los niveles intracelulares de iones potasio disminuyeron. Aunado a esto, Ultee y Smid (2001) determinaron que el carvacrol inhibe la producción de su toxina, atribuyendo el modo de acción a dos teorías: 1) la excreción de toxinas es un proceso activo, y la cantidad de ATP presente puede ser insuficiente para su liberación al exterior de la célula, y 2) la disminución en la velocidad de crecimiento de la bacteria implica que las células usan toda la energía disponible para permanecer con vida, dejando muy poca cantidad para la producción de toxinas.

Juven *et al.* (1994) estudiaron la actividad antimicrobiana del timol contra *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, señalando que el timol se enlaza a las proteínas de la membrana celular mediante puentes de hidrógeno, cambiando así la permeabilidad de la membrana. Asimismo, indicaron que el timol es más inhibitorio a pH de 5.5 que a 6.5, ya que a pH de 5.5 la molécula de timol se encuentra no disociada, es más hidrofóbica

y puede enlazarse mejor a las áreas hidrofóbicas de las proteínas y disolverse mejor en la fase lipídica de la membrana celular.

Helander *et al.* (1998) indican que el carvacrol y el timol desintegran la membrana celular de las bacterias gram-negativas, ocasionando la liberación de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana al ATP. Por otra parte, Daferera *et al.* (2000) encontraron que el carvacrol y el timol parecen tener efectos aditivos en la inhibición de mohos, al trabajar con *Penicillium digitatum*, ya que al comparar las actividades fungicidas entre las especies de orégano *Origanum vulgare* con 71% carvacrol-timol del total y *Origanum dictamnus* con 78% de timol del total, y de tomillo con 66% carvacrol-timol del total, la especie *Origanum vulgare* y el tomillo fueron más tóxicos, atribuyendo este efecto a la sinergia de carvacrol-timol.

Respecto al *p*-cimeno, este compuesto tiene las siguientes características: es precursor biológico del carvacrol, es hidrofóbico y causa turgencia en la membrana citoplásmica en mayor grado que el carvacrol (Ultee *et al.*, 2002). Diversas investigaciones (Juven *et al.*, 1994; Dorman y Deans, 2000); Juliano *et al.*, 2000) indican que el *p*-cimeno carece de actividad antimicrobiana cuando se usa solo, pero que al combinarse con carvacrol, presenta sinergismo, facilitando el transporte de este último a través de la membrana citoplásmica. Más aún, Cristani *et al.* (2007) demostraron la eficacia antimicrobiana de los monoterpenos carvacrol, timol, γ -terpineno y *p*-cimeno actuando juntos, contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Aldehído cinámico (trans-cinamaldehído) y eugenol. La acción

antimicrobiana del aceite esencial de canela es atribuida principalmente al aldehído cinámico y al eugenol (Baratta *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1998; Belitz *et al.*, 2004; Burt, 2004). En la Fig.2 se presentan las estructuras químicas de estos compuestos.

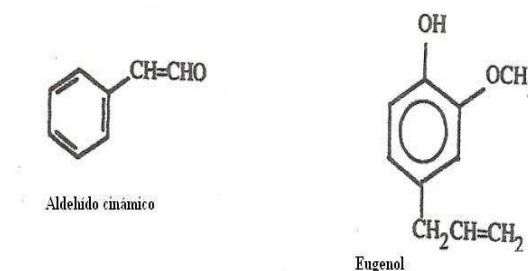


Fig. 2. Estructuras químicas de aldehído cinámico y eugenol (Adaptado de López-Malo *et al.*, 2000)

El modo de acción antimicrobiana del aldehído cinámico fue estudiado en *Enterobacter aerogenes* por Wendakoon y Sakaguchi (1995), y radica en la unión del grupo carbonilo a las proteínas celulares, evitando así la acción de las enzimas amino-ácido-descarboxilasas. De igual forma, en otros estudios Helander *et al.* (1998) determinaron la inhibición de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* con aldehído cinámico, y observaron que no hubo desintegración de la membrana celular externa ni agotamiento del ATP intracelular.

Estudios realizados por Thoroski (1989) referentes a la actividad antimicrobiana del eugenol en *Bacillus cereus*, señalan la inhibición de la producción de amilasas y proteasas, así como el deterioro de la pared celular y una elevada ruptura celular. De igual forma, Wendakoon y Sakaguchi (1995) determinaron que el grupo hidroxilo del eugenol se enlaza a las proteínas, bloqueando la acción enzimática en *Enterobacter aerogenes*.

Por otra parte, Moleyar y Narasimham (1992) observaron sinergismo entre el aldehído cinámico y el eugenol en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. y *Enterobacter* sp.

Uso de los aceites esenciales de canela y orégano y sus componentes como antimicrobianos en alimentos

El uso potencial de los aceites esenciales de especias y/o sus componentes como antimicrobianos de origen natural en los alimentos es de gran interés actual, principalmente por su habilidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.

En la Tabla III se presenta una recopilación de las investigaciones realizadas respecto a la inhibición de algunos microorganismos patógenos por los aceites esenciales de orégano y canela y sus componentes antimicrobianos, en diversos grupos de alimentos.

Al respecto de estas aplicaciones, los resultados de las investigaciones destacan lo siguiente:

- La estructura física de un alimento puede limitar la actividad antimicrobiana del aceite esencial (Skandamis *et al.*, 2002a).
- Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) requeridas en alimentos son mayores a las registradas *in vitro* (Shelef, 1983; Smid y Gorris, 1999).
- La acción antimicrobiana de los aceites esenciales se reduce considerablemente en carnes, productos cárnicos y pescado con alto contenido de grasa (Mejlholm y Dalgaard, 2002).

- El contenido de proteínas de los alimentos es un factor limitante en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales o sus componentes (Pol *et al.*, 2001).
- En verduras y productos de carne, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es favorecida por una disminución tanto en la temperatura de almacenamiento como en el pH del alimento (Skandamis y Nychas, 2000).
- En frutas, la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes aumenta conforme el pH disminuye (Roller y Seedhar, 2002).
- En tratamientos de fumigación de semillas, la efectividad de los aceites esenciales disminuye conforme la temperatura se incrementa (Weissinger *et al.*, 2001).

De acuerdo a lo anterior, se ha sugerido que el uso de los antimicrobianos naturales se lleve a cabo en combinación factores de control microbiano tales como temperatura, actividad de agua y pH, entre otros (López-Malo *et al.*, 2000, 2002, 2005a, 2005b, 2007; Guynot *et al.*, 2005), así como con tecnologías de tratamientos no térmicos, entre las cuales se encuentran la aplicación de altas presiones, pulsos eléctricos y atmósferas modificadas (Smid y Gorris, 1999; Skandamis y Nychas, 2001, 2002; Skandamis *et al.*, 2002b), proporcionando así al consumidor productos alimenticios seguros, saludables y con características sensoriales aceptables.

Conclusiones

Se puede concluir que el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y canela se debe principalmente a la acción individual o sinérgica de sus componentes sobre la integridad celular de los microorganismos; de esta forma, el conocimiento de los mecanismos de acción de sus componentes es de gran importancia

Tabla III. Estudios de actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y canela en alimentos^a

Grupo de alimentos	Alimento	Aceite esencial o componente	Concentración usada	Microorganismo	Condiciones experimentales	Referencia
Carnes	Carne de res desmenuzada	Orégano	0.05 - 1.0%	Flora natural	Tres tipos de empaque: aire, CO ₂ , atmósfera modificada (40% CO ₂ , 30% N ₂ , 30% O ₂)	Skandamis y Nychas (2001)
	Filetes de res	Orégano	0.8% w/v	<i>L.monocytogenes</i> Flora natural	Empacado en aire y atmósfera modificada (40% CO ₂ , 30% N ₂ , 30% O ₂)	Tsigarida <i>et al.</i> (2000)
	Carne de puerco desmenuzada	Orégano	100 - 200 ppm	Esporas de <i>C. botulinum</i>	Empacado al vacío	Ismaiel y Pierson (1990)
	Camarones cocinados	Aldehído cinámico	0.15 - 0.3%	<i>Pseudomonas putida</i>	Antimicrobiano aplicado en la superficie	Ouattara <i>et al.</i> (2001)
Mariscos	Lobina asiática entera	Orégano	0.05% v/v	Flora natural	Pescado entero en empaque sellado	Harpaz <i>et al.</i> (2003)
	Filetes de bacalao	Orégano	0.05% v/w	<i>Photobacterium phosphoreum</i>		Mejlholm y Dalgaard (2002)
	Filetes de salmón	Orégano	0.05% v/w	<i>Photobacterium phosphoreum</i>		Mejlholm y Dalgaard (2002)
	Ensalada de bacalao	Orégano	0.5 - 2.0 %v/w	<i>S.enteritidis</i>	Varios pHs y temperaturas de trabajo	Koutsoumanis <i>et al.</i> (1999)
Lácteos	Leche semidescremada	Carvacrol	2-3 mmol /L	<i>L.monocytogenes</i>	Dos temperaturas de trabajo	Karatzas <i>et al.</i> (2001)
	Yoghurt	Canela	0.005 - 0.5%	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Antimicrobiano aplicado en leche previo a la fermentación	Bayoumi (1992)
Verduras	Ensalada de berenjena	Orégano	0.7 - 2.1% v/w	<i>E. coli</i> O157:H7	Cuatro temperaturas de almacenamiento y tres diferentes pHs	Skandamis y Nychas (2000)
	Semillas de alfalfa	Aldehído cinámico y timol	200 mg , 600 mg /L aire	<i>Salmonella</i> spp., 6 serotipos	Fumigación de 50°C a 70°C	Weissinger <i>et al.</i> (2001)
Arroz	Arroz hervido	Carvacrol	0.15 - 0.75 mg/g	<i>B. cereus</i>		Ultee <i>et al.</i> (2000)
Frutas	Kiwi	Carvacrol	Solución 1 mM	Flora natural	Fruta sumergida en solución	Roller y Seedhar (2002)
		Ácido cinámico	Solución 1 mM	Flora natural	Fruta sumergida en solución Dos temperaturas de trabajo	Roller y Seedhar (2002)

^aAdaptado de Burt (2004)

y apoyo para su adecuada aplicación como antimicrobianos en las tecnologías de elaboración y conservación de alimentos.

Referencias

- Arras, G. y Grella, G. 1992. Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimycotic activity. *Journal of Horticultural Science*. 67:197-202.
- Baratta, T., Dorman, D., Deans, G., Biondi, D. y Ruberto, G. 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 10:618-627.
- Bauer, K., Garbe, D. y Surburg, H. 2001. *Common fragrance and flavor materials: Preparation, properties and uses*. Cuarta edición. Wiley-VCH, Weinheim, 318p.
- Bayoumi, S. 1992. Bacteriostatic effect of some spices and their utilization in the manufacture of yogurt. *Chemie, Mikrobiologie und Technologie der Lebensmittel*. 14:21-26.
- Belitz, H., Grosch, W. y Schieberle, P. 2004. *Food Chemistry. Tercera edición*. Springer, Alemania, 1070p.

- Beuchat, L. R. 1994. Antimicrobial properties of spices and their essential oils. En: V. M. Dillon y R. G. Board (Eds). *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*. CAB International. Wallingford. pp.167-179.
- Bullerman, L., Lieu, F. y Seier, S. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*. 42: 1107-1109, 1116.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potencial applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:223-253.
- Burt, S. y Reinders, R. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36:162-167.
- Caccioni, D. y Guizzardi, M. 1994. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *Journal of Essential Oils Research*. 6:173-179.
- Canillac, N. y Mourey, A. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excels* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*. 18:261-268.
- Carson, C., Cookson, B., Farrelly, H. y Riley, T. 1995. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 35:421-424.
- Consentino, S., Tuberoso, G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. y Palmas, F. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29:130-135.
- Coronel, C. P. 2004. Vapores de extractos de especias y condimentos como agentes antimicrobianos. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas Puebla.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Casteli, F., Sarpietro, M., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A. y Trombetta, D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications of their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:6300-6308.
- Daferera, D., Ziogas, B. y Polissiou, G. 2000. GC-MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:2576-2581.
- Davidson, P. M. 2001. Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds. En: M. P. Doyle, L. R. Beuchat y T. J. Montville (Eds). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Segunda edición. ASM Press. Washington. pp.593-627.
- Davidson, P. M. 1993. Parabens and phenolic compounds. En: P.M. Davidson y A. L. Branen (Eds). *Antimicrobials in Foods*. Segunda edición. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp.263-306.
- Delaquis, P., Stanich, K., Girard, B. y Mazza, G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander, and eucaliptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74:101-109.
- Denyer, S. P. y Hugo, W. B. 1991. Mechanisms of antibacterial action- A summary. En: S. P. Denyer y W. B. Hugo (Eds). *Mechanisms of action of chemical biocides*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.331-334.
- Dorman, H. J. D. y Deans, S. G. 2000. Antimicrobials agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88:308-316.
- Faleiro, M., Miguel, M., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, C., Figueiredo, A., Barroso, J. y Pedro, G. 2002. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species in *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*. 36:35-40.
- Gill, A. y Holley, R. A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*. 108:1-9.
- Guynot, M. E., Marín, S., Setó, L., Sanchis, V. y Ramos, A. J. 2005. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science & Technology International*. 11(1):25-32.
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Setó, L., Purroy, P., Sanchis, V. y Marín, S. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of

- bakery products. *Journal of Applied Microbiology*. 94:893-899.
- Hammer, K., Carson, C. y Riley, T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86:985-900.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V. y Gelman, A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh-water-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*. 66:410-417.
- Helander, I., Alakomi, H., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E., Gorris, L. y Von Wrighth, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:3590-3595.
- Ismaiel, A. y Pierson, M. D. 1990. Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of Food Protection*. 53:958-960.
- Jerkovic, I., Mastelic, J. y Milos, M. 2001. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* grown wild in Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*. 36:649-654.
- Juglal, S., Govinden, R. y Odhav, B. 2002. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin producing fungi. *Journal of Food Protection*. 65:683-687.
- Juliano, C., Mattana, A. y Usai, M. 2000. Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-baroma* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*. 12:516-522.
- Juven, B., Kanner, J., Schved, F. y Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. 76:626-631.
- Kalembe, D. y Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- Karapinar, M. y Aktug, S. 1987. Inhibition of food borne pathogens by thymol, eugenol, menthol y anethole. *International Journal of Food Microbiology*. 4:161-166.
- Karatzas, A., Kets, E., Smid, E. y Bennik, M. 2001. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*. 90:463-469.
- Kokkini, S. y Vokou, D. 1989. Carvacrol rich plants in Greece. *Flavour Fragrance Journal*. 4:1-7.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N. y Lanaras, T. 1997. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*. 44:883-886.
- Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K. y Nychas, G. J. E. 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology*. 49:63-74
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G. J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 453-462.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M. y Palou, E. 2005a. Naturally occurring compounds. Plant sources. En: P. M. Davidson, J. N. Sofos y A. L. Brannen (Eds). *Antimicrobials in Food*. Tercera edición. Marcel Dekker. Nueva York. pp.429-451.
- López-Malo, A., Alzamora, S.M. y Palou, E. 2005b. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 99(2):119-128.
- López-Malo, A., Alzamora, S. y Palou, E. 2002. *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*. 73(2/3):213-218.
- López-Malo, A., Alzamora, S. M. y Guerrero, S. 2000. Natural antimicrobials from plants. En: S. M. Alzamora, M. S. Tapia y A. López-Malo (Eds). *Minimally Processed Fruits and Vegetables*. Aspen Publishers. EE.UU. pp. 237-263.
- López-Malo, A., Barreto-Valdivieso, J., Palou, E. y San Martín, F. 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control*. 18 (11):1358-1362.
- Marotti, M., Piccaglia, R. y Giovanelli, E. 1994. Effects on planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil

- composition and its biological activity. *Flavor and Fragrance Journal*. 9:125-129.
- Mejlholm, O. y Dalgaard, P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. 34:27-31.
- Milos, M., Mastelic, J. y Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidally bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*. 71:79-83.
- Moleyar, V. y Narasimham, P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*. 16:337-342.
- Nychas, G. J. E. 1995. Natural antimicrobials from plants. En G. W. Gould (Ed). *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. pp.58-59.
- Onawunmi, G. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*. 9:105-108.
- Ouattara, B., Sabato, S. y Lacroix, M. 2001. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp. (*Penaeus* spp.). *International Journal of Food Microbiology*. 68:1-9.
- Packiyasothy, E. y Kyle, S. 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*. 54:384-387.
- Pol, I., Mastwijk, H., Slump, R., Popa, M. y Smid, E. 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection*. 64:1012-1018.
- Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J., Michel, G. y Baccou, J. 1995. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.) – evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*. 7:165-173.
- Quintavalla, S. y Vicini, L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*. 62. 373-380.
- Roller, S. y Seedhar, P. 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4°C and 8 °C. *Letters in Applied Microbiology*. 35:390-394.
- Russo, M., Galleti, G., Bocchini, P. y Carnacini, A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:3741-3746.
- Salzer, U.J. 1977. The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings- a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 9:345-373.
- Senatore, F. 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44:1327-1332.
- Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*. 6:29-44.
- Sikkema, J., Debont, J. y Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*. 59:201-222.
- Sikkema, J., Debont, J. y Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269:8022-8028.
- Simándi, B., Oszagyan, M., Lemberkovics, É., Kéry, A., Kaszacs, J., Thyron, F. y Mátyás, T. 1998. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Research International*. 31(10):723-728.
- Skandamis, P. N. y Nychas, G. J. 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 79:35-45.
- Skandamis, P. N. y Nychas, G. J. E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91:1011-1022.
- Skandamis, P. N. y Nychas, G. J. E. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:h7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1646-1653.
- Skandamis, P. N., Tsigarida, E. y Nychas, G. J. 2002a. Ecophysiological attributes of *Salmonella*

- typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16:31-35.
- Skandamis, P. N., Tsigarida, E. y Nychas, G. J. 2002b. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*. 19:97-103
- Smid, E. J. y Gorris, L. G. M. 1999. Natural antimicrobials for food preservation. En: M. S. Rhaman. *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekker. Nueva York. pp.285-308.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. y Fyfe, L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*. 18:463-470.
- Sofos, J. N., Beuchat, L. R., Davidson, P.M. y Johnson, E. A. 1998. *Naturally Occurring Antimicrobials in Food*. Task Force Report No. 132. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, IA. 103p.
- Tainter, R. y Grenis, A. 1993. *Especies y aromatizantes alimentarios*. Primera edición. Acribia. España. 260p.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K. y Nychas, G. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*. 33:273-280.
- Thoroski, J., Blank, G. y Biliaderis, C. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. 52:399-403.
- Tsigarida, E., Skandamis, P. y Nychas, G. J. E. 2000. Behavior of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology*. 89:901-909.
- Turina Adel, V., Nolan, M., Zygadlo, J. y Perillo, M. 2006. Natural terpenes: Self assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*. 122:101-113.
- Ultee, A. y Smid, E. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*. 64:373-378.
- Ultee, A., Bennink, M. y Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:1561-1568.
- Ultee, A., Kets, E. y Smid, E. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*. 65(10):4606-4610.
- Ultee, A., Slump, R., Steging, G. y Smid, E. J. 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*. 63:620-624.
- Veldhuizen, E., Bokhoven, J., Zweijter, C., Burt, S. y Haagsman, H. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:1874-1879.
- Vokou, S., Kokkini, S. y Bessiere, J. 1993. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemistry System Ecology*. 21:287-295.
- Wan, J., Wilcock, A. y Coventry, M. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*. 84:152-158.
- Weissinger, W., McWatters, K. y Beuchat, L. R. 2001. Evaluation of volatile chemical treatments for lethality to *Salmonella* on alfalfa seeds and sprouts. *Journal of Food Protection*. 64:442-450.
- Wendakoon, C. N. y Sakaguchi, M. 1995. Inhibition of aminoacid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*. 58:280-283.
- Wilkins, C. y Madsen, J. 1991. Oregano headspace constituents. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*. 192:214-219.
- Wilkins, K. y Board, R. 1989. Natural antimicrobial systems. En: G. W. Would. (Ed). *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Elsevier Science Publishers Ltd., Nueva York. pp.285-362



Viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado en matrices de alginato incorporado a helado

R. Villa-Rojas*, A. López-Malo y S. C. Beristain-Bauza

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas – Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México.*

RESUMEN

En este trabajo se estudió la viabilidad de *L. acidophilus* encapsulado en diferentes matrices de alginato y adicionado a un helado de manzana-kiwi, durante 84 días de almacenamiento, y la aceptabilidad que dicho producto tiene entre los consumidores. Se hicieron recuentos del microorganismo cada 72 horas durante el primer mes, cada semana durante el siguiente mes, y cada 15 días durante el último mes. Los resultados obtenidos mostraron que el número de colonias del *L. acidophilus* se mantuvo para todos los sistemas de helados en valores superiores a 10^7 UFC/g, cumpliendo con el número poblacional necesario para clasificarlos como alimentos probióticos. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las propiedades fisicoquímicas analizadas (pH, acidez titulable y color); ni en la evaluación de los atributos sensoriales, al comparar el helado con el sistema de encapsulación nueve (sistema con mayor población de probiótico) contra control, obteniendo calificaciones de aceptación en color, sabor, aroma, textura y aspecto general.

Palabras claves: Helados, probióticos, encapsulación, alimentos funcionales, *L. acidophilus*.

ABSTRACT

This research studied the viability of *L. acidophilus* encapsulated in different alginate matrixes and added to an apple-kiwi ice cream during a 84 days storage period and the level of acceptability the consumer have for the product. The counts of viable microorganisms were obtain every 72 hours during the first month, every week during the second month and every 15 days during the last month showing that *L. acidophilus* was viable in all systems ($>10^7$ CFU/g) and reaching the necessary population to be classified as a probiotic food. The product's physicochemical properties (pH, tritratable acidity and color) did not present a significant ($p > 0.05$) variation during the storage period and the sensory analysis, using the ice cream with the encapsulation system nine (system with the highest population count), showed a good acceptability for all the attributes evaluated (color, taste aroma, texture, general aspect) with no significant ($p > 0.05$) difference with the control.

Keywords: Ice cream, *L. acidophilus*, probiotics, encapsulation, functional foods.

* Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Direccion electrónica: hareli.pluna@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales, aquellos que proveen algún beneficio a la salud del consumidor además de su aporte nutrimental, son una tendencia en el campo de la biotecnología de alimentos y los productos probióticos forman parte de este desarrollo (Patel *et al.*, 2008). Un grupo de microorganismos muy usado en la industria alimentaria como cultivo probiótico es el de las bacterias ácido lácticas (BAL); entre los géneros más utilizados se encuentran *Lactobacillus* y *Streptococcus*, así como los *Bifidobacterium*, aunque éstos no son propiamente BAL, pero son utilizados a menudo en productos lácteos fermentados (Chukeatirote, 2003; Corthier, 2004; Mortazavian *et al.*, 2007; Komatsu *et al.*, 2008). Para clasificar a alimentos probióticos como funcionales se requiere que la población microbiana probiótica oscile entre 10^6 y 10^7 UFC/g en el producto que llega al consumidor (Kosin y Rakshit, 2006); esto basado en estudios como los realizados por Vanderhoof y Young (1998) donde muestran que con una ingesta de entre 10^8 y 10^{11} UFC/día, se logran beneficios en la salud del consumidor.

Un probiótico muy popular en la industria láctea es *L. acidophilus*, una bacteria Gram (+), anaerobia facultativa, homofermentativa, nativa del tracto gastrointestinal, boca y vagina del ser humano, que se usa en varios productos comerciales que van desde leche hasta yogurt para beber (Chukeatirote, 2003). Champagne *et al.* (2005) reportan que se encuentra presente en el 60% del yogurt refrigerado producido en Estados Unidos de América (EUA).

Este microorganismo presenta ciertos beneficios a la salud, como la generación de metabolitos con actividad antimicrobiana, principalmente la lactocidina que en estudios “*in vivo*” ha inhibido bacterias como

Helicobacter pylori, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei* (Danone vitapole research, 1997; Hilton *et al.*, 1992). Además presenta actividad hipocolesterolemica (Danone vitapole research, 1997; Suvarna y Boby, 2005) e inmunomodulante (Danone vitapole research, 1997). Sin embargo, la viabilidad de estos microorganismos se puede ver afectada por los procesos a los cuales son sometidos durante la elaboración de los productos, teniendo pérdidas hasta de al menos un ciclo logarítmico de la población. Por ello, varios investigadores han estudiado diferentes métodos para evitar la declinación de la población tales como utilizar suplementos que ayuden al crecimiento y evaluar el cambio de algunos pasos del proceso como ajustes en las temperaturas de incubación, adición de enzimas, adición de compuestos que afectan las condiciones redox del medio y la encapsulación (Champagne *et al.*, 2005).

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas son introducidas en una matriz o sistema pared, para protegerlas de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno (Yañez *et al.*, 2002). En el caso de probióticos, los encapsulantes más usados son alginatos y sus combinaciones, almidón, mezclas con goma xantana, mezclas con carragenina, gelatina, acetato-ftalato-celulosa y quitosano (Mortazavian *et al.*, 2007).

Los alginatos, hidrocoloides extraídos de algas que reaccionan con iones calcio para la formación de geles estables, son un material muy utilizado principalmente para la encapsulación de BAL en concentraciones que van del 0.5 al 4% (Sheu y Marshall, 1991; Sheu y Marshall, 1993; Kim *et al.*, 1996; Jankowski *et al.*, 1997; Kebary *et al.*, 1998; Khalil y Mansour, 1998; Lee y Heo,

2000; Shah y Rarula, 2000; Sultana *et al.*, 2000; Truelstrup-Hansen *et al.*, 2002; Krasaekoopt *et al.*, 2004). Presenta varias ventajas como su facilidad para formar matrices de gel alrededor de las células bacterianas con un diámetro de 1-3 μm para la cápsula y poros en la superficie que no exceden los 7nm, no son tóxicos, son de bajo costo, las condiciones de proceso no son severas (temperatura), se preparan fácilmente y se disuelven en el intestino liberando a las bacterias (Klien *et al.*, 1983; Tanaka *et al.*, 1984; Martinsen *et al.*, 1989; Prevost y Divies, 1992; Dimantov *et al.*, 2003; Chandramouli *et al.*, 2004; Gouin, 2004). Las desventajas que presentan son su susceptibilidad a los ambientes ácidos que los hacen perder su integridad y estabilidad mecánica (Eikmeier y Rehm, 1987; Roy *et al.*, 1987; Audet *et al.*, 1988; Ellenton, 1998).

También, debido a que el gel se forma en presencia de iones de calcio, la integridad del mismo se ve comprometida cuando se encuentra con iones monovalentes o agentes quelantes que absorben iones de calcio como lactatos, citratos o fosfatos (Roy *et al.*, 1987; Smidsrod y Skjak-Braek, 1990; Ellenton, 1998). Estos defectos se pueden compensar al mezclar el alginato con otros compuestos poliméricos, recubrirlo con otros compuestos y modificar su estructura con aditivos (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

Este trabajo pretende evaluar la viabilidad del *Lactobacillus acidophilus* adicionado a un helado hecho a base de kiwi y manzana; analizando el efecto de la encapsulación en matrices formadas con alginato y citrato y del tiempo de almacenamiento en congelación.

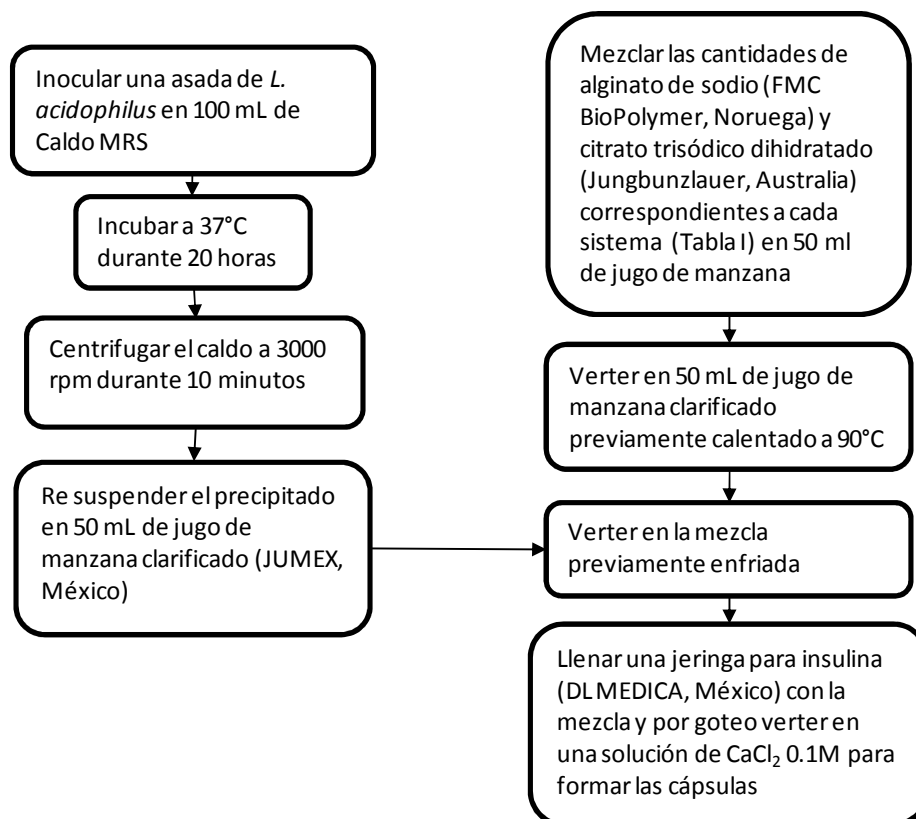


Fig1. Proceso de encapsulación de *L.*

MATERIALES Y METODOS

Estandarización del inóculo

L. acidophilus L10 fue extraído del producto probiótico LAFTI® L10 (DSM, Holanda). El contenido en polvo (1 g) se agregó a 100 mL de caldo MRS (MERCK, Alemania) y se colocó en una incubadora (Imperial III, Lab Line, EUA) a 37°C durante 20 horas, para posteriormente inocularlo en cuñas de agar MRS, incubarlo a 37°C de 48 a 72 horas en condiciones de anaerobiosis y posteriormente conservarlo en refrigeración (7°C).

Técnica de encapsulación

La técnica de encapsulación aplicado a los nueve sistemas estudiados (Tabla I) es la propuesta por Lee y Heo (2000) y se presenta en la Figura 1.

Las cantidades de alginato y citrato utilizadas para cada sistema se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Sistemas elaborados para la encapsulación de *L. acidophilus*

Sistema	Alginato (g)	Citrato (g)
Encapsulación 1	1	0.09
Encapsulación 2	1	0.18
Encapsulación 3	1	0.27
Encapsulación 4	2	0.09
Encapsulación 5	2	0.18
Encapsulación 6	2	0.27
Encapsulación 7	3	0.09
Encapsulación 8	3	0.18
Encapsulación 9	3	0.27

Las cápsulas fueron elaboradas por el proceso de gelación iónica, presentando un diámetro aproximado de 2-3 mm debido al tamaño de la aguja de insulina; se busca que las cápsulas sean lo más pequeñas posible para evitar la detección por el consumidor.

Esta técnica ha sido aplicada a la encapsulación de BAL, principalmente para

observar su viabilidad en medios ácidos (Fávaro-Trindade y Grosso, 2002; Muthukumarasamy *et al.* 2006).

El citrato trisódico se utiliza en la formación de la cápsula debido a que al adicionarlo aumenta la cantidad de cationes monovalentes del alginato de sodio, mejorando el intercambio iónico y formando una estructura más firme.

Elaboración del helado

El helado se elaboró mezclando la base para helado con la proporción adecuada de ingredientes, como se indica en la Tabla II.

La fruta (previamente licuada para formar la pulpa), azúcar, base para helado y colorante, se incorporaron en la heladera (Modelo 358, KRUPS, Italia) a -40 °C. La mezcla se batió de 20 a 30 minutos, hasta obtener la consistencia cremosa deseada. Durante este proceso se evaluó la curva de congelación del producto monitoreando la temperatura de la mezcla con un lector (928000-00, Cole-Parmer Digi-sense ® Scanning Thermocouple Thermometer, EUA) y tomando muestras de helado cada minuto; este proceso se siguió para evitar la inmersión de los termopares en el equipo y provocar que se enredaran por el proceso de agitación que se llevaba a cabo.

Posteriormente se adicionaron las cápsulas que contenían al *L. acidophilus* en una proporción de 10 gramos de cápsulas por 90 gramos de helado con la finalidad de obtener los recuentos de microorganismos adecuados para cumplir con las especificaciones para alimentos probióticos. Se elaboraron nueve helados diferentes, uno para cada sistema de encapsulación, y se almacenaron a -10°C durante 84 días.

Tabla II. Formulación del helado

Ingrediente	%
Base para helado tipo "suprema" (ILSA FRIGO, México)	64.81
Manzana <i>Granny Smith</i> (mercado local)	19.11
Kiwi <i>Hayward</i> (mercado local)	11.47
Azúcar refinada comercial (Potrero S.A, México)	4.58
Colorante verde artificial en polvo (McCormick, México)	0.03

Porcentaje de aireación (Overrun)

Para determinar el porcentaje de aireación en el helado se midió el volumen de la mezcla (base, pulpa de fruta, azúcar y colorante) antes de incorporarla a la heladera y, una vez terminado el proceso de congelación, se midió el volumen del helado. El porcentaje de aireación se calculó con la Ec. 1 (Di Bartolo, 2005):

$$\% \text{ Aireación} = \frac{\text{Vol. helado} - \text{Vol. mezcla}}{\text{Vol. mezcla}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Análisis bromatológico

Se determinó el contenido de humedad de acuerdo a lo establecido en el método 22.013 de la AOAC (1984); las cenizas se obtuvieron con el método 31.012 del AOAC (1984); para evaluar el contenido de proteínas se empleo el método Kjeldahl (16.314 de la AOAC, 1984) que evalúa el contenido de nitrógeno total en la muestra, la grasa se evaluó con el método Mojonier (16.316 de la AOAC, 1984); y los carbohidratos se obtuvieron por diferencia a 100. La fibra se obtuvo por medio del método 22.042 de la AOAC (1984).

pH y acidez titulable

El pH del helado se determinó durante el periodo de almacenamiento, por el método 32.016 de la AOAC (1984) que consiste en la inmersión del electrodo de un potenciómetro

(PHI 34, Beckman, EUA) en la muestra. La acidez titulable se midió cada siete días durante un periodo de 84 días, según el método 942. 15 (37.1.37) de la AOAC (1996), expresándola como porcentaje de ácido málico por la cantidad de manzana que contenía el producto.

Color

Se midió el color al helado, por triplicado, utilizando un colorímetro (Color Gardner System 05, Gardner Laboratory, EUA) previamente calibrado para medir reflectancia, empleando la escala triestímulo de Hunter y midiendo los parámetros *L*, *a* y *b*, a partir de los cuales se calcularon el tono (*h*), el croma (*C*) y la diferencia neta de color (ΔE), utilizando las siguientes ecuaciones:

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{b}{a} \right) \quad (\text{Ec. 2})$$

$$C^{ab} = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2} \quad (\text{Ec. 4})$$

Viabilidad del microorganismo

Se determinó la viabilidad del *L. acidophilus* en todos los sistemas de helado, inoculando 10 g de muestra en 90 mL de citrato de sodio al 1% previamente esterilizado, con la finalidad de que las cápsulas se disolvieran y

liberaran el microorganismo para después sembrar, por duplicado, las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en agar MRS (MERCK, Alemania), incubando las cajas a 37°C durante 2 días en condiciones anaerobias en una incubadora (310, Imperial Lab Line, EUA), para obtener el recuento de UFC / g de producto.

El conteo se hizo a varios periodos de tiempo comenzando con el día de la elaboración, después cada 72 horas durante un mes, cada semana durante el siguiente mes y finalmente cada 15 días durante el último mes; cumpliendo así un total de tres meses de estudio de la viabilidad del microorganismo.

Análisis microbiológico de la base y el helado con probióticos

Se realizó un análisis microbiológico a la base y al helado para determinar la incidencia de los siguientes microorganismos: mesófilos aerobios, coliformes totales y *Salmonella*; así como mohos y levaduras sólo para el helado.

Las bacterias mesófilas aerobias se sembraron por vertido en placas de agar nutritivo (MERCK, Alemania), por duplicado, las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , incubando durante 24 horas a 37°C en una incubadora (310, Imperial Lab Line, EUA).

En el caso del recuento de coliformes totales se utilizó agar Verde-brillante-bilis (VRB) (MERCK, Alemania) para sembrar en placas por duplicado y posteriormente incubar a 37°C durante 24 horas en una incubadora (310, Imperial Lab Line, EUA).

La metodología propuesta por la NOM 114-SSA-1994 fue la utilizada para el conteo de *Salmonella*.

Los mohos y levaduras se determinaron sembrando en placas de agar Papa dextrosa (PDA) (MERCK, Alemania), por duplicado, las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , incubando de 72 a 96 horas a 25°C en una incubadora (EC 41, Ríos Rocha S.A., México).

El muestreo del helado se hizo a varios periodos de tiempo comenzando con el día de la elaboración del helado, después cada 72 horas durante un mes, cada semana durante el siguiente mes y finalmente cada 15 días durante el último mes, cumpliendo así un total de 84 días.

Evaluación Sensorial

Para determinar la aceptación del producto por el consumidor, se evaluaron el helado con el probiótico encapsulado en el sistema nueve (que mostró la mayor sobrevivencia de *L. acidophilus*) y el helado sin probióticos en cuanto a textura, sabor, olor, color y aceptabilidad general, utilizando una prueba afectiva con escala hedónica estructurada de nueve puntos, con la participación de 20 jueces no entrenados.

Análisis de datos

El software utilizado para el análisis de datos fue el siguiente: para el análisis de varianza (ANOVA) se utilizó el software Minitab (v.13.1, Minitab Inc.), el análisis de superficie de respuesta se elaboró con el software Design Expert® (v. 6.0.6, Stat-Ease® Software) y las gráficas se realizaron en Microsoft® Office Excel (v. 2003, Microsoft® Co.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del helado

El tiempo del proceso de congelación fue de 19 minutos, que fue el necesario para adquirir la consistencia deseada llegando a una temperatura final de -4.5°C . Aguilera (2003) alcanzó la consistencia deseada para helado de chocolate, el cual tiene mayor concentración de sólidos, a una temperatura final de -8°C ; por tanto resulta lógico que la temperatura final para alcanzar la consistencia deseada en el helado de frutas haya sido más baja, ya que éste tiene un mayor contenido de agua.

El porcentaje de aireación de la muestra fue de 85.5%. Di Bartolo (2005) reporta que el porcentaje adecuado es de 85%, por lo que el producto mostró un valor adecuado y el proceso fue correctamente aplicado.

Análisis bromatológico

Los valores encontrados en este trabajo (Tabla III) se encuentran entre los intervalos establecidos para la elaboración de helados reportados por Di Bartolo (2005) y Arbuckle (1986). Los rangos establecidos para un helado son: grasa 2-8%, proteínas 1-6%, carbohidratos 7-22%, agua 50-78%. Sin embargo, estos valores pueden variar dependiendo de la concentración de los ingredientes utilizados para la elaboración del helado. En este caso la adición de fruta es un factor importante en los valores que toman los componentes causando que el contenido de agua sea superior a lo esperado de acuerdo con el intervalo reportado.

Tabla III. Análisis bromatológico

Compuesto	%
Humedad	84.40
Grasas	5.70
Carbohidratos totales	8.42
Fibra	0.50
Proteínas	1.22
Cenizas	0.26

pH y acidez

Se encontró que durante el almacenamiento (84 días) todos los helados, con los probióticos encapsulados en los nueve diferentes sistemas, presentaron un decremento de pH, de 4.1 a 3.8 aproximadamente, sin variación significativa ($p>0.05$) entre ellos. La importancia de monitorear el pH reside en que este afecta a los polisacáridos que se comportan como electrolitos (goma arábiga, alginato, carrageninas) alterando su conformación debido a las cargas intramoleculares, lo que da como resultado la modificación de la permeabilidad de las películas que se forman y de la eficiencia de encapsulación (Pedroza, 2002), permitiendo la interacción entre los compuestos encapsulados y el producto.

En lo que respecta al porcentaje de acidez, se presentó una tendencia inversa a la del pH, incrementando, de 0.04 a 0.06% aproximadamente, en todos los sistemas de helados con probióticos durante su almacenamiento sin diferencia significativa entre los sistemas ($p>0.05$).

Color

Los parámetros de color, *Lh*, *ah* y *bh*, presentaron un decremento entre los diferentes sistemas de helado.

Los valores de luminosidad estuvieron en un intervalo de 73.45 a 71.68 para todos los productos, sin diferencia significativa entre los sistemas ($p>0.05$). En cuanto al parámetro *ah*, los valores variaron de -8.43 a -8.53 y los de *bh* de 18.86 a 20.02. El tono (*h*) presentó valores entre 114.08° y 113.09°, sin diferencia significativa entre los sistemas ($p>0.05$).

El croma (*C*) o saturación presentó valores entre 21.76 y 21.83 sin diferencia significativa entre los sistemas ($p>0.05$). Y la diferencia neta de color (ΔE) fue de 0.06 a 2.18 sin diferencia significativa entre los sistemas ($p>0.05$).

Viabilidad del microorganismo *L. acidophilus*

La técnica de encapsulación tuvo un efecto notable sobre la viabilidad del

microorganismo, ya que se obtuvo una reducción en la población de casi un ciclo logarítmico después de la encapsulación. Para mantener esta disminución de población al mínimo, hay un punto crítico a tomar en cuenta en este proceso y es la adición de los *Lactobacilos* a la mezcla con alginato, la cual debe hacerse a una temperatura menor a 40°C para evitar que el microorganismo muera debido a las altas temperaturas.

Los resultados obtenidos en el recuento de *L. acidophilus* en el helado, durante el almacenamiento, se muestran en la Figura 2. La gráfica muestra un efecto claro del contenido de alginato, al presentar tres distintivos grupos o familias de curvas. La primera ubicada en la parte inferior que se compone de los sistemas de encapsulación con 1g de alginato y que tuvieron el menor recuento de población a lo largo del estudio; la segunda, ubicada en la sección intermedia,

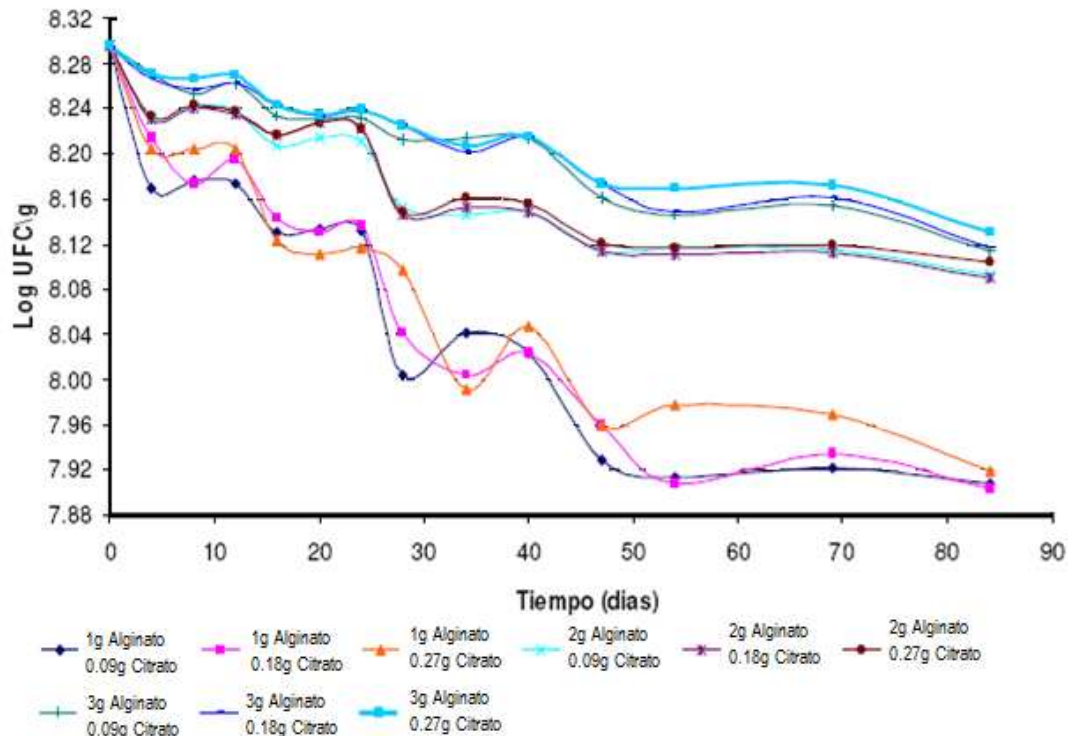


Fig. 2. Viabilidad de *L. acidophilus* encapsulado en diferentes sistemas y adicionado a un helado de manzana-kiwi almacenado a -10°C durante 84 días

se conforma de los sistemas que contienen 2g de alginato con un recuento mayor a los sistemas anteriores; y por último la familia de curvas que se encuentra en la parte superior y que se conforma por los sistemas con 3g de alginato y que obtuvieron el mayor recuento de *L. acidophilus* durante el estudio. En este último conjunto de curvas se encuentra el sistema nueve, formulado con 3 g de alginato de sodio y 0.27g de citrato trisódico, el cual presentó la mayor población microbiana durante el periodo de almacenamiento.

Se realizó además un análisis de superficie de respuesta (Figura 3) para observar los efectos de las variaciones en la concentración de alginato y citrato trisódico sobre la

viabilidad de *L. acidophilus* a diferentes tiempos de almacenamiento congelado (4, 20 y 84 días). El análisis confirma lo observado en la Figura 2 respecto a la concentración de alginato la cual tiene un efecto significativo ($p<0.05$) en la viabilidad del microorganismo durante los tiempos de almacenamiento escogidos, mientras que la concentración de citrato trisódico no presenta efecto significativo ($p>0.05$).

El efecto del alginato, donde al aumentar la cantidad de éste la viabilidad de *L.acidophilus* es mayor, se puede atribuir a que las cápsulas que contienen mayor cantidad de alginato de sodio proveen al microorganismo de una capa más gruesa que lo protege mejor ante diferentes procesos,

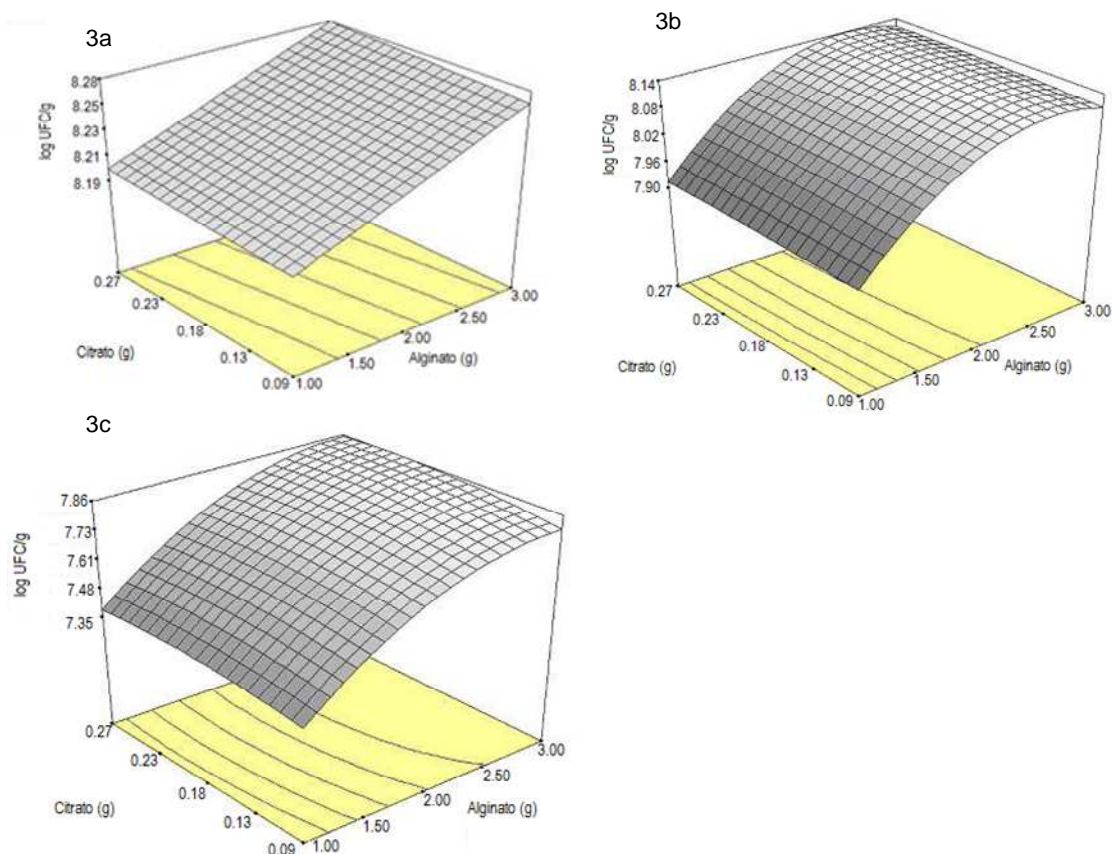


Fig. 3. Efecto de las concentraciones de Alginato y citrato trisódico en un sistema de encapsulación sobre la viabilidad de *L.acidophilus* adicionado a un helado de manzana-kiwi a los: a) 4, b) 20 y c) 84 días de almacenamiento a -10°C .

como puede ser la congelación, el secado, o cambios en pH (Sheu y Marshall, 1993).

También se observó que conforme transcurrió el tiempo las cantidades de UFC/g de *L. acidophilus* fueron decreciendo al término del periodo de almacenamiento, obteniendo una reducción menor a un ciclo logarítmico, con una caída pronunciada para los sistemas con 1g de alginato y menos acentuada para aquellos que contenían 2 y 3g del compuesto.

En estudios realizados por Hekmat y McMahon (1992), donde se inocularon *B. bifidum* y *L. acidophilus* a un helado almacenado por 17 semanas a -29°C, se encontró que la población *L. acidophilus* de 1.5×10^8 UFC/mL se redujo a 4×10^6 UFC/mL, aproximadamente dos ciclos logarítmicos; mientras que Corrales *et al.* (2007) encontraron que la disminución de población para el *L. acidophilus* inoculado junto con *Bifidobacterium lactis* en un helado almacenado a -30°C por 85 días era de 1.2 ciclos logarítmicos. Por lo tanto, al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los estudios en los cuales no se encapsula el microorganismo, se puede observar que la técnica de encapsulación provee una buena protección para el *L. acidophilus* contra el daño en el proceso de congelación, manteniendo poblaciones más altas que en

productos con el microorganismo libre.

Análisis microbiológico

Se realizó un análisis microbiológico a la base para la elaboración de helado y para al helado inoculado con *L. acidophilus* recién manufacturado, para los cuales se determinaron bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y *Salmonella*.

Los resultados de estos análisis muestran que tanto la base para helado como el helado inoculado se encontraban dentro de los límites de tolerancia para bacterias mesófilas aerobias (<200,00 UFC/g), coliformes totales (<100 UFC/g) y *Salmonella* (ausente) señalados por la Norma Oficial Mexicana NOM 036-SSA1-1993, por lo que se consideraron como productos inocuos para su consumo.

Evaluación sensorial

Los resultados obtenidos para cada atributo evaluado se presentan en la tabla IV. Se observa que el color, sabor y aceptación general obtuvieron calificación aprobatoria (calificación >7) para ambas muestras, así como la textura del helado control (sinprobiótico). Sin embargo, el aroma de los dos helados y la textura del probiótico no fueron totalmente aceptados por los jueces

Tabla IV. Calificaciones obtenidas en la evaluación sensorial de helado con y sin *L. acidophilus* encapsulado

Atributo	Helado con probiótico encapsulado en un sistema con 3g de alginato y 0.27g de citrato		Helado sin probiótico	
	Calificación		Calificación	
	Media	D. estándar	Media	D. estándar
Color	8.35	0.59	8.40	0.60
Sabor	8.00	0.73	8.05	0.69
Aroma	6.60	0.88	6.45	1.00
Textura	6.75	1.02	8.00	0.46
Aceptación general	7.90	0.64	8.00	0.56

(calificación<7); aunque ninguno de los atributos mostró diferencia significativa ($p>0.05$) entre el helado sin y con probióticos.

CONCLUSIONES

El *L. acidophilus*, encapsulado en matrices de alginato de sodio y citrato trisódico deshidratado, es viable en helado de kiwi-manzana almacenado durante 84 días a -10°C sin tener cambios significativos en los atributos fisicoquímicos del producto (pH, acidez titulable, color) y teniendo buena aceptación con el consumidor.

La concentración de alginato de sodio tiene un efecto significativo en la viabilidad del microorganismo, donde al usar mayor concentración se obtiene una mayor protección para el microorganismo.

REFERENCIAS

- Aguilera, A. B. 2003. *Elaboración y caracterización de un Helado Funcional*. Tesis de Licenciatura de la Universidad de las Américas, Puebla.
- AOAC. 1984. *Official methods of analysis*. Décimo cuarta edición. Association of Official Analytical Chemists. Inc. Washington, D.C. E.U.A. 284, 308, 318, 415, 419, 575 p.
- AOAC. 1996. *Official methods of analysis*. 16^o edición. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- Arbuckle, W.S. 1986. *Ice cream*. Cuarta Edición. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut. 40, 187, 207-212, 317-322 y 365 p.
- Audet, P., Paquin, C. y Lacroix, C. 1988. Immobilized growing lactic acid bacteria with κ -carrageenan-locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29:11-18.
- Champagne, C. P., Gardner, N. J. y Roy, D. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:61-84.
- Chandramouli, V., Kalasapathy, K., Peiris, P. y Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Chukeatirote, E. 2003. Potential use of probiotics. *Songklanakarin Journal Science Technology*. 25(2):275-282.
- Corthier, G. 2004. Los beneficios de los probióticos para la salud. *Danone Nutritopics Vitapole*. París, Francia. 29:1-17.
- Corrales, A., Henderson, M. y Morales, I. 2007. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. *Revista Chilena de Nutrición*. 34(2):157-163.
- Danone vitapole research. 1997. *Danone World Newsletter 13. Lactobacillus acidophilus*. http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/esp/news_13/sum.html, accesado 14/10/2005.
- Di Bartolo, E. 2005. Guía de Elaboración de Helados. Secretaria de Agricultura, ganadería, pesca y alimentos. *Alimentos argentinos*. (1):2-59
- Dimantov, A., Greenberg, M., Kesselman, E., Shimoni. 2003. Study of high amylase corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model systems. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Eikmeier, H. y Rehm, H. J. 1987. Stability of calcium-alginate during citric acid production of immobilized *Aspergillus niger*. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Ellenton, J. C. 1998. Encapsulation bifidobacteria. *Master thesis*, University of Guelph. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.

- Fávaro-Trindade, C.S. y Grosso, C.R.F. 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*. 19:485-494.
- Gouin, S. 2004. Microencapsulation-industrial appraisal of existing technologies and trend. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Hekmat, S. y McMahon, D.J. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*. 75:1415-1422.
- Hilton, E., Isenberg, H.D., Alperstein, P., France, K. y Borenstein, M.T. 1992. Ingestión of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candida vaginitis. *Annals of Internal Medicine*. 116:353-357.
- Jankowski, T., Zielinska, M. y wysakowska. 1997. Encapsulation of lactic and bacteria with alginate/starch capsules. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Kebary, K. M. K., Hussein, S. A. y Badawi, R. M. 1998. Improving viability of *Bifidobacterium* and their effect on frozen ice milk. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Khalil, A. H. y Mansour, E. H. 1998. Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Kim, I. K., Baek, Y. J. y Yoon, Y. H. 1996. Effects of dehydration media and immobilization in calcium-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Klien, J., Stock, J. y Vorlop, K. D. 1983. Pore size and properties of spherical calcium alginate biocatalysts. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Komatsu, T. R.; Alonso-Buriti, F. C. y Isay-Saad, S. M. 2008. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 44 (3): 329-347.
- Kosin, B. y Rakshit, S.K. 2006. Criteria for Production of Probiotics. *Food Technology and Biotechnology*. 44(3):371-379.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Lee, K. I., Heo, T. R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Martinsen, A., Skjak-Braek, C. y Smidsrod. 1989. Alginate as immobilization material: 1. correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R. y Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.

- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P. y Holley, R. 2006. Stability of *L. reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*. 71(1):20-24.
- Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA1-1993. *Bienes y servicios. Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados. Especificaciones Sanitarias*. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/036ssa13.html>, accesado 20/01/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. *Bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos*. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html, accesado 12/01/2006.
- Patel, P.; Parekh, T. y Subhash, R. 2008. Development of probiotic and synbiotic chocolate mousse: a functional food. *Biotechnology*. 7(4): 769-774.
- Pedroza, I. R. 2002. Alimentos microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la microencapsulación de alimentos. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición. Cancún, Quintana Roo, México.
- Prevost, H. y Divies, C. 1992. Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gel beads. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Roy, D., Goulet, J. y Leduy, A. 1987. Continues production of lactic acid from whey permeate by free and calcium-alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Shah, N. P. y Rarula, R. R. 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*. 55:139-144.
- Sheu, T. Y. y Marshall, R. T. 1991. Improving culture viability in frozen dairy desserts by microencapsulation. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Sheu, T. Y. y Marshall, R. T. 1993. Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gel. *Journal of Food Science*. 54(3):557-561
- Smidsrod, O. y Skjak-Braek, G. 1990. Alginate for cell immobilization. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. y Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Suvarna, V. C. y Bobby, V.U. 2005. Probiotics in human health: A current assessment. *Current Science*. 88 (11):1744-1748.
- Tanaka, H., Masatose, M. y Veleky, I. A. 1984. Diffusion characteristics of substrates in calcium-alginate beads. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1):1-18.
- Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L. y Paulson, A. T. 2002. Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in simulated gastro-intestinal conditions. En: A. Mortazavia, S. H. Razavi, M. R. Ehsani y S. Sohrabvandi. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5 (1): 1-18.
- Vanderhoof, J. A. y Young, R.J. 1998. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *Journal of Paediatric, Gastroenterology and Nutrition*. 27:323-332.
- Yáñez, F.J., Salazar, M. J., Chaires, M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R.M., Y Ramos, R. E. 2002. Aplicaciones Biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*. (1):313-319.



Aplicaciones del ultrasonido en el tratamiento de alimentos

J. Gómez – Díaz ^{*} y A. López – Malo

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

El empleo de métodos alternativos al tratamiento térmico para la conservación de alimentos, con el uso de las denominadas tecnologías emergentes, ha logrado mayor auge actualmente. Las tecnologías en alimentos buscan satisfacer las necesidades del consumidor por obtener productos frescos y con características nutrimentales y de inocuidad adecuadas. El empleo de ondas ultrasónicas aplicadas directamente al alimento, mejora sus propiedades y garantiza la seguridad del producto. El presente artículo proporciona información sobre diversas aplicaciones del ultrasonido de alta intensidad en alimentos, como un método seguro y conveniente, enfatizando sus efectos al homogenizar, encapsular, inactivar o inhibir distintos componentes que se encuentran como parte de la matriz alimenticia. Con este conocimiento se podrá considerar al ultrasonido como una tecnología viable, atrayendo el interés de su aplicación en la ciencia y tecnología de alimentos, tanto en el análisis como en la modificación de sus propiedades, aportando beneficios durante su procesamiento y conservación.

Palabras clave: *Ultrasonido, cavitación, inactivación enzimática, inhibición microbiana.*

Abstract

The use of alternative methods to heat treatment, have been applied to food preservation, with the so called emerging technologies, has showed a major improvement nowadays. Food technologists are looking to satisfy the consumer demands of having freshness and nutritional components in food, being innocuous at the same time. The use of high intensity ultrasound, applied to food, guarantees the development of wished food properties, assuring the consumer's safety. This paper gives information about the mechanism of high intensity ultrasound applications in food industry, as a safety and convenient method, focusing on the effects of homogenization, encapsulation, inactivation or inhibition of different kinds of components presents in the food matrix. With this knowledge, ultrasound will be considered as a proper technology, gaining the interest for its application in science development and food technology research, as an analysis technique and for food properties modification, obtaining good results on processing and conservation of food.

Keywords: *Ultrasound, cavitation, enzyme inactivation, microbial inhibition.*

^{*} Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: juan.gomezdiz@udlap.mx

Introducción

La creciente demanda de productos con aspecto fresco, ha promovido el empleo de métodos alternativos de conservación, que además no modifiquen los componentes intrínsecos del alimento. El consumo de alimentos sanos ha sido un tema de interés, sobre todo aquellos que garanticen la inocuidad, las características nutrimentales y los aspectos sensoriales del mismo. El ultrasonido se define como la energía generada por ondas sónicas de 20 kHz o más vibraciones por segundo (Hoover, 2000). El empleo del ultrasonido de alta intensidad o también conocido como de poder o de baja frecuencia, ha demostrado ser una tecnología emergente viable para el tratamiento de alimentos, promoviendo la homogenización y la emulsificación de sus ingredientes, la conservación al inactivar enzimas responsables del deterioro fisicoquímico, el mejoramiento de la calidad sensorial y prolongar la vida útil de los productos al inhibir el crecimiento microbiano (Mason *et al.*, 2005). Por otro lado, promueve reacciones de oxidación, ayuda en los procesos de difusión, así como en la modificación de la cristalización (López-Malo *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista de conservación de alimentos, es de interés el ultrasonido de baja frecuencia, por obtener cambios físicos y químicos deseables en el producto, con los intervalos de frecuencia de 20 a 100 kHz (niveles de potencia de 10 a 1000 W/cm²), por medio del fenómeno de cavitación (McClements, 1995). En la industria alimenticia, el ultrasonido se utiliza tradicionalmente en la homogenización de emulsiones, la ruptura de células, la limpieza de material, la dispersión de sólidos, la remoción de gases disueltos en medios líquidos, entre otros.

Se ha demostrado su efecto inhibitor sobre el crecimiento de esporas microbianas resistentes al calor, al tratar las muestras con la combinación de ultrasonido, presión y temperatura, lo que se denomina manotermosonicación (MTS) (Vercet *et al.* 1999; Condón *et al.*, 2005).

Derivado de lo anterior, el presente artículo surge como una referencia para entender el empleo del ultrasonido en temas como extracción de aceites esenciales, inactivación enzimática y microbiana, mejoramiento de los procesos de congelación y descongelación, entre otros. En este trabajo se citan investigaciones de diversas áreas tecnológicas que han utilizado al ultrasonido de baja frecuencia o de poder, como una alternativa para mejorar el tratamiento de alimentos.

Dicha información se pone al alcance del público que cada vez se encuentra más interesado en conocer de qué están constituidos sus alimentos, su forma de procesamiento y cómo prevenir enfermedades al consumir productos inocuos.

Revisión bibliográfica

1. Definición

El ultrasonido consta de ondas elásticas cuya frecuencia se transmite sobre el umbral del oído humano (aproximadamente 20 kHz) (Mason *et al.*, 2005). Se pueden distinguir tres tipos de ondas: longitudinales, que se desplazan en el sentido del ordenamiento de las partículas; ondas tipo esquiroleo, que se mueven de forma perpendicular a tal ordenamiento; y las tipo Rayleigh, que viajan muy cercanas a la superficie (Mulet *et al.*, 2002).

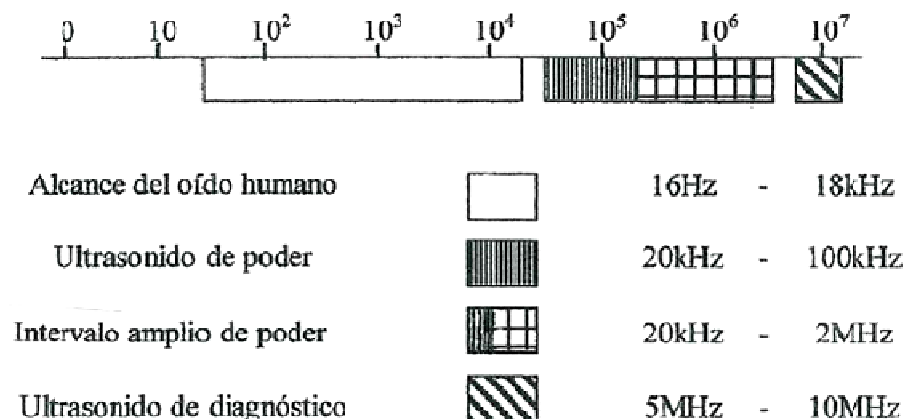


Fig. 1. Intervalos de frecuencia del sonido (Mason *et al.*, 2005)

Desde el punto de vista industrial, el ultrasonido se puede dividir en dos grandes grupos: Ultrasonido de alta intensidad (UAI) y el ultrasonido de baja intensidad (UBI). El UAI es usado para modificar procesos o productos, mientras que el UBI se aplica para el diagnóstico (Condón *et al.*, 2005).

La absorción de la energía acústica es especialmente importante en alimentos, debido al contenido de aire y a la bien lograda estructura que algunos productos poseen. Las frecuencias altas son más fácilmente atenuadas que las bajas, de ahí que el UAI es aplicado a bajas frecuencias (20-100 kHz) para obtener “niveles de poder altos” (10-1000 W/cm²), por lo que se le conoce como ultrasonido de poder. Por otro lado, el UBI, utiliza frecuencias mayores (250 kHz a 1 MHz o superiores) para garantizar una adecuada resolución, pero a “niveles de poder bajos”, típicamente menores a 1 W/cm² (Torley y Bhandari, 2007).

Desde el punto de vista de la conservación de alimentos el ultrasonido de interés es el denominado de poder o de alta intensidad (UAI) (Fig. 1) (Mason *et al.*, 2005); se presentan cambios físicos y químicos dando lugar a la cavitación,

fenómeno que también provoca la inactivación microbiana (Piyasena *et al.*, 2002).

El UAI puede ser utilizado en la industria de alimentos para limpieza y desinfección al provocar la destrucción microbiana, así como la inactivación enzimática, favorecer reacciones químicas y la extracción de ciertos compuestos (López-Malo *et al.*, 2005).

2. Ondas y parámetros ultrasónicos

Las ondas ultrasónicas se definen por medio de distintos parámetros como la amplitud (A), definida como el valor máximo que toma una magnitud oscilante en un semiperiodo; el coeficiente de atenuación (α), el cual da el valor de la disminución de la amplitud de la onda a medida que viaja a través del material, generando un esparcimiento que se da generalmente en materiales heterogéneos; la velocidad ultrasónica (v), definida como la velocidad con la que la onda se propaga a través del medio, siendo mayor en sólidos que en fluidos y se puede determinar midiendo el tiempo que tarda la longitud de onda en viajar cierta distancia o midiendo la longitud de onda del ultrasonido a una determinada

frecuencia; la frecuencia (f), referida al número de oscilaciones o vibraciones de un movimiento por unidad de tiempo; la longitud de onda (λ), que es la distancia de dos partículas cualesquiera, que estén en la misma fase; y la impedancia acústica, que determina la fracción de la onda ultrasónica que es reflejada de la superficie. La influencia del medio en estos parámetros es la base de la mayoría de las aplicaciones del ultrasonido en alimentos y procesos alimenticios (McClements, 1995; Mulet *et al.*, 2002).

3. Mecanismo de acción del ultrasonido

Cuando una onda sónica se propaga en un medio líquido de forma longitudinal, se crean ciclos de compresión y expansión alternados. Cuando la presión negativa en el líquido, creada por el ciclo de expansión alternativo, es lo suficientemente menor para superar las fuerzas intermoleculares (fuerza de tensión), se forman pequeñas burbujas. Durante el subsecuente ciclo de expansión-compresión, las burbujas de gas se expanden y contraen simultáneamente. Esta formación y la evolución del tamaño de estas burbujas se conoce como cavitación. La fuerza de tensión en líquidos puros es muy alta y difícil de superar, sin embargo, la mayoría

de los líquidos contienen burbujas de gas que pueden actuar como núcleos de cavitación, aún cuando la presión negativa del proceso sea baja (Condón *et al.*, 2005).

Por ejemplo, la cavitación generada por UBI a partir de pequeñas burbujas, cuyo tamaño oscila poco durante los ciclos, se conoce como “cavitación estable”, ocasionando fuertes microcorrientes en el medio líquido, que actúan como ondas de choque (Mason, 1998). Esta cavitación tiene lugar cuando las ondas ultrasónicas son de alta frecuencia y de baja amplitud en un rango de presión desde 1 a 100 kPa (Condón *et al.*, 2005).

Los factores que afectan la cavitación son: las propiedades físicas del solvente, la temperatura, la frecuencia de irradiación, la presencia de gases disueltos, la limpieza del sistema de reacción, la frecuencia del ultrasonido, la presión hidrostática, la tensión superficial y la potencia de irradiación (Young, 1989).

En la Fig. 2 se muestran las modificaciones que sufren las burbujas de líquido durante la cavitación. La presión negativa durante el tratamiento causará un rompimiento en el medio líquido,

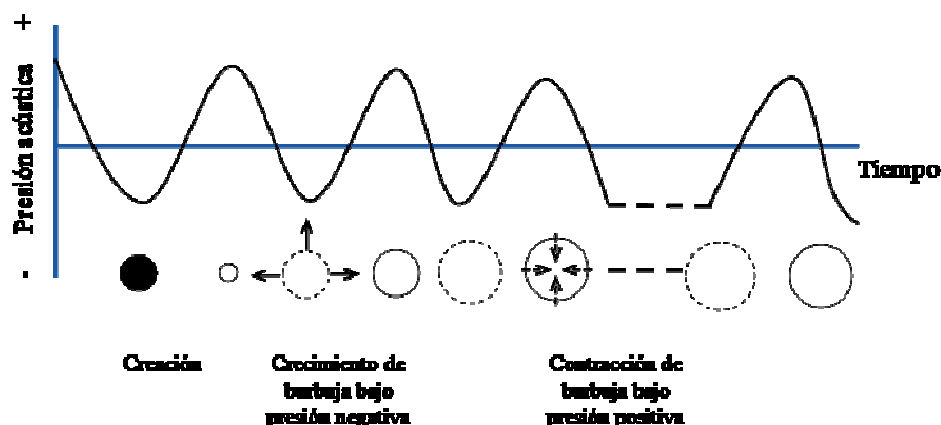


Fig. 2. Proceso de cavitación (Zhang y Sun, 2006)

provocando la formación de burbujas o cavitación. Durante la fase de presión negativa, las burbujas (incluyendo las presentes de forma inherente en el líquido), crecerán y crearán un vacío, causando la disolución de gases en el líquido.

A medida en que la fase negativa avanza, la presión se reduce hasta alcanzar la atmosférica, encogiéndose las burbujas. Cuando el ciclo de compresión inicia y mientras existe presión positiva, el gas difundido en las burbujas es expelido en el líquido de nuevo, esta difusión gaseosa no se lleva a cabo hasta comprimir las burbujas. Una vez lograda la compresión, la superficie límite de la burbuja para difusión, disminuye, así que la cantidad de gas eliminada es menor a la introducida durante el ciclo negativo. Así las burbujas crecerán más en cada ciclo ultrasónico (Zheng y Sun, 2006).

4. Equipo usado en ultrasonido

Los equipos modernos ultrasónicos consisten en un generador eléctrico y un transductor. El generador produce pulsos de

energía de alto voltaje a la frecuencia establecida en el transductor, siendo éste el componente más importante del sistema (Mason, 1998). El transductor es movido por la potencia suministrada de un primer sistema a un segundo. El transductor genera el principio piezoeléctrico para convertir la energía eléctrica en ultrasónica con una eficiencia del 98% (Mason *et al.*, 2005).

4.1 Equipo a nivel laboratorio

Los dos equipos más comunes a nivel laboratorio usados para tratar medios líquidos para desinfección, son el baño de limpieza de ultrasonido y las puntas ultrasónicas. El primer tipo de equipo es económico y comúnmente usado para la limpieza de recipientes que se introducen en el baño (Fig. 3). Los sistemas más poderosos de ultrasonido son los que utilizan puntas sónicas, los cuales introducen la vibración directamente en la muestra. Ambos equipos fueron diseñados originalmente para aplicaciones específicas, de manera que los baños ultrasónicos eran utilizados para la limpieza de material de vidrio, introduciéndolo en el baño y las puntas

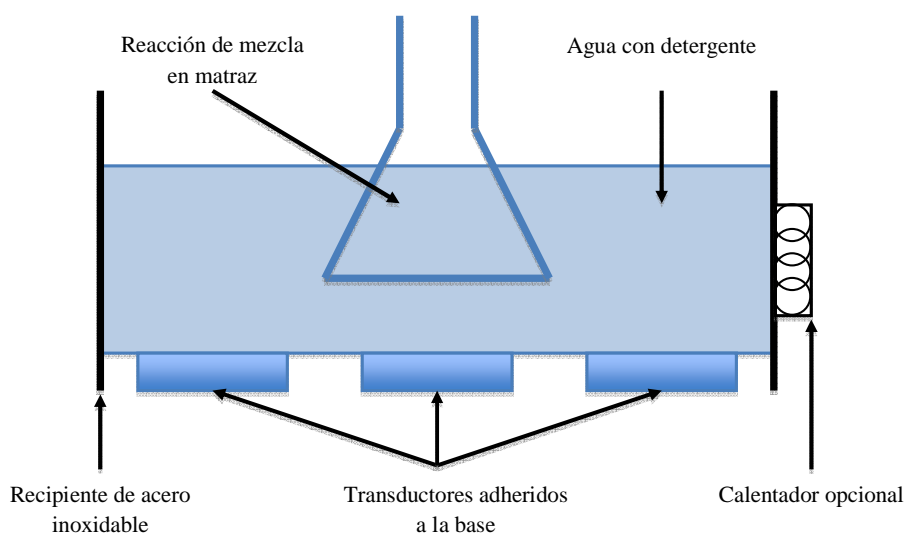


Fig. 3. Baño ultrasónico (Mason *et al.*, 2005)

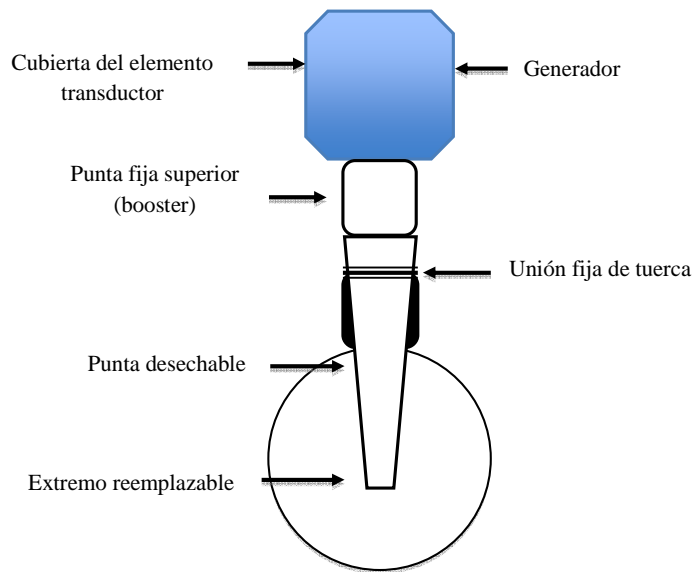


Fig. 4. Sistema de punta ultrasónica (Mason *et al.*, 2005)

sónicas para el rompimiento celular, (Mason, 1998; Zenker *et al.*, 2003).

4.1.1 Baños ultrasónicos para limpieza

El transductor que produce el ultrasonido opera a una potencia de $1\text{--}5\text{ W/cm}^2$. El ultrasonido es transmitido a través del líquido, el cual es usualmente agua. Dentro del baño se encuentra el recipiente que contiene la solución a tratar. La desventaja de este sistema es que al producir la cavitación fuera del contenedor de la solución, la intensidad ultrasónica se atenúa (Mason, 1998).

4.1.2 Puntas ultrasónicas de inmersión directa

Las puntas están elaboradas con aleaciones de titanio, aluminio, aluminio-bronce y acero inoxidable (Fig. 4). Las aleaciones de titanio son preferidas ya que producen bajas pérdidas de sonido, buena resistencia a la erosión y menor fatiga (Seymour *et al.*, 2002). Las formas de las puntas pueden ser:

- a) Lineales: su forma aumenta la potencia cuatro veces.
- b) Exponenciales: aumenta las intensidades mucho más que las puntas lineales. Esta forma es más difícil de manufacturar, por estrecha longitud y la pequeña área de la punta. Es apropiada en irradiación de muestras pequeñas.
- c) De flujo: apropiadas para mezclas líquidas y emulsiones.
- d) Escalonada: utilizada para procesos de alta intensidad y de gran volumen.

5. Aplicaciones del UAI en alimentos

En la Tabla 1 se resumen las principales alternativas que el UAI ha demostrado tener para el tratamiento, procesamiento y conservación de alimentos, así como los posibles efectos que presenta al combinarse con el calor (termosonicación) y la presión (manotermosonicación).

Algunas aplicaciones del UAI (Dolatowski *et al.*, 2007) son:

Tabla I. Algunas aplicaciones del ultrasonido de poder o de baja frecuencia en la industria de alimentos ^a

Aplicación	Descripción
Efectos antimicrobianos	Destrucción microbiana, limpieza de superficies
Transferencia de calor	Incremento de la velocidad de congelación, descongelación y cocido
Transferencia de masa	Incremento de la velocidad de transferencia de masa durante el secado (sólido, líquido y secado osmótico), curado, separación de membrana, desecación y filtración por membrana
Procesado de cárnicos	Tenderización de la carne
Emulsificación, encapsulación y homogenización	Homogenización y emulsificación de la leche y mayonesa
Fermentación y maduración	Incremento en la velocidad de fermentación y añejamiento (vino)
Cristalización	Control de la nucleación y crecimiento de cristales
Corte	Cortado de productos frescos y congelados, incluyendo alimentos compuestos o multicapa
Degaseo y despumante	Despumado de bebidas carbonatadas, cerveza u otros líquidos durante enlatado; despumado de fermentos microbiológicos; remoción de gases disueltos en líquidos
Rompimiento celular y extracción	Mejoramiento de la extracción de compuestos (enzimas, proteínas y aceites esenciales)
Actividad enzimática y desnaturalización de proteínas	Inactivación y mejoramiento de la actividad enzimática; desnaturalización de proteínas
Polimerización y depolimerización	Aplicación en polímeros alimenticios

^a Adaptado de Torley y Bhandari (2007)

- Procesos de oxidación: en el desarrollo de aromas y sabores (producción de vinos).
- Estimulación celular: acelera la producción de yogurt y en la industria agrícola se han obtenido resultados exitosos en la germinación de semillas.
- Esterilización: muy común tanto en superficies de materiales como en alimentos.
- Cristalización: controla el tamaño de los cristales durante la congelación, especialmente en los vegetales, ya que al aumentar el tamaño del cristal, aumenta el daño estructural, siendo un factor muy importante en control.
- Desgasificar: retira aire o gas de líquidos viscosos como el chocolate.
- Filtración: facilita la separación de partículas suspendidas en líquidos.
- Secado acústico; incrementa la transferencia de calor entre el sólido y el líquido, evita la oxidación y degradación del material.

5.1 Inactivación de enzimas

El UAI incrementa la efectividad de la inactivación enzimática en comparación con el tratamiento térmico, aplicado a derivados vegetales (lipoxigenasa del frijol de soya, peroxidasa del rábano y del berro, pectinmetilesterasa de la naranja y tomate y poligalacturonasa), tejidos animales (malato dehidrogenasa del corazón porcino, *L*-lacto dehidrogenasa de la carne del conejo, alcalinfosfatasa de la mucosa intestinal de los bovinos y fosfolipasa A2, tripsina y lipasa del páncreas porcino), de microorganismos (proteasa y lipasa de *Pseudomona fluorescens*, alcohol dehidrogenasa de levadura de panadería y β -galactosidasa de *Escherichia coli*) y de leche (lactoperoxidasa de bovinos) (Vercet *et al.*, 2001; 2002). La inactivación enzimática se incrementa al aumentar el poder ultrasónico, la frecuencia, intensidad de la cavitación, temperatura y presión de proceso, pero disminuye conforme el volumen a tratar aumenta (Ozbek y Ulgen, 2000; Raviyan *et al.*, 2005).

5.2 Mezclado y homogenización

Existe un gran número de procesos que utilizan el UAI para mezclar materiales (Canselier *et al.*, 2002). Uno de los más empleados es el “método del silbido”, basado en la reducción del tamaño de los orificios o toberas, cambiando la velocidad para alcanzar el tamaño de partícula necesario o grado de dispersión. Ejemplos de ello son las emulsiones base utilizadas en sopas, salsas o aderezos, que consisten en una mezcla de agua, leche en polvo, aceite comestible y grasas, junto con harina o almidón como agente espesante. Estos materiales se mezclan y se hacen pasar por el homogenizador, produciendo una emulsión con finas partículas de una textura suave. La salsa catsup es procesada de forma similar para obtener un producto terso con elevada viscosidad, mejorando el sabor como resultado de la completa dispersión de la pulpa del tomate (Mason, 1998).

Otro estudio se realizó con emulsiones aceite/agua, producidas por agitación mecánica (10 000 rpm, P = 170 W) y con

ultrasonido de poder (20 kHz, 130 W), usando el sistema modelo de agua / keroseno / monoesterato polietoxilado de sorbitán (20 EO). Con el ultrasonido, el tamaño de gota fue mucho menor que el obtenido por agitación mecánica, haciendo que la emulsión fuera mucho más estable. Este método se utilizó en procesos de encapsulación de aroma de queso líquido (20%), en matrices de carbohidratos en secado por aspersión. Para la encapsulación, el sistema tratando con ultrasonido obtuvo una emulsión del aroma disperso en un tamaño de gota más fino, reteniéndolo mejor, en comparación con la agitación mecánica (Mongenot *et al.*, 2000).

Por otro lado, el proceso de homogenización con UAI ha demostrado ser eficiente a escala pequeña, pero no así cuando se aumenta el volumen del líquido a procesar, debido a que la intensidad del ultrasonido decrece rápidamente a medida que se aleja de la punta sónica (Torley y Bhandari, 2007).

Behrend *et al.* (2000), han comparado

Tabla II. Algunos ejemplos de tratamientos con ultrasonido para tenderización de carne ^a

Músculo	Frecuencia (kHz)	Potencia de entrada	Tiempo de tratamiento (min)	Efecto de tenderización
Caballo - Semimembranoso	22	1500 W	Cinco sesiones total 50 min.	La carne tratada con ultrasonido tuvo menos fuerza de unión, que el tratamiento convencional (inyección y colgado) (31.5 Kg/cm ² N)
Pollo - Mayormente pectoral	40	2400 W	15	A 24 h de matanza, el tratamiento con ultrasonido reflejó menos fuerza (4.4 N) que el no tratado (5 N)
Carne - Semitendinoso	25,9	1000 W	Arriba de 16	La carne con ultrasonido tuvo menor fuerza de unión que la no tratada entre 2 y 4 minutos, pero igual o superior después de 8 a 16 minutos
Carne - Elongado, semitendinoso, del biceps	30,47	0.29-0.62 W/cm ²	Arriba de 30	El ultrasonido no afectó la tenderización
Oveja - Elongado	20	63 W/cm ²	En promedio 2.5 por filete	El ultrasonido no afectó la tenderización

^a Adaptado de Torley y Bhandari (2007)

procesos ultrasónicos con otros tipos de emulsificación mecánicos. La viscosidad de la fase continua fue modificada con estabilizadores solubles en agua (sistemas aceite/agua) y con diferentes aceites (sistemas agua/aceite). A una densidad energética constante, el tamaño de las gotas disminuía al adicionar estabilizadores, no influyendo en la viscosidad del aceite en la emulsión agua/aceite. Estudios cualitativos de la cavitación, han demostrado poca penetración de tal fenómeno en el medio líquido, por lo cual se requiere desarrollar equipos para optimizar procesos de emulsificación con ultrasonido (Mason *et al.*, 2005).

5.3 Ablandamiento de carne

La suavidad es la característica más importante que el consumidor busca en la carne cocida (Boleman *et al.*, 1997). La tenderización de la carne es influida por múltiples factores, incluyendo las características del animal (genéticas, edad y función muscular), manejo antes del sacrificio (estrés y glucógeno en el músculo) y posterior al mismo (velocidad de enfriamiento, estimulación eléctrica y manipulación general) (Tarrant, 1998). El ultrasonido ofrece características potenciales (Tabla II), para lograr la tenderización sin alterar la apariencia que se produce con algunos otros tratamientos.

El ultrasonido puede además dañar las paredes y membranas celulares y desnaturalizar las proteínas por medio de la pulsación de las burbujas, la cavitación y la formación de radicales libres, incluyendo la fragmentación del colágeno (Miles *et al.*, 1999).

5.4 Congelado y descongelado

El UAI puede ayudar en el proceso de congelado, disminuyendo el tiempo de

proceso y mejorando su calidad (Zheng y Sun, 2006). Se ha demostrado que el UAI incrementa el coeficiente convectivo de transferencia de calor (Lima y Sastry, 1990), entre el alimento y el medio refrigerante; además influye en la cristalización, incrementando la velocidad de nucleación y el crecimiento de cristales (Mason *et al.*, 2005), haciendo posible a través de las burbujas de la cavitación o por el colapso de éstas, el rompimiento de núcleos para formar cristales más pequeños (Zheng y Sun, 2006). Una de las desventajas de usar UAI en congelación es la producción de calor (Torley y Bhandari, 2007).

En contra parte, el proceso de descongelado, realizado tradicionalmente con agua o aire a gran escala puede ser apoyado con el empleo de ultrasonido. Se ha propuesto que la absorción de la energía ultrasónica depende de la relajación termoelástica de los cristales de hielo en el alimento y se ve afectada por la orientación y tamaño de los mismos, presencia de impurezas en los cristales de hielo y la temperatura (Zheng y Sun, 2006).

El futuro del empleo del UAI combinado con procesos de congelación y descongelación está ligado al desarrollo de equipo industrial adecuado. De hecho, la aplicación comercial de nuevas tecnologías depende de la facilidad de operación y la relación costo/beneficio para solucionar el problema. Específicamente, la congelación en conjunto con ultrasonido puede tener promisorias aplicaciones en el tratamiento de alimentos de alto costo y para productos farmacéuticos (Zheng y Sun, 2006).

5.5 Extracción

La aplicación del ultrasonido de poder en la extracción de compuestos de origen vegetal ha demostrado tener efectos benéficos, derivados de la acción mecánica de

incrementar la penetración del solvente en el producto, aumentando la transferencia de masa en la interfase. Se supone que esos beneficios están relacionados con el aumento de la difusión celular por la penetración provocada por la cavitación (Mason, 1999).

Las hierbas son una fuente de materia prima para la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos y, más recientemente en agricultura para el control de plagas (Vinatoru, 2001). El ultrasonido puede ser empleado para mejorar la extracción cuando se usa un solvente de bajo punto de ebullición y la temperatura de la mezcla en extracción es mantenida por debajo de este punto (Mason *et al.*, 2005). La extracción supercrítica con CO₂ es una técnica no convencional que ofrece buenos resultados. Es aplicable para extracción de fragancias, obteniendo aceites esenciales de buena calidad. Al requerir que el solvente presente mayor transferencia de masa al soluto para lograr la extracción, el ultrasonido logra mejorar esta característica; además, representa la única forma práctica de lograr agitación en el medio, ya que no se pueden emplear agitadores mecánicos. Riera *et al.* (2004), estudiaron el efecto del

ultrasonido (20 kHz y 50 W) en la extracción de aceite de almendras usando CO₂ como fluido supercrítico para extracción. Con 280 bar y 55 °C, al final del tiempo de extracción (8 a 30 minutos), la cantidad de aceite fue incrementada significativamente (20%) en comparación con el método sin ultrasonido; por otro lado la transferencia de masa fue más rápida que para el caso sin el empleo de UAI.

5.6 Efecto microbiológico

Por otro lado, el UAI aplicado a la inactivación microbiológica, tiene a la cavitación como responsable de este hecho. Las burbujas de gas formadas en el medio, hacen que se llegue a un momento donde la energía ultrasónica que se provee no es suficiente para retener el vapor en la burbuja y se provoca la condensación. Las moléculas condensadas chocan violentamente creando ondas, dichas ondas crean regiones de alta temperatura y presión. Dichos choques actúan sobre ciertos componentes estructurales y funcionales celulares hasta el punto de provocar la lisis celular (Piyasena *et al.*, 2002; López-Malo *et al.*, 2005).

Tabla III. Valores de tiempo de reducción decimal (D) en minutos, para calentamiento (62 °C) y tratamiento ultrasónico presurizado (40 °C, 200 kPa, 117 µm) de diferentes bacterias ^a

Microorganismo	Resistencia térmica	Resistencia ultrasónica
<i>B. subtilis</i>	Insensible	12.0
<i>L. monocytogenes</i>	0.62	1.50
<i>E. faecium</i>	15.3	4.0
<i>Y. enterocolitica</i>	0.39	1.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.18	0.92
<i>E. coli</i>	0.012	0.87
<i>S. enteritidis</i>	0.068	0.73
<i>S. typhimurium</i>	0.12	0.80
<i>S. senftenberg</i>	1.1	0.84
<i>A. hydrophila</i>	0.024	0.86

^a Adaptado de Condón *et al.* (2005)

Ciertos microorganismos pueden ser más susceptibles al tratamiento con ultrasonido que otros. Se ha visto que las células largas o más grandes son más sensibles al UAI. Con el incremento en el área de superficie, las células de mayor tamaño son bombardeadas por la presión producida por la cavitación, haciéndolas más vulnerables al tratamiento. Las especies de microorganismos que producen esporas son más resistentes al calor y observando el mismo efecto con el UAI. En general, los esporuladores presentan mayor resistencia que los vegetativos y los cocos son más resistentes que los bacilos (Guerrero *et al.*, 2000). Las células Gram-positivas son más resistentes al ultrasonido que las Gram-negativas, ya que la pared celular Gram-positiva es más gruesa y contiene una capa adherente cercana de peptidoglicanos (Mason *et al.*, 2005).

Sin embargo, Scherba *et al.* (1991), encontraron que la sensibilidad microbiana al ultrasonido, no depende de su morfología celular, sino del efecto producido dentro de la membrana citoplasmática.

Como parte del mecanismo de acción, tanto el calor como las ondas de choque por cavitación o ambos, pueden ser los responsables del efecto letal del UAI. Por otro lado, la temperatura extremadamente alta y la presión de las burbujas colapsantes, provocan la disociación del vapor de agua en radicales OH y radicales de H, ambos radicales altamente reactivos que influyen en la inactivación microbiana por daño oxidativo, similar al causado por los hidroperóxidos (Suslick, 1990).

La influencia de la composición del medio en la resistencia microbiana al ultrasonido ha sido demostrada en diferentes especies de levaduras y bacterias, siendo mayor en el caso de los alimentos que en caldos nutritivos. Por ejemplo, la resistencia al ultrasonido en *E. coli*, fue mayor en leche

con alto contenido en grasa (Lee *et al.*, 1989).

El efecto del pH no está del todo claro; sin embargo, se ha encontrado que no influye en la resistencia al UAI, aunque se presenta una disminución en los valores *D* (tiempo de reducción decimal) en medios con pH ácido (Condón *et al.*, 2005).

6. El ultrasonido como alternativa al tratamiento térmico

La Tabla III muestra los valores *D* de la resistencia a tratamientos ultrasónicos en distintas especies bacterianas (20 kHz, 117 µm, 200 kPa, 40 °C), en comparación con el tratamiento térmico. El valor *D* de la mayoría de las células vegetativas resistentes al ultrasonido, como *E. faecium*, fue 5 veces mayor que el encontrado para las más sensibles (*Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*), mientras que la resistencia al calor fue 1000 veces mayor (Condón *et al.*, 2005).

La inactivación bacteriana por ultrasonido es un fenómeno “todo o nada”, es decir, puede o no existir efecto en la célula sometida a las ondas ultrasónicas, haciendo complicado poder combinar el tratamiento con otros de forma que se obtengan resultados letales. Los reportes de tratamientos con ultrasonido previo al empleo de métodos combinados no son del todo satisfactorios; sin embargo, el utilizar distintos compuestos o tecnologías previas al tratamiento ultrasónico ha demostrado afectar la resistencia mecánica de las células bacterianas, lo que facilita la acción de las ondas sobre la pared celular. La combinación simultánea de calor y ondas ultrasónicas bajo presión, puede lograr la inactivación bacteriana. Generalmente, se espera un efecto aditivo y a una temperatura óptima, el tiempo de tratamiento se puede reducir a la mitad. Algunas veces un efecto sinérgico se da

utilizando MTS, superando en ventajas al tratamiento térmico (Condón *et al.*, 2005).

Como se ha podido observar, el UAI es útil para la conservación de alimentos. Sin embargo, este tipo de tratamiento parece ser aplicable sólo a presión ambiental para inactivar células vegetativas y esporas bacterianas. El empleo de presión estática puede incrementar el efecto letal ultrasónico más de cuatro veces. Esto puede hacer que la MTS sea un método conveniente para la inactivación bacteriana a temperatura ambiente. Sin embargo, el efecto letal en esporas está aun limitado (Condón *et al.*, 2005). Esporas de *B. subtilis* mostraron a 500 kPa y 117 μ m de amplitud de onda, valores D de aproximadamente 6 minutos (Raso *et al.*, 1998b) y por lo tanto sólo en ocasiones especiales la manosonicación puede usarse como una alternativa real para sustituir al tratamiento térmico.

6.1. Efectos combinados

El uso de ultrasonido combinado con otros factores, mejora el resultado del tratamiento. Tal es el caso de la denominada MTS, la cual emplea ultrasonido junto con presión y temperatura. Este tipo de tratamientos fue empleado por López *et al.* (1994), para estudiar el efecto en enzimas relevantes en la industria de alimentos como la lipoxigenasa, polifenoloxidasas y peroxidasas en sistemas modelo, reportando que la MTS era más eficiente para la inactivación enzimática en comparación con el tratamiento térmico, especialmente aquellas que son termolábiles como la lipoxigenasa y polifenoloxidasas. Por otro lado, las proteasas y lipasas de *Pseudomonas* psicrótrofas (Vercet *et al.*, 1997), consideradas como índice de calidad para el tratamiento de ultrapasteurización de la leche, fueron inactivadas diez veces más rápido utilizando MTS. La pectinmetilesterasa de jugo de naranja, fue inactivada con un valor D = 500 minutos (72

°C), en comparación con la combinación de UAI y calor (72 °C, 20 kHz, 117 μ m y 350 kPa), obteniendo un valor D de 1.2 minutos, siendo ésta última más eficiente al reducir el tiempo de tratamiento (Vercet *et al.*, 1999). El uso de UAI a presión ambiental también ha sido exitoso en la inactivación enzimática en alimentos, como con la peroxidasas, que fue inactivada por una combinación de calor y UAI a pH neutro (Gennaro *et al.*, 1999) y bajo pH (Yoon-Ku *et al.*, 2000); la lipoxigenasa, ha mostrado inactivación a bajas frecuencias de ultrasonido en sistemas modelo (Thakur y Nelson, 1997).

El efecto letal sinérgico de la MTS ha sido reportado para esporas bacterianas (Raso *et al.*, 1998a), células de *L. monocytogenes* sometidas a choque térmico (Pagán *et al.*, 1999a), células vegetativas con resistencia al calentamiento y distintas especies de *Salmonella* tratadas a actividades de agua intermedias (Pagan *et al.*, 1999b). Se ha observado que el ultrasonido rompe la cubierta externa de algunas esporas bacterianas y libera ácido dipicolínico y polipéptidos de bajo peso molecular de la corteza de dichas esporas (Palacios *et al.*, 1991). Raso *et al.* (1998a), encontraron que la MTS sensibiliza las esporas de *B. subtilis* en presencia de lisozima. Algunas esporas tienen la característica de tener perforaciones en la corteza y ser sensibles a la lisozima, pero en la mayoría de los casos, la lisozima sólo es capaz de hidrolizar los peptidoglicanos de la corteza de la espora si ésta se debilita primero.

Lo anterior explica el efecto sinérgico de la MTS para la inactivación de las esporas bacterianas. Las ondas ultrasónicas a presión, actuarán sensibilizando las esporas al calor. Cuando se trata a bacterias sensibles al calor por medio de la MTS, el efecto letal inicia a bajas temperaturas; por el contrario, cuando se trata a células resistentes a altas temperaturas, el efecto térmico letal aparece

a altas temperaturas, cambiando la rigidez de la membrana, resultando una sinergia de tratamientos (Condón *et al.*, 2005).

Conclusiones

De esta forma el ultrasonido ha atraído el interés en la aplicación a la ciencia y tecnología de alimentos, por ejemplo en la modificación de las propiedades, aportando beneficios en el procesamiento y conservación. Al ser una tecnología emergente, puede aplicarse para desarrollar procesos modernos, mejorando la calidad y seguridad de los alimentos. La intensidad del tratamiento con UAI se evalúa actualmente a nivel laboratorio, verificando los cambios que se producen en las propiedades fisicoquímicas de los alimentos. En el presente estudio se plantearon las líneas tecnológicas en las que se aplica el UAI, con resultados aceptables. Dichos resultados deberán ser sopesados contra el beneficio que aporta este tratamiento como una de las tecnologías emergentes de mayor auge a nivel mundial en el área de alimentos, significando ahorros en tiempo, económicos y con beneficios a la salud y gusto del consumidor, degradando en menor cantidad los componentes endémicos del alimento y garantizando la inocuidad del mismo.

Referencias

- Behrend, O., Ax, K. y Schubert, H. 2000. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 7(2): 77-85.
- Boleman, S. J., Miller, M. F., West, D., Johnson, D. y Savell, J. W. 1997. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. *Journal of Animal Science*. 75(6): 1521-1524.
- Canselier, J. R., Delmas, H., Wilhelm, A. M. y Abismail, B. 2002. Ultrasound emulsification: an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 23(3): 333-349.
- Condón, S., Raso, J. y Pagán, R. 2005. Microbial inactivation by ultrasound. En: G. Barbosa-Cánovas, M. S. Tapia y M. P. Cano (Eds). *Novel food processing technologies*. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 423-442.
- Dolatowski, J. D., Stadnik, J. y Stasiak, D. 2007. Applications of ultrasound in food technology. *Technologia Alimentaria*. 6(3): 89-99.
- Gennaro, L. D., Cavella, S., Romano, R. y Masi, P. 1999. The use of ultrasound in food technology I: inactivation of peroxidase by thermosonication. *Journal of Food Engineering*. 39(4): 401-405.
- Guerrero, S., López-Malo, A. y Alzamora, S. M. 2000. Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2(1): 31-39.
- Hoover, D. G. 2000. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. *Ultrasound. Journal of Food Science Supplement*. 65(8): 93-95.
- Lee, B. H., Kermasha, S. y Baker, B. E. 1989. Thermal ultrasonic and ultraviolet inactivation of *Salmonella* in thin films of aqueous media and chocolate. *Food Microbiology*. 6(2): 143-152.
- Lima, M. y Sastry, S. K. 1990. Influence of fluid rheological properties and particle location on ultrasound-assisted heat transfer between liquid and particles. *Journal of Food Science*. 55(5): 1112-1115.
- López, P., Sala, F. J., Fuente, J. L., Condón, S., Raso, J. y Burgos, J. 1994. Inactivation of peroxidase, lipoxigenase and polyphenol oxidase by manothermosonication. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42(2): 252-256.
- López-Malo, A., Palou, E., Jiménez, M., Alzamora, S. M. y Guerrero, S. 2005. Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering*. 67(1): 87-93.
- Mason, T. J. 1998. Power ultrasound in food processing the way forward. En M. J. W. Povey, y T. J. Mason, (Eds). *Ultrasound in food processing*. Blackie Academic and Professional. EE.UU. p. 264.

- Mason, T. J. 1999. *Sonochemistry*. Oxford University Primer Series No. 70. Oxford Science Publications. En: D. Sun (Ed). *Emerging technologies for food processing*. Elsevier. Londres. Gran Bretaña. p. 768.
- Mason, T. J., Riera, E., Vercet, A. y López-Buesa, P. 2005. Application of ultrasound. En: D. Sun (Ed). *Emerging technologies for food processing*. Elsevier. Londres. Gran Bretaña. pp. 323-351.
- McClements, D. J. 1995. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*. 6(9): 293-299.
- Miles, C. A., Morley, M. J. y Rendell, M. 1999. High power ultrasonic thawing of frozen foods. *Journal of Food Engineering*. 39(2): 151-159.
- Mongenot, N., Charrier S. y Chaliel, P. 2000. Effect of ultrasound emulsification on cheese aroma encapsulation by carbohydrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(3): 861-867.
- Mulet, A., Cárcel, J. A., Benedito, J. y Sanjuan, N. 2002. Applications of low-intensity ultrasonics in the dairy industry. En: J. Welte-Chanes, G. Barbosa-Cánovas y J. M. Aguilera (Eds). *Engineering and food for the 21st Century*. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 763-783.
- Ozbek, B. y Ulgen, K. O. 2000. The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry*. 35(9): 1037-1043.
- Pagán, R., Mañas, P., Álvarez, I. y Condón, S. 1999a. Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure al sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*. 16(2): 139-148.
- Pagán, R., Mañas, P., Raso, J. y Condón, S. 1999b. Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Applied Environmental Microbiology*. 65(1): 297-300.
- Palacios, P., Burgos, J., Hoz, L., Sanz, B. y Ordóñez, J. A. 1991. Study of substances released to ultrasonic treatment from *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Applied Bacteriology*. 71(5): 445-451.
- Piyasena, P., Mohareb, E. y McKellar, R. C. 2002. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 87(3): 207-216.
- Raso, J., Pagán, R., Condón, S. y Sala, F. J. 1998a. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied Environmental Microbiology*. 64(2): 465-471.
- Raso, J., Palop, A., Pagán, R. y Condón, S. 1998b. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *Journal of Applied Microbiology*. 85(5): 849-854.
- Raviyan, P., Zhang, Z. y Feng, H. 2005. Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *Journal of Food Engineering*. 70(2): 189-196.
- Riera, E., Golás, Y., Blanco, A., Gallego, J. A., Blasco, M. y Mulet, A. 2004. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11(3): 241-244.
- Scherba, G., Weigel, R. M. y O'Brien, W. D. Jr. 1991. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(7): 2079-2084.
- Seymour, I. J., Burfoot, D., Smith, R. L., Cox, L. A. y Lockwood, A. 2002. Ultrasound decontamination of minimally processed fruits and vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*. 37(5): 547-557.
- Suslick, K. S. 1990. Sonochemistry. *Science*. 247(4949): 1439-1445.
- Tarrant, P. V. 1998. Some recent advances and future priorities in research for the meat industry. *Meat Science*. 49(1): S1-S16.
- Thakur, B. R. y Nelson, P. E. 1997. Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. *Die Nahrung*. 41: 299-301. En: D. Sun (Ed). *Emerging technologies for food processing*. Elsevier. Londres. Gran Bretaña. p. 768.
- Torley, P. J. y Bhandari, B. R. 2007. Ultrasound in food processing and preservation. En: M. S. Rahman (Ed). *Handbook of food preservation*. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 713-739.
- Vercet, A., López-Buesa, P. y Burgos, J. 1997. Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication. *Journal of Dairy Science*. 80(1): 29-36.

- Vercet, A., López-Buesa, P. y Burgos, J. 1999. Inactivation of heat-resistant pectinmethylesterase from orange by manothermosonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(2): 432-437.
- Vercet, A., Burgos J., Crelier, S. y López-Buesa, P. 2001. Inactivation of proteases and lipases y ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2(2): 139-150.
- Vercet, A., Burgos, J. y López-Buesa, P. 2002. Manothermosonication of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens*: effect of pH and sonication parameters. *Journal of Dairy Research*. 69(2): 243-254.
- Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8(3): 303-313.
- Yoon-Ku, J., Park, S. O. y Bong-Soo, N. 2000. Inactivation of peroxidase by hurdle technology. *Food Science and Biotechnology*. 9(2): 124-129.
- Young, F. R. 1989. *Cavitation*. Mc Graw Hill. Gran Bretaña. p. 418.
- Zenker, M., Heinz, V. y Knorr, D. 2003. Application of ultrasound-assisted thermal processing for preservation and quality retention of liquid foods. *Journal of Food Protection*. 66(9): 1642-1649.
- Zheng, L. y Sun, D. 2006. Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 17(1): 16-23.



Inactivación de microorganismos por homogenización a alta presión

G. G. Amador Espejo* y H. Ruiz-Espinosa

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

La homogenización a alta presión (HAP) ha sido empleada en la industria biotecnológica, farmacéutica y química para la preparación de emulsiones y suspensiones, como mecanismo de lisis celular o para generar cambios físicos en los fluidos procesados. En últimas fechas, ha empezado a explorarse el uso de la HAP como método de conservación en alimentos; con tal fin, se han desarrollado diversas investigaciones para evaluar el nivel de letalidad e identificar los mecanismos de inactivación de diferentes microorganismos, nativos o inoculados, en alimentos fluidos homogenizados a alta presión. Entre los factores de mayor influencia en la HAP se incluyen la presión de operación, temperatura de entrada, número de recirculaciones, tipo de equipo y viscosidad del medio. Las bacterias exhiben resistencia variable la HAP (esporas > vegetativas, Gram(+) > Gram(-), fase estacionaria > fase log), mientras que otros microorganismos han sido estudiados (principalmente hongos y levaduras). Los recientes resultados científicos muestran aplicaciones promisorias de la HAP en la inactivación microbiana, pero aún se requiere investigar más para definir las condiciones del proceso requeridas para crear aplicaciones alternas al tratamiento térmico de alimentos fluidos. El propósito de esta revisión es presentar un panorama general de los trabajos publicados a la fecha sobre la inactivación microbiana mediante HAP. Se hará énfasis en las diferencias de inactivación observadas entre diferentes grupos microbianos y se brindará una perspectiva de posibles aplicaciones de HAP en productos selectos.

Palabras clave: Homogenización a alta presión, inactivación microbiana, tecnologías no térmicas.

Abstract

The high pressure homogenization process (HPH) has been frequently employed in the biotechnological, pharmaceutical and chemical industry to prepare emulsions and suspensions, as a cellular lysis mechanism, or to generate physical changes in processed fluids. Recently, the use of HPH has been explored as a preservation method in food systems; with this aim, several research projects have been developed to evaluate the lethality level reached and identify the inactivation mechanisms of the different microorganisms (native or inoculated) in fluid products treated by HPH. Some factors with major relevance in the microorganism inactivation are: operating pressure, inlet temperature, fluid recirculation, equipment used and fluid viscosity. Bacteria exhibit variable resistance (spores > vegetative, Gram(+) > Gram(-), stationary phase > log phase) while other microorganisms have been analyzed (mainly yeasts and molds). Recently, published results show promising applications of HPH in microbial inactivation, but further research is needed in order to determine the processing parameters required to create alternate thermal processing. The purpose of this review is to present an up to date general overview of published results on microbial inactivation using HPH. Inactivation differences observed between different microbial groups will be emphasized and possible applications of HPH on selected products will be discussed.

Keywords: High pressure homogenization, microbial inactivation, non-thermal technologies.

* Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: yaotl14@yahoo.com.mx

Introducción

Dentro de las tecnologías no térmicas para el procesamiento de alimentos, una de las opciones más promisorias es la homogenización a alta presión (HAP). Aunque su funcionamiento es similar al de un homogenizador convencional, el equipo de HAP destaca por el intervalo de presiones al que opera (50-400 MPa), lo cual permite no sólo cambiar las características de estabilidad coloidal de los líquidos procesados, sino modificar su estructura, funcionalidad y carga microbiana (Bríñez *et al.*, 2006; Palou *et al.*, 1999).

Aún cuando sus aplicaciones biotecnológicas (para la ruptura y vaciado del contenido celular) se conocen desde hace mucho tiempo, su uso en alimentos es reciente. A la fecha se ha estudiado en diversos sistemas modelo y productos alimenticios como leche, leche de soya, jugos, dispersiones de almidón, etc. con el fin de reducir su carga microbiana inicial. La inactivación microbiana por HAP se ha atribuido a distintos mecanismos, incluyendo cavitación, impactos a alta velocidad y fenómenos de cizalla (Popper y Knorr, 1990; Thiebaud *et al.*, 2003; Diels y Michiels, 2006). Diversos factores intrínsecos (tipo, magnitud y fase de crecimiento de la carga microbiana, matriz alimenticia, temperatura del fluido) y extrínsecos (presión de proceso, número de etapas, número de ciclos, tipo de homogenizador, temperatura de salida) influyen sobre la letalidad microbiana al tratamiento de HAP (Diels y Michiels, 2006; Bríñez *et al.*, 2006; Tahiri *et al.*, 2006; Vachon *et al.*, 2002).

Actualmente, sólo ha sido publicada una revisión sobre la utilización potencial de la HAP para la reducción de la carga microbiana inicial en alimentos (Diels y

Michiels, 2006). Esto puede deberse a su reciente aparición -la primera referencia sobre el uso de HAP en alimentos es por Lanciotti *et al.* (1994)- ó bien a la dificultad para establecer parámetros de proceso únicos que generen resultados reproducibles, debido a la diversidad de equipos de HAP disponibles y a diferencias de operación entre los mismos, principalmente en términos de generación y mantenimiento de presión.

El objetivo de la siguiente revisión es proporcionar una perspectiva general de los avances en el uso de la HAP como una tecnología alterna de conservación de alimentos fluidos, basado en la información publicada en años recientes. Adicionalmente, las tendencias a futuro en esta área serán también discutidas. Para facilitar su completa comprensión, este artículo incluye una descripción del mecanismo de acción de la tecnología de HAP, la cual abarca las diferencias entre los dispositivos de alta presión y los productos en los cuales ha sido aplicada.

Revisión bibliográfica

Equipos empleados en la homogenización a alta presión

La homogenización es un proceso estándar en la industria láctea. Desde su aparición a principios del siglo XX, ha tenido grandes avances; los últimos se basan en el desarrollo de materiales para la fabricación de válvulas con mayor resistencia mecánica, con el fin de aumentar el nivel de presión empleada (Thiebaud *et al.*, 2003; Fluory *et al.*, 2000).

En años recientes, se han desarrollado distintos equipos que pueden alcanzar presiones por arriba de los 100 MPa, que de

manera genérica, son conocidos como homogenizadores a alta presión. Schultz *et al.* (2004) subdividen estos sistemas en difusores radiales, dispersadores de contrapropulsión (de jet), y agregados de boquilla axial, dependiendo de la dirección del flujo. Algunos modelos comerciales son descritos por Paquin (1999), incluyendo el homogenizador de jet Nanojet de la compañía Haskel (Haskel Internacional Inc. CA, EUA), empleado para preparar emulsiones, los cuales actualmente cuentan con capacidad de hasta 30 L/h y 200 MPa; el microfluidizador de la marca Microfluidics (Microfluidics Inc. MA, EUA), cuyo principio de operación se basa en la separación de una corriente de líquido en dos microcorrientes que posteriormente se recombinan por colisión en una cámara y posee versiones para procesamiento industrial de alrededor de 275 MPa (Feijoo *et al.*, 1997); y el Emulsiflex, de la compañía Avestin, el único que funciona como un homogenizador estándar y alcanza presiones de hasta 300 MPa. Actualmente otras compañías como DeBee (Bee International Inc, MA, EUA) y Niro Soavi (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) fabrican homogenizadores industriales de alta presión, con presiones de operación que alcanzan los 150 MPa y 310 MPa y flujos de hasta 3000 y 3750 L/h, respectivamente. Sin embargo los homogenizadores de la compañía Stansted Fluid Power (Essex, Inglaterra), cuyos modelos más recientes pueden desarrollar presiones de hasta 400 MPa, son los más empleados en los reportes disponibles en la bibliografía.

En general, todos los equipos antes mencionados se emplean en la industria farmacéutica, cosmética, biotecnológica y alimenticia en diversas aplicaciones, incluyendo la ruptura celular (para liberación de contenidos celulares), formación de microemulsiones y nanopartículas, estabilización de suspensiones e inactivación

microbiana para la conservación de los alimentos (Semo *et al.*, 2007; Diels y Michiels, 2006; Fluory *et al.*, 2000; Paquin, 1999).

Salvo en los homogenizadores de las marcas Haskel y Microfluidics, un homogenizador de alta presión opera de manera similar a un homogenizador convencional; consiste de un generador de alta presión, acoplado a una válvula fabricada con materiales de alta resistencia (acorde con la intensidad del proceso), a través de cuyo asiento se hace pasar el fluido a presurizar. Los mismos fenómenos que propician la reducción del tamaño de la fase dispersa de emulsiones en los homogenizadores convencionales (turbulencia, cizalla, cavitación e impacto) se presentan, aunque a intensidades considerablemente mayores, y producen sistemas coloidales muy finos y estables, con menor dispersión de tamaño y diámetros < 0.3-0.4 μm ; induciendo cambios adicionales en el producto tratado como inactivación microbiana y enzimática aún a temperaturas moderadas de operación (40-50°C); inactivación de bacteriófagos, modificación de las propiedades reológicas de fluidos y alteración de la funcionalidad de productos elaborados con los fluidos presurizados (Briñez, 2006; Popper y Knorr, 1990). Una representación esquemática básica de la sección de alta presión de un homogenizador Stansted FPG7400H:350 se presenta en la Figura 1 (Thiebaud *et al.*, 2003). Este equipo opera a presiones de hasta 350 MPa y utiliza un intensificador de 80 mL de capacidad útil (1), impulsado por una bomba hidráulica (2); el ciclo de operación se lleva a cabo en dos etapas: llenado del intensificador (aprox. 9 s) y aumento de presión y descarga del intensificador (10 s); la velocidad de flujo depende de la presión de operación y va de los 13.6 L/h a 300 MPa hasta 16 L/h a 100 MPa. Otros homogenizadores trabajan con dos intensificadores, así que cada ciclo se

repite con cada intensificador, existiendo cierto tiempo de traslape, establecido para mantener estable el nivel de presión de homogenización y estimado como 1 s por cada 100 de presión, en MPa (Freeman, 2007). El líquido presurizado pasa entonces a la válvula de alta presión (3), para ser inmediatamente enfriado en un intercambiador de calor de espiral (4). Este intercambio de calor es necesario, pues la intensidad a la que se presentan las fuerzas de homogenización ocasiona una elevación de la temperatura del fluido; en leche, se ha determinado que este incremento varía con la presión de operación y la temperatura de alimentación. Datta *et al.* (2005), estimaron un aumento en la temperatura a la salida de la válvula era de $0.5887^{\circ}\text{C}/^{\circ}\text{C}$ de la temperatura de entrada. Fluory *et al.* (2000), observaron un incremento de temperatura en emulsiones modelo aceite en agua de 46°C al

aumentar el nivel de presión de 20 a 300 MPa, atribuyendo este calentamiento al esfuerzo de deformación debido a la alta

velocidad del flujo. Al igual que en el proceso tradicional, los equipos *Stansted* permiten ser configurados con una segunda etapa de homogenización, impulsada por una bomba neumática (SFP, 2005) la cual, si se coloca, permite trabajar de 1/3 a 1/10 de la magnitud de presión de la primera etapa, sin exceder los 40 MPa (Serra *et al.*, 2007; Picart *et al.*, 2006). Al igual que en una homogenización convencional, esta segunda etapa permite el rompimiento de aglomeraciones de glóbulos grasos y otras partículas e incrementa la estabilidad coloidal del producto.

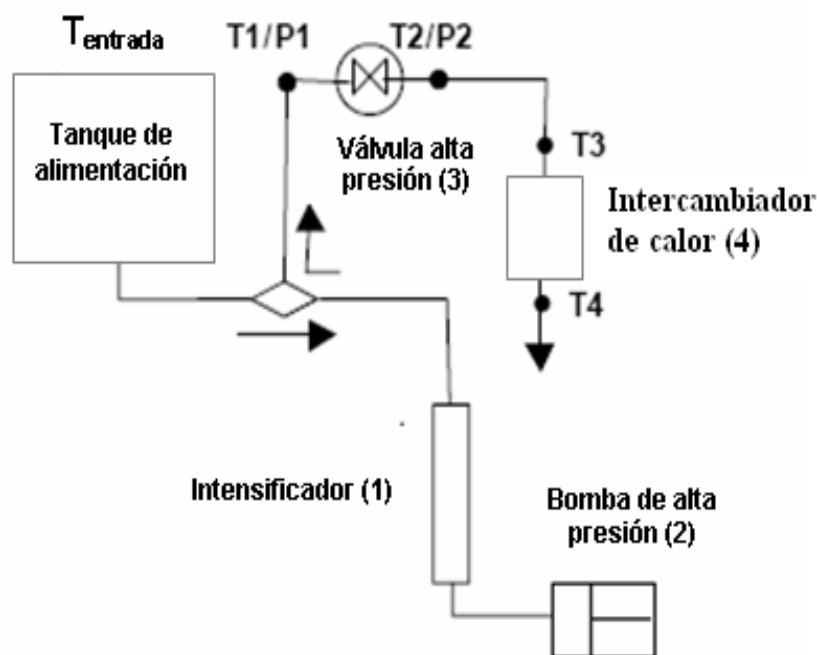


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un homogenizador *Stansted* con un solo intensificador. T1/P1: Sensor de temperatura y presión del fluido antes de la homogenización. T2/P2: Sensor a la salida de la válvula. T3, T4: Sensores de temperatura antes y después del enfriamiento del fluido. Adaptado de Thiebaud *et al.* (2003).

Efecto de la HAP sobre la carga microbiana

Los mecanismos de inactivación microbiana asociados a la HAP no han podido ser

esclarecidos completamente, aunque se piensa que son múltiples y que interactúan entre sí. Diels y Michiels (2006), enumeran los principales mecanismos propuestos a la fecha: gradientes de presión y velocidad dentro del fluido, turbulencia, cavitación (y formación de radicales libres relacionados con este fenómeno), impacto con superficies sólidas y esfuerzo extensional. Cambios en la morfología celular, lesiones en la membrana citoplásmica, incrementos súbitos en la permeabilidad y ruptura de la membrana celular (con el consecuente vaciado de contenido celular) se han reportado como causas de muerte celular a causa de la HAP y se han observado por microscopía electrónica de transmisión (Geciova *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002). El impacto de la HAP varía con el grupo de microorganismos estudiado; las diferencias observadas se detallan a continuación.

Bacterias. Se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la eficacia del tratamiento HAP en la inactivación de bacterias y el posible efecto de la matriz alimenticia sobre el número de ciclos logarítmicos de reducción logrados. Dentro de los fluidos alimenticios más utilizados como medio para evaluar la efectividad de la HAP se encuentran la leche, jugo de naranja, leche de soya, y diversos sistemas modelo (Lanciotti *et al.*, 1994; 1996; 2004; Diels *et al.*, 2003; Briñez, 2006; Smiddy *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2007; Capra *et al.*, 2009).

Dentro de los grupos de bacterias más estudiadas se encuentran principalmente las patógenas (Lanciotti *et al.*, 1994; 1996; Feijoo *et al.*, 1997; Wuytack *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003; 2005;

Hayes *et al.*, 2005; Briñez *et al.*, 2006; Tahiri *et al.*, 2006; Smiddy *et al.*, 2007; Chavez-Lopez *et al.*, 2009). Algunos de los parámetros evaluados incluyen: nivel de inactivación a distintos intervalos de presión (100-300MPa), temperatura de entrada (5-70°C), número de ciclos del homogenizador (uno y dos ciclos), el número de recirculaciones y el efecto de distintos parámetros fisicoquímicos (pH y a_w). Se ha mostrado una marcada diferencia entre el nivel de reducción alcanzado en bacterias del tipo Gram (+) con respecto a las Gram (-). Esta diferencia en el nivel de inactivación alcanzado se debe principalmente a la constitución de la pared celular, que en bacterias Gram (+) es más rígida, ya que esta compuesta de peptidoglucanos, los cuales resisten mejor los procesos de disrupción celular del tipo mecánico (Geciova *et al.*, 2002).

Bacterias Gram (+). Dentro de las más relevantes, se han estudiado *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Bacillus licheniformis*, *B. cereus* y *Enterococcus faecalis*. Estos microorganismos presentan una alta resistencia al tratamiento HAP; por otra parte, el incremento de temperatura y la reducción del pH y la a_w no aparentan ofrecer un efecto sinérgico para la inactivación de este tipo de microorganismos (Hayes *et al.*, 2005; Diels *et al.*, 2003; Lanciotti *et al.*, 1996). *Staphylococcus aureus* se ubica a la fecha como el microorganismo patógeno más resistente al tratamiento HAP. Operando bajo condiciones de 200-250 MPa / 55-70°C (Smiddy *et al.*, 2007) y 200 MPa/25°C (Wuytack *et al.*, 2002) se obtuvieron reducciones menores a un ciclo logarítmico para este microorganismo. El incremento de presión y el número de recirculaciones incrementa de manera importante la inactivación. Se ha logrado una reducción de hasta cuatro ciclos logarítmicos usando 300 MPa y temperaturas

en el rango de 20 y 50°C (Briñez, 2006) mientras que cuatro pases a 250 MPa / 45°C lograron una inactivación de 3.5 ciclos logarítmicos (Wuytack *et al.*, 2002).

Otro patógeno frecuentemente empleado en los estudios con HAP es *Listeria monocytogenes* y su subrogado *Listeria innocua* (los cuales han mostrado tener el mismo nivel de resistencia); Kheadr *et al.* (2002) y Briñez (2006), reportan una reducción de 3-4 ciclos logarítmicos en las cuentas del microorganismo a 200 MPa/ 5 pases y 300 MPa/1 pase respectivamente, lo cual demuestra el efecto aditivo del número de recirculaciones sobre la letalidad del proceso. La reducción de *L. monocytogenes* por HAP se ve influenciada por la temperatura de alimentación del fluido. Lanciotti *et al.* (1994, 1996) lograron reducciones de cuatro y siete ciclos logarítmicos con 150 MPa/37°C y 190 MPa/25°C respectivamente.

La resistencia de las esporas de bacterias Gram (+) a la HAP es mayor que la exhibida por las células vegetativas. Lanciotti *et al.* (1994) lograron una reducción de alrededor de 4.5 ciclos logarítmicos de *B. subtilis* con 150MPa/25°C. Mientras tanto, Feijoo *et al.* (1997) y Chaves-López *et al.* (2009), obtuvieron reducciones menores a un ciclo logarítmico de esporas de *B. licheniformis*, *B. cereus*, y *B. subtilis*, con tratamientos de 50-200 MPa/33-50°C; se requirieron tres recirculaciones para alcanzar una reducción comparable en la cuenta de esporas (cinco ciclos logarítmicos). Por otra parte, Bevilacqua *et al.* (2007) lograron reducir 1-1.5 ciclos logarítmicos de células vegetativas y menos de un ciclo de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* mediante 170 MPa/55°C. Asimismo, en este estudio, se mostró que la temperatura, el pH del medio y

la cepa del microorganismo influían en la magnitud de la inactivación.

Algunos microorganismos Gram (+) no patógenos de interés limitado en alimentos han sido investigados. Picart *et al.* (2006), obtuvieron una reducción de 2.5 ciclos logarítmicos en *Micrococcus luteus* a 300MPa/24°C. Por su parte, Briñez (2006), estudió la inactivación de *Staphylococcus carnosus* en leche y jugo de naranja con 300MPa/20°C, logrando una reducción de 3.5 ciclos logarítmicos.

Asimismo, se ha explorado la inactivación de bacterias fermentativas Gram (+), como *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, por medio de HAP, principalmente como parte de la flora nativa de leche y jugo de naranja. Lanciotti *et al.* (2007), empleando 150 MPa/10°C para procesar suspensiones microbianas de diferentes especies de lactobacilos, reportaron magnitudes de inactivación de 0 a 1.5 ciclos logarítmicos. Smiddy *et al.* (2007), lograron disminuciones de 3.5 ciclos logarítmicos en la carga inicial de bacterias fermentativas empleando 200-250 MPa de presión y 55-70°C de temperatura de entrada. Por su parte, Tahiri *et al.* (2006) obtuvieron una disminución de aproximadamente 3.5 ciclos logarítmicos a 200 MPa/25°C en cepas de *Lactobacillus plantarum*; el nivel de inactivación resultante del proceso se elevó a más de seis ciclos logarítmicos cuando se aplicaron 5 pases.

Bacterias Gram (-). Con respecto a este grupo de bacterias, los principales microorganismos evaluados incluyen *E. coli*, (junto con la cepa O157:H7), *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium y *Shigella flexneri* (Lanciotti *et al.*, 1994; 1996; Miller *et al.*, 2002; Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003; 2005; Tahiri *et al.*, 2006; Briñez, 2006).

Para *E. coli* los niveles de presión utilizados se encuentran entre los 100-300 MPa, la temperatura de entrada entre los 6-25°C y el número de recirculaciones (de 1 a 5) (Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2004; 2005; Tahiri *et al.*, 2006; Briñez, 2006). Los resultados obtenidos son similares en todos los estudios realizados, ya que con 200 MPa se logró un nivel de inactivación de alrededor de tres ciclos logarítmicos (Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2005; Tahiri *et al.*, 2006); mostrándose un incremento en la inactivación, al aumentar la presión y recirculaciones. Con 300 MPa se han obtenido hasta 4.5 ciclos logarítmicos de reducción en las cuentas, y alrededor de seis ciclos logarítmicos al realizar cinco recirculaciones (Wuytack *et al.*, 2002; Tahiri *et al.*, 2006; Briñez, 2006). Adicionalmente, algunos factores extrínsecos como el aumento de temperatura y la disminución de la viscosidad relativa de la matriz alimenticia, aumentan el nivel de inactivación del microorganismo (Diels *et al.*, 2005; Briñez, 2006).

La inactivación de *Yersinia enterocolitica* por HAP se ha explorado usando diversos intervalos de presión (100-300 MPa) y temperatura (5-50°C) (Lanciotti *et al.*, 1994; Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003). Reducciones de hasta 3 ciclos logarítmicos se han obtenido con 300 MPa/50°C (Lanciotti *et al.*, 1994; Wuytack *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003). Por otra parte, *Salmonella typhimurium*, ha probado ser más resistente al tratamiento HAP (250 MPa/25°C, dos ciclos logarítmicos), que *Shigella flexneri* (4.5 ciclos logarítmicos) (Wuytack *et al.*, 2002).

Para el caso de los psicrótrofos, se ha estudiado predominantemente a *Pseudomonas fluorescens*. Los niveles de inactivación de *P. fluorescens* a 200 MPa y diversas temperaturas de entrada (25,55 y 70°C) están en un rango de 3-6 ciclos

logarítmicos (Wuytack *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2005; Picart *et al.*, 2006; Smiddy *et al.*, 2007). Estos datos son contradictorios con los reportados por Thiebaud *et al.* (2003), que utilizando una presión de 200 MPa/25°C, obtienen una inactivación de bacterias psicrótrofas de sólo 1.6 ciclos logarítmicos. Esta diferencia en los datos reportados es debida, en su mayor parte, al uso de la temperatura como un efecto sinérgico en la inactivación.

Las bacterias coliformes han sido evaluadas en diversos estudios. En términos generales, los resultados muestran un aumento en el nivel de inactivación como respuesta al incremento de presión. Wuytack *et al.* (2002), logran una inactivación de alrededor de tres, cuatro y cinco ciclos logarítmicos a 200, 250 y 300 MPa respectivamente, empleando 25°C de temperatura de entrada. Este resultado concuerda con lo reportado por Smiddy *et al.* (2007), que empleando 250 MPa, obtienen un nivel de reducción de cuatro ciclos logarítmicos.

Mohos y levaduras. Dentro de este grupo de microorganismos, se han llevado a cabo contados estudios acerca de su inactivación por medio de HAP, siendo más comunes para las levaduras. Tahiri *et al.* (2006) publicaron el único estudio a la fecha sobre inactivación por HAP. En éste, cepas de *Penicillium spp.* aisladas de jugo de naranja fueron tratadas a presiones de 100, 150 y 200 MPa/25°C y 1, 3 y 5 recirculaciones. Los resultados indican una gran resistencia de los mohos al tratamiento, pues aún con cinco pases el máximo nivel de inactivación fue de 2.2 ciclos logarítmicos.

En cuanto a levaduras, las más estudiadas a la fecha son *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica* debido a sus numerosas aplicaciones industriales. Kleining y Middleberg (1998), llevaron a cabo un

estudio teórico sobre las fuerzas de tensión y su correlación con el número de Reynolds (Re), número de Weber (We) y el número de Aceleración (Ac) en un homogenizador, y cómo éstas pueden provocar la disrupción de levaduras que cumplen con condiciones específicas (ser de pared celular delgada, con forma esférica, rellenas de líquido). A una presión de 56 MPa, se puede lograr la disrupción de la levadura. Por otra parte, Lanciotti *et al.* (1994 y 1996) realizaron estudios sobre el nivel de inactivación de *Y. lipolytica* con presiones en el rango de 40-200 MPa; además, evaluaron el posible efecto sinérgico de barreras adicionales (temperatura, pH, a_w) sobre el nivel de inactivación. Los resultados muestran una reducción de 4.5 ciclos logarítmicos a 200 MPa/25°C. Mayores niveles de inactivación fueron alcanzados al incrementar la temperatura, pero los efectos de pH y a_w no fueron significativos. Tahiri *et al.* (2006) evaluaron el nivel de inactivación de *S. cerevisiae* aislada en jugo de naranja, usando niveles de presión de 100, 150 y 200 MPa/25°C y 1, 3, y 5 recirculaciones. Los niveles de inactivación alcanzados a 200 MPa y una recirculación fueron menores a un ciclo logarítmico, pero con cinco recirculaciones se alcanzó un nivel de inactivación mayor a los dos ciclos logarítmicos.

Virus. Los virus en alimentos han sido poco estudiados, y por ende, los estudios sobre su inactivación por medio de HAP son escasos. Jean *et al.* (2001), estudiaron el uso de HAP para inactivar el virus de la Hepatitis A, reportando una resistencia del virus alta, ya que un ciclo logarítmico de reducción requirió de un proceso a 300MPa con 5 pases.

Otros estudios se han llevado a cabo con la intención de evaluar el uso de HAP como

medio para inactivar bacteriófagos de lactobacilos (debido a su importancia en la industria láctea). Moroni *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio sobre la inactivación de los bacteriófagos de lactococos *c2*, *sk1* y *ul36* inoculados en leche, buffer fosfato y suero de leche filtrado, empleando 100 y 200 MPa/25°C y 1, 3 y 5 recirculaciones en el equipo. Un proceso a 200 MPa y cinco recirculaciones logró un nivel de inactivación de cinco ciclos logarítmicos en buffer y de 2.5-3 en los demás sistemas. Posteriormente, Capra *et al.* (2009), evaluaron el uso de HAP para inactivar bacteriófagos de *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. paracasei* y *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis* empleando condiciones similares a las utilizadas por Moroni *et al.* (2002), logrando niveles de inactivación de alrededor de seis ciclos logarítmicos al usar 100 MPa y cinco recirculaciones; en algunos casos, la barorresistencia de los bacteriófagos resultó muy elevada, ya que aún cuando emplearon ocho recirculaciones no lograron reducir completamente la carga inicial del virus (6 log).

Tendencias a futuro

Dentro de las tendencias a futuro en el uso de la tecnología HAP se encuentra su empleo como una etapa del proceso en la elaboración de diversos productos (yogurt, quesos, yogurt de leche de soya, entre otros). Adicionalmente a las ventajas de orden microbiológico, la HAP propicia el desarrollo de propiedades funcionales únicas en los productos antes mencionados, lo cual amplía sus posibilidades de aplicación industrial. Lanciotti *et al.* (2006), elaboraron queso tipo *Caciotta* con leche tratada por HAP, comparándola con leche pasteurizada (HTST) y cruda. En este estudio, se muestra la reducción de la carga microbiana

acompañada de la mejora en el rendimiento de la cuajada, con un aumento en el nivel de proteólisis y lipólisis. Burns *et al.* (2008), elaboraron queso tipo *Crescenza* con leche HAP, mostrando un aumento en el rendimiento de la cuajada y afectando positivamente la viabilidad de los microorganismos probióticos empleados en su elaboración, además de exhibir un efecto positivo en el nivel de proteólisis y lipólisis mostrado, sin ser observada ninguna diferencia sensorial con respecto a los quesos elaborados con leche pasteurizada (HTST). Resultados similares en el aumento del rendimiento de la cuajada fueron observados por Ruiz-Espinosa *et al.* (2008), en la elaboración de queso tipo *Panela*. Ferragut *et al.* (2009), emplearon leche de soya tratada por HAP para la elaboración de una bebida tipo yogurt, comparándolo con uno elaborado con leche de soya sin tratamiento HAP; los resultados muestran una mayor capacidad de retención de agua, además de una mayor firmeza del producto durante el tiempo de almacenamiento.

Conclusión

El uso de la HAP demostró su eficacia en la inactivación de distintos microorganismos de interés en alimentos fluidos. Aún cuando existen variaciones en el nivel de inactivación logrado para los distintos grupos microbianos (atribuibles a factores intrínsecos y extrínsecos del proceso), los datos reportados en la bibliografía indican que es posible obtener una reducción importante de la carga microbiana; sin embargo, se requiere de mayor investigación antes de proponer su uso como sustituto de procesos térmicos tradicionales, incluyendo la pasteurización. De manera adicional, la posibilidad de ampliar las aplicaciones industriales para esta tecnología se ven favorecidas debido al desarrollo de

propiedades funcionales únicas en los fluidos tratados por HAP.

Referencias

- Bevilacqua, A., Cibelli, F., Corbo, M. R. y Sinigaglia, M. 2007. Effects of high-pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*. 45:382–386.
- Briñez, W. J. 2006. Estudio de la inactivación por ultra alta presión de homogeneización de microorganismos en alimentos líquidos. Valoración de los procesos de limpieza y desinfección de los equipos. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A., Hernández Herrero, M. y Guamis B. 2006. Inactivation of *Staphylococcus spp.* strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenization at inlet temperatures of 6 and 20°C. *Food Control*. 18:1282–1288.
- Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G. C., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R. y Guerzoni, M. E. 2008. Probiotic crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*. 91:500–512.
- Capra, M. L., Patrignani, F., Quiberoni, A. L., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R. y Guerzoni, M. E. 2009. Effect of high pressure homogenization on lactic acid bacteria phages and probiotic bacteria phages. *International Dairy Journal*. 19:336–341.
- Chaves-López, C., Lanciotti, R., Serio, A., Paparella, A., Guerzoni E. y Suzzi, G. 2009. Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. *Food Control*. 8: 691-695.
- Cruz, N., Capellas, M., Hernandez, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., Ferragut, V. 2007. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research International*. 40:725–732.

- Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. y Kelly, A. L. 2005. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*. 72:1–7.
- Diels, A., Wuytack, E. y Michiels, C. 2003. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 87:55–62.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B. y Michiels, C. W., 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. *Biotechnology Progress*. 20:1512–1517.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B. y Michiels, C. W. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*. 101:281–291.
- Diels, A. M. J. y Michiels, C. W. 2006. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 32:201–216.
- Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., y Martin, J. H. 1997. Effects of microfluidizer technology on *Bacillus licheniformis* in ice cream mix. *Journal of Dairy Science*. 80:2184-2187.
- Ferragut, V., Cruz, N. S., Trujillo, A., Guamis, B. y Capellas, M. 2009. Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk. *Journal of Food Engineering*. 92: 63–69.
- Fluory, J., Desrumaux, A. y Lardières, J. 2000. Effect of high pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovations in Food Science Emerging Technology*. 1(3):127-134.
- Freeman, M. 2007. Comunicación personal. Stansted Fluid Power Ltd.
- Geciova, J., Bury, D. y Jelen, P. 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry-a review. *International Dairy Journal*. 12:541-553.
- Hayes, M. G., Fox, P. F. y Kelly, A. L. 2005. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*. 72: 25-33.
- Jean, J., Burton, B., Darveau, D. y Fliss, I. 2001. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Dec. 5593–5600.
- Kheadr, E., Vachon, J. F., Paquin, P. y Fliss, I. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*. 12:435–446.
- Kleining, A. R. y Middleberg, P. J. 1998. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*. 53:5: 891-898.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Angellini, P. y Guerzoni, M.E. 1994. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 18:314-322.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M. y Guerzoni, M.E. 1996. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 165-1 68.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Pittia, P. y Guerzoni, M. E. 2004. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yogurt. *Food Microbiology*. 2:753–760.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Patrignani, F., Lucci, L., Vallicelli, M., Ndagijimana M., y Guerzoni, M. E. 2006. Effect of high pressure homogenisation of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of *Caciotta* cheese. *Journal of Dairy Research*. 73:216–226.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Lucci, L., Saracino, P., Guerzoni, M. E. 2007. Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of

- proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. *Food Chemistry*. 102:542–550.
- Miller, J., Rogowski, M. y Kelly, W. 2002. Using a CFD model to understand the fluid dynamics promoting *E. coli* breakage in a high-pressure homogenizer. *Biotechnology Progress*. 18:1060–1067.
- Moroni, O., Jeana, J., Autretb, J. y Fliss, I. 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal*. 12:907–913.
- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Canovas, G. V. y Swanson, G. 1999. High Pressure Treatment in Food Preservation. En: *Handbook of Food Preservation*. M.S. Rahman (ed). Marcel Dekker Inc. EUA.
- Paquin, P. 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: The effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *Journal of Dairy Science*. 9:329–335.
- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Guiraud, J. P., Cefitel, J. C. y Dumay, E. 2006. Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*. 73:454–463.
- Popper, L. y Knorr, D. 1990. Applications of high pressure homogenisation for food preservation. *Food Technology*. 44 (7) 84–89.
- Ruiz-Espinosa, H., Martínez-Valencia B., Arellanes-Lozada, P., Amador-Espejo, G. y Welti-Chanes, J. 2008. “Panela Cheese Elaborated With High-Pressure Homogenized Milk”. Presentación oral. III International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. 14-17 de Octubre de 2008. Querétaro, México.
- Schultz, S., Wagner, G. y Urban, K. 2004. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering and Technology*. 27(4):361–368.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D. y Livney, Y. D. 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*. 21(5-6):936–942.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B. y Ferragut, V. 2007. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows’ milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*. 17:782–790.
- SFP. Stansted Fluid Power Ltd. 2005. *G7400 Series homogenizer Operating Instructions*. 3rd. Ed. Essex, Reino Unido. pp 24–38.
- Smiddy, M. A., Martin, J., Huppertz, T. y Kelly, A. 2007. Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk. *International Dairy Journal*. 17: 29–32.
- Tahiri, I., Makhoulf, J., Paquin, P. y Fliss, I. 2006. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. *Food Research International*. 39. 98–105.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P. y Cefitel, J. C. 2003. High-Pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*. 13:427–439.
- Vachon, J. F. Kheadr, E. E., Giasson, J., Paquin, P. y Fliss, I. 2002. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*. 65(2): 345–352.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J. y Michiels, C. W. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 77: 205–212.



Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas

E. Vega – Portocarrero* y A. López-Malo

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México.*

Resumen

Los aceites esenciales tienen efecto antimicrobiano por los compuestos fenólicos, terpénicos y otros compuestos volátiles. Estos compuestos tienen capacidad de alterar las células microbianas; aunque sus mecanismos de acción y los factores extrínsecos e intrínsecos asociados a su actividad antimicrobiana cuando son adicionados a alimentos, no han sido del todo estudiados. La adición de aceites esenciales a diversos alimentos puede satisfacer la demanda de los consumidores de obtener productos alimenticios naturales, sin o con la menor cantidad de conservadores químicos. Por ello la importancia de conocer las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales provenientes de especias y hierbas. El objetivo de este artículo es presentar una descripción de los agentes antimicrobianos naturales, las características de los aceites esenciales presentes en especias y hierbas, sus mecanismos de acción y los factores que afectan su actividad antimicrobiana y algunos usos de estos aceites esenciales en productos alimenticios.

Palabras clave: agentes antimicrobianos, especias, hierbas, aceite esencial, mecanismos de acción.

Abstract

The essential oils have antimicrobial effects due to their content of phenolic, terpenes and other volatile compounds. These compounds have the capacity to alter microbial cells, but the mechanisms of action and intrinsic and the extrinsic factors associated with their antimicrobial activity when added to food, has not been fully studied. The use of essential oils in food could satisfy the consumer demand to natural foods, with fewer or without addition of chemical preservatives. Hence the importance of knowing the antimicrobial properties of essential oils from spices and herbs. The objective of this article is to present a description of natural antimicrobial agents, essential oils characteristics of spices and herbs, their mechanisms of action and the factors that affect its activity, their antimicrobial effect and some uses of essential oils in foods.

Keywords: antimicrobial agents, spice, herbs, essential oil, mechanisms of action.

Introducción

La utilización de sustancias naturales en la conservación de alimentos constituye en la

actualidad un desafío en la industria alimentaria, ya que los consumidores demandan cada vez más alimentos sin conservadores, asociando alimentos sanos y seguros con alimentos frescos o mínimamente procesados (López-Malo, 1995).

* Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: econsuelovp@yahoo.com

La actividad biológica de una planta medicinal reside en uno o un conjunto de compuestos químicos que se encuentran en los tejidos de la planta. Sus componentes antimicrobianos están mayormente contenidos en el aceite esencial presente en las hojas, flores, bulbos, rizomas, frutos o alguna otra parte de la planta (López-Malo *et al.*, 2005). Los aceites esenciales resultan ser el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas y están constituidos principalmente por terpenos con actividad y composición variada.

Los aceites esenciales han sido utilizados desde hace mucho tiempo para diversas aplicaciones. Los habitantes indígenas de varias regiones del mundo utilizaron una amplia variedad de estos aceites como agentes medicinales, para tratar diferentes padecimientos; asimismo, los aplicaron en el curado de varios de sus alimentos. Este conocimiento tradicional, sumado a la gran cantidad de sustancias que las plantas elaboran como subproductos metabólicos, ha llevado a centrar la atención de una parte importante de la investigación en la conservación de los alimentos, en el estudio de extractos vegetales con poder antimicrobiano y su potencial aplicación como conservadores de alimentos (García y Sólis, 2000).

Existen múltiples reportes (Ismail y Pierson, 1990; Aureli *et al.*, 1992; Juven *et al.*, 1994; Faleiro *et al.*, 2003, Radudiene *et al.*, 2005 y Luqman *et al.*, 2007) que demuestran la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hierbas, muchos de los cuales fueron realizados “*in vitro*” y algunos otros sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en alimentos.

Por ello, el objetivo de la presente revisión es dar a conocer una descripción de los agentes antimicrobianos naturales, de las

características de los aceites esenciales presentes en especias y hierbas, sus mecanismos de acción y factores que afectan su actividad antimicrobiana y algunos estudios sobre el uso de estos aceites en productos alimenticios.

Revisión bibliográfica

Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son compuestos químicos presentes o añadidos en los alimentos que retardan el crecimiento microbiano o causan la muerte de los microorganismos (López-Malo, 2000). Desde la antigüedad se utilizaban algunos tipos de agentes que parecían útiles para la conservación de los alimentos, ya que se notaba que al agregarlos, el alimento duraba más tiempo; ejemplo de ello es la sal común, la cual se ha utilizado para preservar alimentos tales como carne, pescados, mariscos, verduras y muchos otros productos.

Actualmente se producen antimicrobianos en forma sintética, pero éstos también se encuentran presentes en forma natural en diversos alimentos. De tal manera que los compuestos químicos de acción antimicrobiana pueden clasificarse como aditivos tradicionales con acción directa o indirecta (Moreno, 2002).

Los antimicrobianos de acción directa son aquellos que son adicionados intencionalmente al alimento con la finalidad de lograr un efecto de inhibición del crecimiento de microorganismos. Son químicamente reconocidos como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration). Los principales grupos microbianos sobre los

cuales muestran ser efectivos se presentan en la Tabla I. utilizara el agente antimicrobiano de manera

Tabla I. Antimicrobianos sintéticos de acción directa^a

Antimicrobiano	Microorganismos sobre los que actúa
Acido propiónico y propionatos	Mohos
Acido sórbico y sorbatos	Mohos
Acido benzoico y benzoatos	Mohos y levaduras
Parabenos	Mohos y levaduras
SO ₂ y sulfitos	Bacterias, mohos y levaduras
Oxido de etileno y de propileno	Mohos y levaduras
Diacetato de sodio	Mohos
Nisina	Bacterias ácido lácticas, Clostridia
Acido dehidroacético	Insectos
Nitrito de sodio	Clostridia
Etil-formato	Mohos y levaduras

^aJay (1991)

Los agentes antimicrobianos con acción indirecta son sustancias químicas añadidas con otros objetivos diferentes a la acción antimicrobiana, como por ejemplo los fosfatos y antioxidantes fenólicos (Davidson y Branen, 1993).

Tradicionalmente, los agentes antimicrobianos eran utilizados de manera individual para conservar alimentos (Busta y Foegeding, 1983); sin embargo, recientemente el uso de mezclas de agentes para la conservación de alimentos está siendo evaluado.

Teóricamente, el uso de mezclas de agentes antimicrobianos puede proveer un mayor espectro de actividad provocando un incremento en la acción antimicrobiana sobre microorganismos patógenos y/o deteriorativos. Se cree que la mezcla de agentes antimicrobianos puede actuar sobre diferentes especies de microorganismos, o actuar sobre diferentes puntos vitales dentro de las células, lo cual resulta en un mejor control de los microorganismos presentes en el alimento, en comparación a que si se

individual (Santiestéban *et al.*, 2006).

A pesar de que los antimicrobianos tradicionales han sido utilizados durante mucho tiempo, con buenos resultados, la preocupación de los consumidores actuales por reducir su ingesta de aditivos sintéticos, ha llevado a evaluar la capacidad antimicrobiana de productos naturales como los presentes en hierbas y especias.

Agentes antimicrobianos naturales

Un amplio espectro de antimicrobianos naturales han sido aislados e identificados a partir de microorganismos, animales y plantas; un gran número de ellos ya son empleados para la conservación de alimentos, mientras que muchos otros que han sido estudiados para poder ser usados en los alimentos (Quispe, 1994).

Los antimicrobianos naturales pueden ser de origen animal como la lisozima, las proteínas quelantes, los sistemas enzimáticos (lactoperoxidasa), los péptidos y algunos antibióticos naturales; de origen vegetal como los ácidos orgánicos, el timol, el

carvacrol, el eugenol, los isotiocianatos, la alicina, los fenoles y los polifenoles; y de origen microbiano como la nisina y primaricina, entre otros (Jay, 1991).

Los compuestos antimicrobianos de origen vegetal están contenidos en las hojas, flores y capullos, bulbos, rizomas, frutas u otras partes de las plantas. Estos componentes pueden ser letales para la célula microbiana o pueden simplemente inhibir la producción de algún metabolito (López-Malo *et al.*, 2005).

Antimicrobianos derivados de especias y hierbas

La actividad antimicrobiana de las especias y hierbas se atribuye generalmente a compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales de las mismas (López-Malo, 2000; Holley y Patel 2005). Las plantas tienen capacidad para sintetizar compuestos aromáticos, la mayoría de los cuales son compuestos fenólicos o sus derivados y estas sustancias sirven a las plantas como mecanismos de defensa contra la depredación de microorganismos e insectos (López-Malo *et al.*, 2005).

Bauer *et al.* (2001) señalaron que algunos compuestos con actividad antimicrobiana están presentes en gran proporción en los aceites esenciales, constituyendo hasta el 80% de los mismos, otros compuestos están sólo en trazas. En la Tabla II se muestran algunos compuestos con actividad antimicrobiana que se encuentran en hierbas.

Aceites esenciales

La definición aceptada para los aceites esenciales es: “Un producto volátil obtenido de una materia prima vegetal mediante destilación, ya sea con vapor o por inmersión en agua caliente” (Munares, 1983).

Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos orgánicos provenientes de una misma familia química, como los terpenoides. También se definen como mezclas de sustancias orgánicas que componen la fragancia de las plantas; estos componentes volátiles de los aceites pertenecen a la familia de compuestos conocidos como terpenos, son de naturaleza oleosa y son encontrados prácticamente en todas las plantas, ampliamente distribuidos en sus distintas partes como raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Mattos, 2007).

Los terpenos son a menudo llamados isoprenoides, teniendo en cuenta que el isopreno es su precursor biológico. Presentan una gran variedad estructural; derivan de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos, basadas en la estructura del isopentenilo. Son monómeros considerados como unidades isoprénicas y se clasifican por el número de unidades de sus carbonos. Los productos que provienen del metabolismo del isopreno abarcan a los terpenos, los carotenos, las vitaminas, los esteroides, entre otros compuestos. Tienen en común la propiedad, de generar diversos aromas agradables y de ser perceptibles por los humanos (Carey, 2003).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja, los aceites esenciales se clasifican de acuerdo a sus componentes mayoritarios. Según esto, los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por ejemplo los aceites de hierbabuena, albahaca y salvia), los que abundan en sesquiterpenos se conocen como aceites esenciales sesquiterpénicos (por ejemplo los aceites de copaiba, pino y junípero); los que tienen altos contenidos de fenilpropanos son los aceites esenciales, fenilpropanoides (por ejemplo los aceites de clavo, canela y anís) (Escobedo, 1987).

Tabla II. Componentes de aceites esenciales que presentan actividad antimicrobiana^a

Nombre común de la planta	Nombre científico de la planta	Componente	Concentración máxima del componente en el aceite esencial (%)
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalool	26
		E-2-decanal	20
Canela	<i>Cinnamomum zaylandicum</i>	Trans-cinnamaldehído	65
			80
		Carvacrol	64
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Timol Terpineno	2-52
		Cymeno	52
		Pineno	2-25
		Acetato de bornil	0-17
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Canfor	2-14
		1,8 Cineolo	3-89
		Eugenol	75-85
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Acetato de eugenil	8-15
		Timol	10-64
		Carvacrol	2-11
		Terpineno	2-31
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Cimeno	10-56

^aBauer *et al.* (2001)

Características de los aceites esenciales

Los aceites esenciales o esencias volátiles son productos de intenso olor que se extraen de plantas aromáticas. Si bien se usan principalmente en la industria alimenticia y cosmética, muchos de ellos poseen probadas propiedades terapéuticas como antimicrobianos. Numerosos trabajos reportan la acción antiviral y antibacteriana de sustancias terpenoides presentes en la fracción de aceite esencial extraído de plantas aromáticas (Mattos, 2007).

A condiciones ambientales, los aceites esenciales son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella. Poseen un color en la gama del amarillo, hasta ser transparentes en algunos casos (Munares, 1983).

Los aceites esenciales son flamables, no tóxicos, aunque pueden provocar alergias en

personas sensibles a determinados terpenoides; son en general inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, el aire, el calor, los ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes y casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco). Tienen propiedades de solvencia para los polímeros con anillos aromáticos presentes en su cadena. Son aceptados como sustancias seguras GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Martínez, 2008).

Los aceites esenciales contienen componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; todos ellos fácilmente separables, ya sea por métodos químicos o físicos (destilación, refrigeración, centrifugación, entre otros) (Vásquez *et al.*, 2001). Son

obtenidos del material que los contiene utilizando principalmente el clásico procedimiento de destilación por arrastre de vapor. Otros métodos usuales son la extracción con solventes lipofílicos y el enflorado; este último bastante usado en perfumería (Cano, 2007).

Mecanismos de acción de los aceites esenciales contra los microorganismos

Algunos aceites esenciales afectan las funciones metabólicas microbianas, como la respiración, la producción de toxinas o ácidos, pero pueden presentar diferente especificidad respecto a los sitios activos en la célula microbiana de acuerdo a su composición (López-Malo *et al.*, 2005).

Luqman *et al.* (2007) reportan que la inactivación microbiana de los aceites esenciales es causada por daño en la pared celular de los microorganismos, desórdenes en la membrana citoplasmática, agotamiento de las fuerzas motrices de los protones, coagulación de los contenidos celulares o alteraciones en el flujo de electrones, en el flujo del contenido celular y en el transporte activo.

Davidson y Branen (1993) indicaron que el modo de acción de los compuestos fenólicos es inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético. Además, López-Malo (1995) señala que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales puede deberse al deterioro de varios sistemas enzimáticos en los microorganismos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales.

Se han realizado muchos estudios evidenciando el efecto bactericida de los aceites esenciales; sin embargo, su actividad

varía, ya que sus componentes son diferentes. (Ohno *et al.*, 2003).

Una característica importante de los componentes de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, la cual permite la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, desordenando la estructura de éstos haciéndola más permeable, lo que permite la filtración de iones y otros contenidos celulares (Oosterhaven *et al.*, 1995). Burt *et al.* (2007), señalaron que al exponer las células a concentraciones subletales de agentes antimicrobianos naturales (como carvacrol y timol), hay cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, presentándose un aumento de los ácidos grasos insaturados.

Factores que afectan la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Son muchos los factores que afectan la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. El grado de inhibición depende del tipo de microorganismo, del tipo de sustrato, de las variaciones en la composición de la planta, especie o fruto, de las diferencias en las zonas geográficas de cultivo, entre otros (Mattos, 2007).

López-Malo (1995) menciona que el espectro de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende en gran medida del microorganismo a inhibir, ya que los microorganismos difieren en su resistencia. Además, cuando el aceite es incluido en un alimento, éste puede interactuar aumentando disminuyendo la capacidad antimicrobiana y la eficacia del aceite esencial.

Algunos factores intrínsecos y extrínsecos están asociados con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en alimentos. Estos incluyen temperatura, composición de la atmósfera, pH, potencial

de óxido-reducción y actividad de agua, entre otros. En los casos en los que la muestra es expuesta a una atmósfera conteniendo el aceite esencial, las condiciones deben ser cuidadosamente controladas para obtener resultados significativos. El número inicial de microorganismos debe ser consistente para que los resultados sean reproducibles. El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación, ésta debe ser la óptima de crecimiento del microorganismo a evaluar, ya que en la mayoría de los casos, el incremento de la temperatura de exposición incrementa el efecto antimicrobiano del aceite. La composición de la atmósfera juega un papel muy importante, es necesario definir si el microorganismo es anaerobio o no (Beuchat y Golden, 1989).

La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales se ve favorecida por valores de pH bajos; ello se atribuye al incremento de la solubilidad y estabilidad de estos compuestos (López-Malo *et al.*, 2005). Juven *et al.* (1994) mencionan que a valores de pH bajos las moléculas de compuestos fenólicos, como el timol, se encuentran mayormente no disociadas, presentándose regiones hidrofóbicas en las proteínas y disolviéndose mejor la fase de lípidos de la membrana.

Algunos estudios sobre el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de especias y hierbas

La actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales de especias y hierbas ha sido evaluada por diferentes autores. Ismael y Pierson (1990) observaron que los aceites de clavo, tomillo, pimienta, orégano y canela previnieron la germinación de *Clostridium botulinum*. Mientras que Aureli *et al.* (1992) probaron la actividad antimicrobiana de estos mismos aceites esenciales en sistemas modelo, para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, determinando que

los constituyentes más activos fueron timol, aldehído cinámico, eugenol y carvacrol.

Juven *et al.* (1994) observaron que la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos de ciertos aceites esenciales, sensibiliza la membrana celular de *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, provocando la saturación de los sitios activos, de tal forma que se generó un daño irreversible, seguido del colapso de las células bacterianas.

En un estudio realizado con aceite esencial de tomillo, éste inhibió el crecimiento de *Proteus mirabilis*. El 1,8-cineol presente en el aceite tiene actividad antimicrobiana similar al linalol, contra ciertos microorganismos como *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* (Faleiro *et al.*, 2003).

En el trabajo de Radudiene *et al.* (2005), en el aceite esencial de orégano fue identificada una mezcla compleja de 75 compuestos, en un porcentaje de 82.2 a 98.4%, siendo los componentes mayoritarios mono y sesquiterpenos que representaron el 49.8 – 76.8% del total de aceite esencial extraído de las hojas de orégano. También se encontraron en el aceite germacreno-D, 1,8-cineolo, óxido de criofileno, terpineno-4- α -ol y espatulenol, siendo el carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, sabineno, cis-ocimeno, terpineno-4-ol y β -bisaboleno, los principales constituyentes del aceite esencial. Este aceite esencial mostró tener actividad antifúngica contra *Fusarium avenaceum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus stolonifer* y *Scopulariopsis brevicaulis*; los microorganismos más resistentes fueron levaduras como *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, *Aureobasidium pullulans*, y mohos como *Acremonium furcatum*.

En otro estudio con aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*), se observó su efecto antibacteriano frente a *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Su menor actividad se encontró frente a *Mycobacterium smegmatis* (Luqman *et al.*, 2007).

Uso de los aceites esenciales de especias y hierbas como antimicrobianos en productos alimenticios

Actualmente, los consumidores requieren que los productos que consume sean elaborados con sustancias naturales. En este ámbito, los aceites esenciales de especias y hierbas están siendo muy valorados. A continuación se comentan algunos estudios en los que se adicionaron aceites esenciales como agentes antimicrobianos a diversos alimentos.

La adición de 0.8 % (v/p) de aceite esencial de orégano permitió una reducción inicial de 2-3 ciclos logarítmicos de la población bacteriana presente en muestras de carne, incluyendo *L. monocytogenes* y bacterias ácido lácticas. Las muestras de carne fueron almacenadas en atmósfera modificada (40% CO₂, 30% O₂ y 30% N₂) y empacadas al vacío; se observó que a condiciones normales de almacenamiento la inhibición del crecimiento bacteriano fue menor (Tsigarida *et al.*, 2000).

En otro estudio realizado por Skandamis y Nychas (2001), el aceite esencial de orégano disminuyó el crecimiento de la población bacteriana presente en carne molida, almacenada en condiciones de atmósfera modificada. Las concentraciones más efectivas fueron 0.5% y 1%.

Ghaffi *et al.* (2007) detectaron que el aceite esencial de orégano tiene efecto sinérgico favorable con la bacteriocina producida por *Lactobacillus curvatus* CWBI-

B28, para el control de *L. monocytogenes*, en carne de cerdo durante el almacenamiento a 4 °C, pudiendo ser útil para mejorar la estabilidad de los productos cárnicos.

Por otra parte, Mejlholm y Dalgaard (2002) evaluaron nueve aceites esenciales para prolongar el tiempo de vida útil de filetes de bacalao envasados en una atmósfera modificada. Estos autores concluyeron que los aceites esenciales de orégano y canela presentaron la mayor inhibición del crecimiento de *Pseudomonas phosphoreum*, e incrementaron el tiempo de vida útil de los filetes de 11-12 días a 21-26 días a 2 °C, seguidos de los aceites esenciales de limón, tomillo, clavo, laurel, mejorana, salvia y albahaca.

Se ha estudiado el efecto bacteriostático de los aceites esenciales de orégano y canela en productos envasados que no son esterilizados, demostrando su efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Becerril *et al.*, 2007).

Por su capacidad de extender la vida de anaquel de un producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie de los alimentos, los aceites esenciales han sido incluidos en la formulación de películas comestibles, las cuales permiten incorporar agentes antimicrobianos para proveer estabilidad microbiológica a los alimentos (Rooney, 2002).

Los aceites esenciales también han sido aplicados a productos de panadería. La canela, el clavo de olor, el laurel, las hojas de limón y el tomillo, demostraron tener actividad antifúngica frente a hongos comunes que causan deterioro; aunque la combinación de estos aceites esenciales con el envasado en atmósfera modificada resulta ser una mejor alternativa (Guynot *et al.*, 2003).

Eissa *et al.* (2008) evaluaron el efecto inhibidor de cinco aceites esenciales extraídos de hojas de limón, albahaca, romero, salvia y clavo, contra la actividad de la enzima polifenoloxidasa, el pardeamiento enzimático, el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *A. ochraceus* y su producción de micotoxinas en muestras de jugo de manzana. Los mejores efectos de inhibición se encontraron con los aceites de hojas de limón, clavo y romero, cuando se adicionaron en dosis de 0.05, 0.2 y 0.9 %, respectivamente. Se encontró un incremento del tiempo de vida útil del jugo en cuatro semanas, a 4 °C de almacenamiento.

Se ha observado que las concentraciones que se requieren para lograr un efecto antimicrobiano de los aceites esenciales provenientes de especias y hierbas, son considerablemente más altas en alimentos que en medios de cultivo. Esto altera significativamente el sabor de los alimentos, por lo que sería conveniente reforzar la efectividad de los aceites esenciales puede reforzarse con el uso de aditivos o con combinaciones sinérgicas con otros factores, reduciendo así las concentraciones necesarias de aceite esencial para lograr la eficacia deseada (Gould, 1996).

Conclusiones

Los aceites esenciales constituyen una alternativa eficaz a los antimicrobianos tradicionales en el control del crecimiento microbiano en alimentos. Los compuestos activos mayoritarios de los aceites esenciales de especias y hierbas son los compuestos fenólicos, los cuales son efectivos para inhibir el crecimiento de un gran número de microorganismos.

La aplicación de la mayoría de los aceites esenciales se ve limitada por el hecho de que las concentraciones a las que se logra un efecto antimicrobiano importante, son suficientes para alterar el sabor de los alimentos adicionados con estos aceites; y en muchos casos tales alteraciones no suelen ser agradables. Por esto es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción y de los factores extrínsecos e intrínsecos asociados con el uso de aceites esenciales en alimentos, así como en la combinación de estos aceites con otras formas de conservación de los alimentos.

Referencias

- Aureli, P., Constantini, A. y Zolea, S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Protect.* 55:334-348.
- Basmacioglu, H., Tokusoglu, O. y Ergu, M. 2004. The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFA's in broilers. *South African Journal of Animal Science.* 34(3):197-210.
- Bauer, K., Garbe D. y Surburg H. 2001. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. Wiley-VCH. Weinheim. 293 p.
- Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goñi, P. y López, P. 2007. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analysis Bioanalysis Chemical.* 388:1003–1011.
- Beuchat, L.R. y Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology.* 43(1):134-142.
- Burt, S. A., Vander, R., Koets, A. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. y Veldhuizen, J. A. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology.* 73(14):4484 – 4490.

- Busta, F.F. y Foegeding, P. M. 1983. Chemical food preservatives. En: S. S. Block (Ed). *Desinfection, Sterilization and Preservation*. Tercera Edición. Lea y Febiger. Filadelfia. pp. 656-675.
- Cano, C. 2007. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Carey, F. A. 2003. *Organic Chemistry*. Quinta edición. McGraw-Hill, EE.UU. pp. 123.
- Davidson, P. M. y Branen, A. L. 1993. *Antimicrobials in food*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. pp. 95-136.
- Eissa H.A., Abd-Elfattah S.M. y, Abuf-Seif F.A. 2008. Anti-microbial, anti-browning and anti-mycoioxigenic activities of some essential oil extracts in apple juice. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 58 (4): 425-432
- Escobedo, M. S. 1987. Conservación de yuca (*Manihot esculenta grantz*) con aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis kunth griseb*) y con germicida químico “Bacoxin”. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. y Pedro, L.G. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in applied microbiology*. 36:35-40.
- García, C. y Solís, E. 2000. Evaluación in vitro de aceite esencial de muña y hierba luisa como agente fúngico de *Fusarium oxysporum* en plantas con potencia biocida. Edición RRAA. Perú.
- Ghali, H., Benkerroum, N., Doguiet, D., Bensaid, N. y Thonart, N. 2007. Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and selected essential oils to control *Listeria monocytogenes* in pork meat during cold storage. *Letters in applied microbiology*. 44:268-273.
- Gould, G.W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal Food Protection Supplement*. 12:82-86.
- Guynot, M.E., Ramos, A. J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V. y Marin, S. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*. 94:893-899.
- Holley, R. y Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essentials oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22(4):273-292.
- Ismail, A. y Pierson, M.D. 1990. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B y 1623E by essential oil of spices. *Journal Food Science*. 55(6):1676.
- Jay, J. 1991. *Modern Food Microbiology*. Van Nostrand Reinhold. Nueva York. pp. 176.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. y Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal Applied Bacteriology*. 76:626-631.
- López-Malo, A. 1995. Efecto de diversos factores sobre la capacidad antimicótica de vainilla. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México.
- López-Malo, A. 2000. La preservación multiobjetivo de alimentos: Efectos de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- López-Malo, A. Palou, E. y Alzamora, S. 2005. Naturally occurring compounds – plant sources, En: *Antimicrobials in Food*. Tercera edición. E.E.U.U. Editores. P. Michael Davidson, John N. Sofos y A. L. Branen. Editorial Taylor y Francis Group. pp. 428-451.
- Luqman, S., Dwivedi, G., Darokar, M., Kaira, A. y Khanuja, S. 2007. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Alternative therapies*. 13(5):54-59.
- Martínez, M. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceite esencial de lima. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Mattos, C. J. 2007. Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) como aditivo no nutricional en la estimulación de *Lactobacillus spp.* y control de *Salmonella thyphimurium* en cuyes de carne. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.

- Mejlholm, O. y Dalgaard, P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. 34:27-31.
- Moreno, P. M. 2002. Inhibición de *Aspergillus flavus* y *Penicillium digitatum* utilizando agentes antimicrobianos naturales y/o sintéticos. Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Munares, E. M. 1983. Estudio del aceite esencial de la muña (*Minthostachys mollis kunth griseb*) en almacenaje de papa como inhibidor de brotamiento y microorganismos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, S., Kodama, T., Kashima, K. y Imanishi J. 2003. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter*. 8:207-213.
- Oosterhaven, K., Poolman, B. y Smid, E. J. 1995. Scavone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products*. 4:23-31.
- Quispe, N. J. 1994. Efecto del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis kunth griseb*) en el almacenamiento de naranja (*Citrus senoeni linn osbeck*) Variedad Valencia. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Radudiene, J., Judpintiene, A., Peeilyte, D. y Inulis, V. 2005. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. *Biologija*. 4:53-58.
- Roneey, M. L. 2002. Active packaging: Science and application. En: J. S. Welti-Chanes, G. Barbosa-Cánovas y J. M. Aguilera. *Engineering and Food for the 21 st Century*. CRC Press, Boca Ratón EE.UU. pp. 539-547.
- Santiestéban, A., Palou, E. y López-Malo, A. 2006. Suceptibility of food borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a_w and pH. *Journal of Applied Microbiology*. 102(2):486-497.
- Skandamis, P.N. y Nychas, G. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91:1011-1022.
- Tsigarida, E., Skandamis, P.N. y Nychas, G. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology*. 89:901-909.
- Vásquez, O., Alva, A. y Marreros, J. 2001. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias Universidad Nacional Amazónica del Perú. Perú 1(1):38-42.



Extracción supercrítica de antioxidantes naturales a partir de hierbas y especias

L. A. Conde-Hernández* y J. A. Guerrero-Beltrán

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla,
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

La extracción con fluidos supercríticos (EFS) es una tecnología usada para la extracción de una gran variedad de compuestos químicos. Los materiales vegetales contienen muchos compuestos químicos con actividad antioxidante. El objetivo de este artículo es presentar información sobre la extracción con fluidos supercríticos de antioxidantes naturales obtenidos a partir de hierbas y especias. Este trabajo presenta información sobre aspectos generales de los antioxidantes naturales, una descripción del proceso de extracción con fluidos supercríticos, aspectos relacionados con las condiciones de operación para la extracción de compuestos antioxidantes, datos disponibles de compuestos antioxidantes obtenidos a partir de hierbas y especias y finalmente algunas aplicaciones de esta tecnología en la industria de alimentos. Las hierbas y especias como una fuente de antioxidantes, son una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos. El uso de la EFS (usando CO₂ como el agente de extracción) tiene muchas ventajas y variedad de aplicaciones; sin embargo, es importante establecer adecuadamente las condiciones de operación para la extracción de los compuestos químicos de interés.

Palabras clave: *Antioxidantes, extracción con fluidos supercríticos, hierbas y especias.*

Abstract

Supercritical fluid extraction (SFE) is a technology used to extract a variety of compounds. Vegetable materials may contain chemical compounds with antioxidant activity. The objective of this article is to provide information on the supercritical fluid extraction of natural antioxidants from herbs and spices. This paper presents a compilation and general aspects about natural antioxidants, a description of the supercritical fluid extraction, information regarding operational conditions for the extraction of antioxidant compounds, reported data of antioxidant compounds from herbs and spices, and finally some applications of this technology in the food industry. Spices and herbs, as a source of antioxidants, are a promising alternative to synthetic antioxidants. The use of the SFE (using CO₂ as the extraction agent) could have many advantages and a variety of applications, however, it is important to establish the optimal operation conditions for the extraction of the chemicals.

Keywords: *Antioxidants, supercritical fluid extraction, herbs and spices.*

* Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: lacondeh@hotmail.com

Introducción

Existe un gran interés en los antioxidantes naturales encontrados en ciertas plantas, ya que son una alternativa a los antioxidantes sintéticos. Las más importantes fuentes de antioxidantes naturales son las hierbas y especias (Yanishlieva *et al.*, 2006). Los materiales vegetales contienen muchos compuestos con actividad antioxidante. Algunas plantas han sido estudiadas como fuentes de antioxidantes naturales (Moure *et al.*, 2001). Uno de los primeros trabajos reportados es el de Chipault *et al.* (1956), quienes examinaron más de 70 especias y hierbas. Desde entonces, el interés en la actividad antioxidativa de especias se ha incrementado y ha conducido a un aumento en la información acerca de estos compuestos (Yanishlieva *et al.*, 2006).

El proceso de extracción con disolventes orgánicos puede ser utilizado para extraer antioxidantes, pero esto produce residuos no deseables y los extractos pueden experimentar transformaciones oxidativas durante la eliminación del disolvente. Debido al impacto ambiental negativo que tiene el uso de disolventes orgánicos líquidos en la extracción de productos naturales, hay un gran interés en usar técnicas de extracción alternativas y viables usando fluidos supercríticos. La extracción con fluidos supercríticos está ganando aceptación como una alternativa a la extracción Soxhlet (Verma *et al.*, 2008). En comparación con los disolventes orgánicos, líquidos y convencionales, los fluidos supercríticos tienen una difusividad más alta y menor densidad, viscosidad y tensión superficial. El CO₂ es el disolvente más frecuentemente usado para la extracción con fluidos supercríticos debido a las siguientes ventajas: no es tóxico ni inflamable, es seguro desde el punto de vista ambiental, ampliamente disponible, bajo costo a una alta pureza y es idóneo para extraer compuestos naturales con

baja volatilidad y polaridad. Además de que, cuando el extracto es recuperado en el proceso de separación, el CO₂ es fácilmente separado debido a su alta volatilidad. La EFS permite llevar a cabo la extracción de ingredientes activos a partir de hierbas y especias con una mejor reproducción del sabor y fragancia en comparación con los procesos convencionales. Se evita la degradación térmica y la descomposición de compuestos lábiles, debido a que el proceso opera a temperaturas reducidas, y en ausencia de luz y oxígeno, lo que previene reacciones oxidativas. Este último punto es de especial interés para la extracción de antioxidantes, ya que garantiza la conservación de las propiedades biológicas de los extractos obtenidos (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006).

Numerosos artículos de la EFS en varias hierbas y especias han sido publicados; pimienta negra (Sovová *et al.*, 1995), lavanda, tomillo, anís y salvia (Dapkevicius *et al.*, 1998), jengibre, romero y cúrcuma (Leal *et al.*, 2003), sésamo (Hu *et al.*, 2004), mejorana (Vági *et al.*, 2005), canela (Marongiu *et al.*, 2007), por mencionar sólo algunos ejemplos.

El objetivo de este trabajo es presentar información de la tecnología de extracción con fluidos supercríticos para la obtención de antioxidantes naturales obtenidos a partir de hierbas y especias.

Revisión bibliográfica

Antioxidantes

Los alimentos que contienen grasas y otros lípidos, terpenos e hidrocarburos ramificados, no son estables al almacenamiento prolongado o calentamiento intensivo. Los ácidos grasos insaturados, y particularmente, los poliinsaturados, son

oxidados siguiendo diferentes mecanismos y formando radicales libres, los cuales son convertidos en hidroperóxidos. Los hidroperóxidos no tienen olor ni sabor, pero se descomponen con la formación de compuestos volátiles, tales como alcanalos, alca-2-enalos, alca-2,4-dienalos, diferentes cetonas, alcoholes e hidrocarburos. Estos productos dan lugar a sabores desagradables (rancidez). El valor sensorial, y por tanto la aceptabilidad del alimento se ve sustancialmente deteriorada por la rancidez. La rancidez puede ser prevenida por diferentes métodos; usando materiales grasos pobres en ácidos grasos poliinsaturados, restringir el acceso de oxígeno y por la adición de inhibidores de la oxidación. Los más importantes inhibidores son los antioxidantes, los cuales son capaces de inactivar a los radicales libres formados durante la autooxidación. Estos inhibidores representan una clase de sustancias que varían ampliamente en estructura química y tienen diversos mecanismos de acción. (Pokorný, 2000). De acuerdo a Shahidi y Naczki (1995), la ruta clásica de la autooxidación incluye reacciones de: iniciación (producción de radicales libres lipídicos), propagación y terminación (producción de productos no-radicales).

Los principales antioxidantes son sustancias fenólicas (heterociclos de nitrógeno). La mayoría de antioxidantes activos contienen *ortho* o *para* grupos hidroxilos disustituidos. En el caso de las sustancias sintéticas, se prefieren los derivados disustituidos *para*, debido a su baja toxicidad, entre los antioxidantes naturales prevalecen los disustituidos *ortho* (Pokorný, 2000).

Por otro lado, los antioxidantes presentes en partes de hierbas y especias, son un beneficio en cuanto a su consumo, ya que ayudan a atrapar los radicales libres formados en el cuerpo y asociados con

enfermedades tales como el cáncer (Yanishlieva *et al.*, 2006).

Fuentes de antioxidantes naturales. Existen diversas fuentes de antioxidantes naturales, entre las que se encuentran: las frutas y verduras, así como sus productos procesados (Robards *et al.*, 1999; Collins y Harrington, 2003). Todos los granos (Decker *et al.*, 2002), cereales (Shahidi y Naczki, 1995), hongos (Mau *et al.*, 2002), plantas de la orilla del mar (Masuda *et al.*, 1999), y las algas marinas han sido consideradas como fuente de antioxidantes (Lim *et al.*, 2002). Ghiselli *et al.* (2000) reportaron actividad antioxidante para vinos y otras bebidas alcohólicas y Uccella (2001) lo hizo para aceite de oliva. Los téis contienen potentes antioxidantes y han sido estudiados debido a su alto contenido de compuestos fenólicos (Jeong y Kong, 2004). Mau *et al.* (2003) reportaron que los aceites esenciales contienen compuestos con actividad antioxidante (tales como colorantes y flavonoides). Sacchetti *et al.* (2005) encontraron que los terpenos y otros compuestos pueden causar un efecto sinérgico con los antioxidantes. Srinivasan (2005) reporta que las especias y las hierbas, así como las plantas aromáticas y medicinales, contienen principios activos con actividad antioxidante y que tienen efectos fisiológicos para los seres humanos (influencia hipolipidémica, potencial antidiabético, efecto antiinflamatorio, acción digestiva estimulante y antimutagénico). Los desperdicios sólidos y líquidos del procesamiento de alimentos (por ejemplo vinos, téis, papas, aceite de oliva) son fuentes de antioxidantes atractivas (Moure *et al.*, 2001).

Compuestos naturales con actividad antioxidante. Los principales antioxidantes son los fenoles, tales como los ácidos benzoicos y cinámicos (Mansouri *et al.*, 2005), flavonoides (Van Acker *et al.*, 1996),

péptidos y proteínas (Kitts y Weiler, 2003), productos de la reacción de Maillard (Yilmaz y Toledo, 2005), azúcares y polioles (Faraji y Lindsay, 2004), y ácido láctico (Lin y Yen, 1999). Además de los compuestos fenólicos, se encuentran los carotenoides (Modey *et al.*, 1996) vitamina C (Kalt *et al.*, 1999), vitamina E (Quites *et al.*, 2002). Los compuestos mencionados anteriormente se encuentran presentes en hierbas y especies. En la Tabla I se muestran algunos compuestos antioxidantes específicos.

Determinación de la actividad antioxidante. Existen diversos métodos para medir la actividad antioxidante en diversas situaciones (condiciones de operación, oxidantes, iniciadores, condiciones de oxidación, composición y estructura del alimento y disponibilidad de oxígeno), lo cual hace difícil comparar e interpretar los resultados obtenidos en la literatura (Gordon, 2001). Las características consideradas para estandarizar una prueba son presentadas en la revisión realizada por Prior *et al.* (2005). Una variedad de métodos para evaluar la actividad antioxidante está basada en la capacidad depuradora de los radicales libres, ya que la generación de radicales libres está directamente relacionada con la oxidación de alimentos y sistemas biológicos. Los radicales más frecuentemente usados son: superóxidos, hidroxilos, óxido nítrico, alquilperóxidos, N-N, dimetil- *p*-fenilendiamina y DPPH (2,2-

difenil-1-picrilhidrazil) (Gordon, 2001). Un método alternativo a la depuración de radicales fue propuesto por Zaporozhets *et al.* (2004) quien mide la habilidad de quelación. Anese y Nicoli (2003) reportan que el potencial redox da un índice de la efectiva eficiencia de oxidación/reducción de todos los antioxidantes presentes en el medio. La prueba del poder antioxidante reductor ferroso (FRAP, por sus siglas en inglés) está basada en la habilidad de los antioxidantes para reducir un complejo férrico a ferroso (Benzie y Strain, 1996). La velocidad de degradación de una sustancia antioxidante ha sido positivamente correlacionada con la actividad antioxidante (Chimi *et al.*, 1991).

Los fosfolípidos y las lipoproteínas (particularmente de baja densidad) han sido empleadas como sustratos de oxidación (Chu y Liu, 2004). En aceites esenciales se puede probar la habilidad para inhibir la oxidación de hexanal a ácido hexanoico de acuerdo a informes previamente publicados por Wei *et al.* (2001). Wei y Shibamoto (2007) evaluaron el malonaldehído formado en aceites esenciales como una prueba de actividad antioxidante. Frankel y Meyer (2000) publicaron una revisión sobre métodos analíticos para determinar la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos fenólicos puros y antioxidantes naturales.

Tabla I. Antioxidantes aislados de hierbas y especias^a

Especias	Nombre común	Sustancia
Romero	<i>Rosemarinus officinalis</i> (Labiatae)	Ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarinico, rosmanol
Salvia	<i>Salvia officinalis</i> (Labiatae)	Carnosol, ácido carnósico, rosmanol, ácido rosmarinico
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> (Labiatae)	Derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles
Tomillo	<i>Thymus vulgare</i> (Labiatae)	Timol, carvacrol, r-cumeno- 2,3 diol, bifenoles, flavonoides
Jenjibre	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	Compuestos gingerol, diaryheptanoides
Cúrcuma	<i>Curcuma domestica</i> (Zingiberaceae)	Curcuminas
Pimienta negra	<i>Piper nigrum</i> (Piperaceae)	Amidas fenólicas, flavonoides
Pimiento rojo	<i>Capsicum annuum</i> (Solanaceae)	Capsaicina
Pimiento picante	<i>Capsicum frutescence</i> (Solanaceae)	Capsaicina, capsaicinol
Clavo	<i>Eugenia caryophyllata</i> (Caryophyllaceae)	Eugenol, galatos
Mejorana	<i>Majorana hortensis</i> (Labiatae)	Flavonoides
Bálsamo común	<i>Melissa officinalis</i> (Labiatae)	Flavonoides
Regaliz	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Leguminosae)	Flavonoides, fenólicos regaliz

^a Adaptado de Yanishlieva *et al.* (2006)

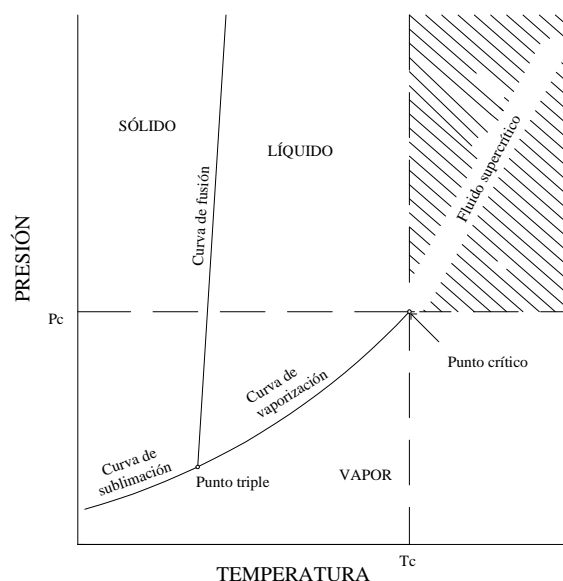


Fig. 1. Diagrama de fases de un material puro. Adaptado de Rizvi *et al.* (1994)

Descripción del proceso de extracción con fluidos supercríticos

Definición de fluido supercrítico. De acuerdo a Raventós *et al.* (2002) la extracción con fluidos supercríticos, extracción con gases supercríticos y la extracción con un gas denso, son términos alternativos para nombrar la operación con un fluido a temperaturas y presiones cerca del punto crítico. El proceso de extracción con fluidos supercríticos es un proceso de separación donde las sustancias son disueltas en un fluido, el cual es capaz de modificar su poder de disolución, bajo condiciones específicas superiores a su temperatura y presión críticas (región supercrítica). Las propiedades de un fluido supercrítico son usadas para extraer selectivamente un compuesto específico o para fraccionar mezclas debido a un cambio en la temperatura y presión, sin un cambio de fase. Los mismos autores definen un fluido supercrítico como un líquido o gas en condiciones atmosféricas el cual es

comprimido por arriba de su presión crítica (50,000-25,000kPa) y es calentado por arriba de su temperatura crítica (20-60°C). La propiedad más importante de estos fluidos es el poder de disolución en su región supercrítica. En el diagrama de fases para un compuesto puro (Figura 1) es posible distinguir los tres estados de la materia: sólido, líquido y vapor. Estos están separados por una curva de fusión o equilibrio sólido-líquido, una curva de sublimación o equilibrio sólido-vapor, y una curva de vaporización o equilibrio líquido-vapor. Este diagrama tiene dos importantes puntos: el punto triple y el punto crítico. El punto triple es el punto en el cual los tres estados coexisten. El punto crítico permanece al final de la curva de vaporización, donde la fase gas y la fase líquida se unen para formar una sola fase fluida homogénea, y más allá de este punto está la región de fluido supercrítico.

Dióxido de carbono, CO₂, el disolvente más utilizado. En la Tabla II se presentan los valores de parámetros críticos de algunas sustancias potencialmente útiles como

Tabla II. Parámetros críticos de diferentes sustancias potencialmente útiles como fluidos supercríticos^a

Sustancia	T _c (°C)	P _c (kPa)	ρ (kg /m ³)
Agua	374.2	21480	320
Amoniaco	132.5	10990	230
Dióxido de carbono	31.1	7200	470
Metano	0.8	4600	170
Etano	32.3	4760	200
Propano	96.7	4240	220
Butano	152.0	7060	230
Pentano	196.0	3290	230
Etileno	11.0	4760	200
Metanol	239.0	7890	270
Etanol	243.3	7200	280
Éter	193.6	6380	270
Acetona	235.0	4700	280

^a Adaptado de Reglero *et al.* (2005)

fluidos supercríticos, aunque generalmente el fluido supercrítico más utilizado es el CO₂ (Reglero *et al.*, 2005). Los productos de origen biológico, tales como conservadores naturales de alimentos o ingredientes funcionales, son algunas veces termolábiles y fácilmente oxidables; consecuentemente, ellos requieren procesos a bajas temperaturas y, si es posible, atmósferas libres de oxígeno. El CO₂ no es oxidante y tiene temperatura crítica de 31.1°C, lo cual lo hace conveniente para la extracción de esos productos (Reglero *et al.*, 2005). Otros fluidos con temperaturas críticas más bajas son tóxicos, explosivos y prohibidos ecológicamente, y es difícil su manipulación y obtención de forma pura. Por lo tanto el CO₂ es el fluido más atractivo para el procesamiento de materiales biológicos y alimenticios (Rizvi *et al.*, 1994).

Desde el punto de vista ambiental, el uso de CO₂ hace el proceso de extracción con un fluido supercrítico, una técnica ecológica. Las plantas comerciales recirculan el CO₂, por lo que su uso como un disolvente de extracción, no aumenta la cantidad ya presente en la atmósfera. Finalmente no es

explosivo ni caro. El CO₂ es muy bien aceptado y es considerado como seguro (GRAS, Generally Regarded as Safe) cuando es usado con buenas prácticas de manufactura (BPM).

Reglero *et al.* (2005) argumentan que los productos alimenticios sin residuos de disolventes pueden ser obtenidos con CO₂ supercrítico, donde a bajas presiones es un gas. Después de la extracción, no es necesario aplicar energía para vaporizar el extractante porque su autoeliminación es espontánea cuando la presión disminuye. Los mismos autores plantean que la principal desventaja de CO₂ supercrítico es su limitada capacidad para extraer compuestos polares.

Estos son componentes comunes de productos usados como conservadores de alimentos o ingredientes funcionales. Este problema tiene una razonable solución: el CO₂ alimentado con etanol a bajo porcentaje, ha sido aplicado para extraer una amplia variedad de compuestos moderadamente polares. Una ventaja es que el etanol también es GRAS. Tsuda *et al.* (1995), extrajeron

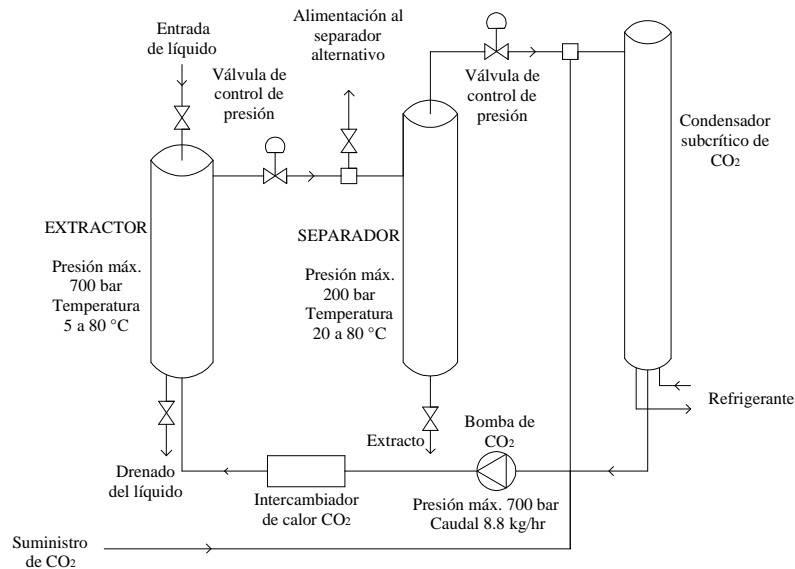


Fig. 2. Diagrama esquemático de una planta piloto de extracción supercrítica con CO₂. Adaptado de Steytler (1996)

componentes antioxidantes de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) usando etanol como modificador.

Componentes esenciales de un equipo de extracción. Los componentes esenciales de un equipo de extracción a nivel planta piloto son: el recipiente de extracción, el recipiente de separación, el condensador y una bomba (Figura 2). El CO₂ es almacenado a su presión de vapor en un condensador, y es bombeado hasta el recipiente de extracción por medio de una bomba de alta presión. El estado del CO₂ en la etapa de extracción y separación es determinado por la temperatura y la presión de los recipientes. La temperatura es controlada por un termostato y la presión es mantenida por una válvula de presión de alivio. Usualmente el extractor esta enchaquetado. Las condiciones de temperatura, presión y velocidad de flujo de CO₂ son continuamente monitoreadas y medidas en ciertos puntos estratégicos del sistema (Steytler, 1996).

Descripción del proceso. El proceso EFS consiste de dos pasos esenciales: la extracción y la separación (Raventós *et al.*, 2002). En el proceso de extracción, el material que va a ser extraído es colocado en el extractor, el cual es previamente purgado con CO₂ gaseoso para eliminar todo el aire del sistema. La extracción comienza cuando el CO₂ líquido es bombeado a un intercambiador de calor hacia el recipiente de extracción. La velocidad de flujo, la cual es determinada por la bomba, usualmente se establece de tal forma que permita suficiente tiempo de residencia del CO₂ y se alcance la solubilidad de equilibrio. Entonces la solución pasa al recipiente de separación, donde las condiciones son establecidas para minimizar la solubilidad de los compuestos extraídos. Esto algunas veces involucra la descompresión del CO₂ a un estado de baja densidad ($T > T_c$) o a un estado sobre o debajo de la línea de coexistencia líquido-gas ($T < T_c$). El CO₂ gaseoso entonces pasa al condensador, donde será condensado y almacenado como un líquido (Steytler, 1996). Debido a las altas presiones, los

recipientes están contruidos de paredes gruesas de metal, lo que dificulta el monitoreo del proceso. Si el extracto es un líquido, puede ser eliminado periódicamente del recipiente de separación por una válvula de drenado, pero si es un sólido, es necesario detener la extracción para eliminar los depósitos por medio de un lavado. El proceso de extracción es caro, sin embargo, ofrece muchas ventajas, siendo la principal (para la aplicación en alimentos), la falta de toxicidad del CO₂. En la actualidad los consumidores están considerando la seguridad en los alimentos un factor primordial; esta característica indudablemente promoverá su uso en la industria de alimentos (Steytler, 1996).

Condiciones de operación del proceso de extracción supercrítica

Presión y temperatura. Las condiciones empleadas para extraer compuestos antioxidantes fenólicos son más severas que las usadas en la extracción de aceites esenciales: usualmente los aceites son solubles a presiones menores de 10MPa y a temperaturas en el rango de 39.2-55.2°C, mientras que si aumenta la presión, aumenta la extracción de compuestos polares y de alto peso molecular (incluyendo polifenoles, los principales antioxidantes en los extractos de plantas). Cuando no hay compuestos de alto peso molecular, un aumento de presión no aumenta el rendimiento del extracto (Esquível *et al.*, 1999). Tsuda *et al.* (1995), extrajeron componentes antioxidantes de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) y encontraron que la actividad antioxidante de los extractos aumentó cuando la presión y temperatura aumentaron. El uso de bajas presiones (10MPa) permite un rendimiento similar al obtenido con CO₂ líquido, pero un aumento de presión de 25 a 35MPa duplica el rendimiento de los aceites esenciales (Smelcerovic *et al.*, 2004). Sin embargo el incremento en la presión o temperatura no

garantiza mejoras en la extracción de algunos casos (Scalia *et al.*, 1999). Altas temperaturas pueden proveer una actividad antioxidante más alta, que a temperaturas más bajas, incluso si el rendimiento del extracto pudiera disminuir. Uy *et al.* (1991) reportaron que los compuestos altamente sensibles a la temperatura requieren condiciones de extracción poco severas para evitar alteraciones (por ejemplo algunos compuestos fenólicos pueden ser polimerizados u oxidados a temperaturas más altas de 50°C, aunque otros fenólicos son más resistentes). La temperatura de extracción tiene un efecto diferente sobre la solubilidad de algunos antioxidantes, dependiendo de la presión de operación (Cavero *et al.*, 2005). La solubilidad y la transferencia de masa dependen de la presión y temperatura de CO₂ (Reglero *et al.*, 2005). No es posible generalizar el efecto de la temperatura en la obtención de antioxidantes, ya que depende primordialmente de la hierba o especia a estudiar (Díaz-Reinoso *et al.*, 2006).

Condiciones mecánicas. De acuerdo a Reglero *et al.* (2005), el método empleado en la preparación de la muestra (por ejemplo el secado y la molienda de la muestra, esto último afectando el tamaño de partícula), influye en el proceso de EFS, así como en la transferencia de masa. La molienda del material permite rendimientos más altos en comparación con el material que no es sometido a molienda. La mayoría de los datos reportados sobre EFS de antioxidantes obtenidos de materiales vegetales fueron obtenidos con partículas finamente molidas, escasas referencias del tamaño de partícula son reportadas.

Velocidad de flujo del disolvente. Reglero *et al.* (2005), reportaron que la velocidad de flujo del disolvente afecta la velocidad de extracción de los solutos fácilmente accesibles, y que es un parámetro relacionado

con la transferencia de masa. Durante las etapas iniciales del proceso, el aumento de la velocidad de flujo del disolvente favorece la extracción. Dependiendo de la situación, una alta velocidad de flujo del disolvente puede causar un efecto negativo (Louli *et al.*, 2004), despreciable o insignificante (Zekovic *et al.*, 2001), o un efecto positivo (Rozzi *et al.*, 2002).

Tiempo de extracción. Los datos reportados varían en un amplio rango, dependiendo del tipo de soluto que va a ser extraído y de las condiciones de operación. Un periodo estático puede ser mantenido (1 min hasta 2 h) antes de que se establezcan las condiciones dinámicas (15 min hasta 8 h), dependiendo principalmente de la cantidad de material vegetal a procesar (Dean y Liu, 2000). Tiempos prolongados de procesamiento reducen la dependencia del rendimiento de los extractos sobre otras variables (tal como la presión), como fue observado para la maravilla (Baumann *et al.*, 2004).

Antioxidantes obtenidos con la tecnología de extracción supercrítica

Díaz-Reinoso *et al.* (2006) han reportado más de 50 materiales de origen vegetal que han mostrado actividad antioxidante, utilizando la tecnología de extracción supercrítica, la cual es recomendable para la extracción y purificación de una gran variedad de compuestos, particularmente aquellos que tienen baja volatilidad y/o son susceptibles a degradación térmica. En la Tabla III se muestran algunos de los compuestos fenólicos que presentan actividad antioxidante y que fueron extraídos con la tecnología de EFS.

Aplicaciones de la EFS en la industria de alimentos

La primera extracción comercial con fluidos supercríticos fue desarrollada en Alemania en 1978 por Hag A.G. para la descafeinación de granos de café verdes. Dos años más tarde Carlton y United Breweries en Australia desarrollaron un proceso para la extracción de sabores usando dióxido de carbono líquido (Palmer y Ting, 1995). Ambas aplicaciones fueron comercialmente exitosas y han ido aumentando a numerosas variaciones y mejoras, las cuales han sido desarrolladas también a escala industrial (Kazlas *et al.*, 1994). Otras importantes aplicaciones de la EFS son la descafeinación de té, extracción de sabores de hierbas (Díaz *et al.*, 1997; Saldaña *et al.*, 1999), extracción de grasas y aceites (Froning *et al.*, 1998), extracción de colesterol de huevo y carne (Froning *et al.*, 1998), fraccionación de grasas y aceites (King, 2000) y dealcoholización de bebidas alcohólicas (Señoráns *et al.*, 2001). En menor escala encontramos la extracción de aromas en jugos (Ollanketo *et al.*, 2001), extracción de colorantes, refinación de grasas y aceites, y extracción de antioxidantes (Fadel *et al.*, 1999), deacidificación de aceite (King, 2000), inactivación de pectinesterasa de jugo de naranja (Palmer y Ting, 1995) y eliminación de grasa de los alimentos (Brunner, 2005). Las bebidas libres de alcohol son otro producto con un mercado en crecimiento (Raventós *et al.*, 2002).

Otra importante aplicación de la EFS en el procesamiento de alimentos es la aplicación combinada de fluidos supercríticos y la tecnología de extrusión. Esta combinación de tecnologías tiene el potencial para producir productos alimenticios inflados, tales como cereales listos para comer, pastas y alimentos confitados, lo cual mejora la textura, color y sabor (Rizvi *et al.*, 1995). Los consumidores en la actualidad están forzando a la industria

Tabla III. EFS de compuestos fenólicos con actividad antioxidante de hierbas y especias^a

Material vegetal	Condiciones del proceso de EFS con CO ₂ P/T/tiempo/vel. flujo ^b	Compuesto activo
Cáscara de la hoja de aloe vera (<i>Aloe barbadensis</i> Miller)	45/32/-/36	Flavonoides
Boldo (<i>Peumus boldus</i> M.)	40/340/2.5/1.5 kg/h	Boldino
Hierba dulce (<i>Lippia alba</i>)	40/60/2/-	Hidrocarburos monoterpenos, monoterpenones, monoterpenos oxigenados
Cáscara de nuez de la india (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	25/40/5/-	Ácido anacárdico, cardolos, cardanolos
Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)	20/30/0.5/60	Apigenina, apigenina-7-glucosido
Manzanilla (<i>Chamomilla recutita</i>)	10/30/10/2.4 kg/h	α-bisababol, chamazuleno
Semillas de cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	17.7/48/0.25/0.8 kg/h	-
Hojas de eucalipto (<i>Eucalyptus camaldulensis</i> var. <i>Brevirostris</i>)	40/70/2/0.12	Eugenol, timol
Aceite de hojas de eucalipto (E. <i>camaldulensis</i> var. <i>Brevirostris</i>)	20/50/2/0.12	Timol, monoterpenos hidrocarburos, sesquiterpenos, p-cimen-7-ol, O-hidroxicumino
Semillas de hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>)	8/40/4/0.2 kg/h	Monoterpenos hidrocarburos, 1,2- ácido bencenodicarboxílico
Jenjibre (<i>Zingiber officinale</i>)	10/40/5-5.25/0.09 kg/h	Monoterpeno, sesquiterpenos, hidrocarburos
Raíz de ginseng (<i>Panax ginseng</i>)	31/35/4/-	Ginsenosidos
Hojas de guaco (<i>Mikania glomerata</i>)	10.1/70/0.5/-	Coumarino
Espino (<i>Crataegus</i> sp.)	50/50/-/0.036	Galato epigallocatequino, vitexino-2''-O-ramnosido, galato galocatequino
Hojas secas de flor de papel (<i>Helichrysum italicum</i>)	26/50/3/ 50 kg/h	Flavonoides
Escaramujo (<i>Rosa majalis</i> L.)	30/45/1/-	-
Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>)	12-28/40-60/4/1.2 kg/h	Flavonoides
Raíces de Hu Zhang (<i>Polygonum cuspidatum</i>)	30/50/2/20 kg/h	Resveratrol, piceido (glicosido reveratrol)
Magnolia (<i>Magnolia officinalis</i>)	24.5/40/1/0.12	Magnolol
Maravilla (<i>Calendula officinalis</i>)	30/50/3/0.036	Faradiol-3-O-miristato
Mejorana (<i>Origanum vulgare</i>)	30-35/35-40/0.5-1/45 kg/h	-
Nuez moscada (<i>Nigella sativa</i> L.)	20/40/2.8/0.12	Ácido ursólico, carnosol
Hojas de pasiflora (<i>Passiflora edulis</i>)	10.1/70/0.08/-	Vitexino, orientino, rutino
Oleoresina de pimienta negra (<i>Piper nigrum</i> L.)	28/45/-/-	Piperina
Cáscara de pistache (<i>Pistachia vera</i>)	35.5/55/0.42/-	
Romero (<i>R. officinalis</i>)	20/30/-/0.252 kg/h	Carvacrol, carnosol, rosmanol, ácido carnósico
Salvia (<i>S. officinalis</i> L.)	25/100/-/3 kg/h	Carnosol, ácido carnósico, rosmadial, rosmanol, epirosmanol y metil carnosato
Semilla negra de sésamo (<i>Sesamum indicum</i> L.)	20/55/3/25	Sesamol, sesamilino, sesaminolo y sesamolol
Harina de soya (<i>Glycine max</i>)	36/40/0.5/0.03	Genistino, genisteino, daidzeino

de alimentos a usar ingredientes naturales, incluso aunque sean menos estables y más caros que los sintéticos alternativos. Las

características sensoriales de productos naturales son muy complicadas de imitar con una combinación de productos artificiales.

Tabla III. EFS de compuestos fenólicos con actividad antioxidante de hierbas y especias^a (continuación)

Material vegetal	Condiciones del proceso de EFS con CO ₂ P/T/tiempo/vel. flujo ^b	Compuesto activo
Hierbas de olor (<i>Satureja hortensis</i> L.)	12/40/2.5/53.5	Carvacrol, linalol, mirceno, mirtenol
Té verde (<i>Camelia sinensis</i>)	31/60/-/-	Galato epigallocatequino, galato galocatequino, epicatequino, ácido gálico
Tomillo (<i>T. vulgaris</i>)	30-35/35-40/0.5-1/ 45 kg/h	Timol, carvacrol, sesquiterpenos, monoterpenos, alcoholes terpenilos
Aceite de cúrcuma (<i>Curcuma longa</i> L.)	30/40/3/0.6	Z-γ-atlantono, E-γ-atlantono

^a Adaptado de Díaz-Reinoso *et al.* (2006)^b P= presión(MPa), T= temperatura (°C), tiempo (h), vel. flujo= velocidad de flujo (L/h)

Lo que es más, el costo de la extracción con CO₂ será balanceada por los altos precios de los extractos, ya que estos son de mayor calidad. La industria de los sabores y fragancias es un campo de aplicación de la EFS, la cual ha sido desarrollada considerablemente y la cual tiene plantas de extracción en varios países. Los antioxidantes naturales producidos por la EFS son también de interés para la industria alimenticia debido a que ellos no alteran el aroma, sabor y color de los alimentos, estos son fácilmente dispersos, altamente solubles, y no se evaporan durante el freído u horneado, como sucede con los antioxidantes sintéticos (Raventós *et al.*, 2002).

Conclusiones

Debido a la demanda de los consumidores, la tecnología de EFS (usando CO₂ como disolvente, debido a que no es flamable, no es tóxico, no contamina, y es fácil de recuperar), aplicada en la obtención de antioxidantes a partir de hierbas y especias, es una buena alternativa, realizando la adecuada selección de las condiciones de operación, tales como: presión, temperatura, velocidad de flujo del disolvente, tiempo de extracción, así como el tratamiento previo de la materia prima. Las principales ventajas de la tecnología de EFS son: alta calidad y pureza de los compuestos obtenidos, extracción rápida, extractos libres de residuos

de disolventes, extracción de compuestos específicos. Sin embargo, la principal desventaja es el alto costo inicial asociado con las altas presiones del equipo.

Referencias

- Anese, M. y Nicoli, M. C. 2003. Antioxidant properties of ready to drink coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(4):942-946.
- Baumann, D., Adler, S., Grüner, S., Otto, F., Weinreich, B. y Hamburger, M. 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of marigold at high pressures: Comparison of analytical and pilot scale extraction. *Phytochemical Analysis*. 15(4):226-230.
- Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. 1996. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70-76.
- Brunner, G. 2005. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. 67(1):21-33.
- Cavero, S., Jaime, L., Martín-Álvarez, P. J., Señoráns, F. J., Reglero, G. e Ibáñez, E. 2005. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *European Food Research and Technology*. 221(3):478-486.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P. y Rahmani, M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 68(5):307-311.

- Chipault, J. R., Mizuno, G. R. y Lundberg, W. O. 1956. The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technology*. 10:209-211.
- Chu, Y. F. y Liu, R. H. 2004. Novel low-density lipoprotein (LDL) oxidation model: Antioxidant capacity for the inhibition of LDL oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(22):6818-6823.
- Collins, A. R. y Harrington, V. 2003. Antioxidants; not the only reason to eat fruit and vegetables. *Phytochemistry Reviews*. 1(2):167-174.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. y Linssen J. P. H. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77(1):140-146.
- Dean, J. R. y Liu, B. 2000. Supercritical fluid extraction of Chinese herbal medicines: investigation of extraction kinetics. *Phytochemical Analysis*. 11(1):1-6.
- Decker, E., Beecher, G., Slavin, J., Miller, H. E. y Marquart, L. 2002. Whole grains as a source of antioxidants. *Cereal Foods World*. 47(8):370-373.
- Díaz, O., Cobos, A., De la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. 1997. El dióxido de carbono supercrítico en la elaboración de alimentos de origen animal. *Alimentación, equipos y tecnología*. 16(7): 55-60.
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H. y Parajo, J.C. 2006. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (7):2441-2469.
- Esquivel, M. M., Ribeiro, M. A. y Bernardo-Gil, M. G. 1999. Supercritical extraction of savory oil: Study of antioxidant activity and extract characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*. 14(2):129-138.
- Fadel, C., Richard, H. y Berset, C. 1999. Antioxidative activity and phenolic compositions of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73(5):645-652.
- Faraji, H. y Lindsay, R. C. 2004. Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(23):7164-7171.
- Frankel, E. N. y Meyer, A. S. 2000. The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(13):1925-1941.
- Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L. y Niemann, L. 1998. Moisture content and particle size of dehydrated egg yolk affect lipid and cholesterol extraction using supercritical carbon dioxide. *Poultry Science*. 77(11):1718-1722.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. y Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical review and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*. 29(11):1106-1114.
- Gordon, M.H. 2001. Measuring antioxidant activity. En J. Pokorný, N. Yanishlieva y M. Gordon (Eds). *Antioxidants in food*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU. pp. 71-84.
- Hu, Q., Xu, J., Chen, S. y Yang, F. 2004. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(4):943- 947.
- Jeong, W. S. y Kong, A. N. 2004. Biological properties of monomeric and polymeric catechins: Green tea catechins and procyanidins. *Pharmaceutical Biology*. 42(1):84-93.
- Kalt, W., Forney, C., Martin, A. y Prior, R.L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(11):4638-4644.
- Kazlas, P.T., Novak, R.D. y Robey, R.J. 1994. Supercritical carbon dioxide decaffeination of acidified coffee. EE.UU. Patent 5 288511.
- King, J.W. 2000. Advances in critical fluid technology for food processing. *Food Science Technology*. 14 (4):186-191.
- Kitts, D. D. y Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources; Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16):1309-1323.
- Leal, P. L., Braga, M. E. M., Sato, D. N., Carvalho, J. E., Marques, M. O. M. y Meireles, M. A. A. 2003. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (9): 2520-2525.

- Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. y Ang, P. O. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(13):3862-3866.
- Lin, M. Y. y Yen, C. L. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(4):1460-1466.
- Louli, V., Ragoussis, N. y Magoulas, K. 2004. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry byproducts. *Bioresource Technology*. 92(2):201-208.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Sanjust, E., Meli, M., Sollai, F., Zucca, P. y Rescigno, A. 2007. Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(24):10022-10027.
- Mansouri, A., Makris, D. P. y Kefalas, P. 2005. Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: Structure-activity relationships. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39(1):22-26.
- Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Andoh, T., Shiohara, A. y Nakata, M. 1999. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(4):1749-1754.
- Mau, J. L., Lin, H. C. y Chen, C. C. 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(21):6072-6077.
- Mau, J. L., Ko, P. T. y Chyau, C. C. 2003. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Research International*. 36(1):97-104.
- Modey, W.K., Mulholland, D.A. y Raynor, M.W. 1996. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochemical Analysis*. 7(1):1-15.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J. y Pajaró, J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72(2):145-171.
- Ollanketo, M., Hartonen, K., Riekkola, M.L., Holm, Y. y Hiltunen, R. 2001. Supercritical carbon dioxide extraction of lycopene in tomato skins. *European Food Research and Technology*. 212(5):561-565.
- Palmer, M. V. y Ting, S. S. T. 1995. Applications for supercritical fluid technology in food processing. *Food Chemistry*. 52(4):345-352.
- Pokorný, J. 2000. Natural antioxidants. En P. Zeuthen y L. Bogh-Sorensen (Eds). *Food Preservation Techniques*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU. pp. 31-50.
- Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10):4290-4302.
- Quites, J.L., Ramírez-Tortosa, M.C., Gómez, J.A., Huertas, J.R. y Mataix, J. 2002. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry*. 76(4):461-468.
- Raventós, M., Duarte, S. y Alarcón, R. 2002. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: An overview. *Food Science and Technology International*. 8(5):269-284.
- Reglero, G., Señoráns, J.F. e Ibañez, E. 2005. Supercritical fluid extraction: an alternative to isolating natural food preservatives. En G.V. Barbosa-Cánovas, M.S. Tapia y M.P. Cano (Eds). *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press. Boca Raton. Fla. EE.UU. pp 539-550.
- Rizvi, S.S.H., Yu, Z.R., Bhaskar, A.R. y Chidambaram, C.B. 1994. Fundamentals of processing with supercritical fluids. En S.S.H. Rizvi (Eds). *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*. Blackie Academic and Professional. Londres. Reino Unido. pp. 1-10.
- Rizvi, S.S.H., Mulvaney, S.J. y Sokhey, A.S. 1995. The combined application of supercritical fluid and extrusion technology. *Trends in Food Science and Technology*. 6(7):232-240.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swarsitang, P. y Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66(4):401-436.

- Rozzi, N. L., Phippen, W., Simon, J. E. y Singh, R. K. 2002. Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemonscented botanicals. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie*. 35(4):319-324.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M.M. y Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 91(4):621-632.
- Saldaña, M.D.A., Mohamed, R.S., Baer M.G.G. y Mazzafera, P. 1999. Extraction of purine alkaloids from ate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(9):3804–3808.
- Scalia, S., Giuffreda, L. y Pallado, P. 1999. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 21(3):549-558.
- Señoráns, F.J., Ruiz-Rodríguez, A., Ibáñez, E., Tabera, J. y Reglero, G. 2001. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of alcoholic beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(4):1895–1899.
- Shahidi, F. y Nazk, M. 1995. Food fenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing. Co. Inc. Pensilvania. EE.UU. 105 p.
- Smelcerovic, A., Lepojevic, Z. y Djordjevic, S. 2004. Sub-and supercritical CO₂ extraction of *Hypericum perforatum* L. *Chemical Engineering and Technology*. 27(12):1327-1329.
- Sovová, H., Jez, J., Bártlová, M. y Stastová, J. 1995. Supercritical carbon dioxide extraction of black pepper. *The Journal of Supercritical Fluids*. 8(2):295-301.
- Srinivasan, K. 2005. Spices as influencers of body metabolism: An overview of three decades of research. *Food Research International*. 38(1):77-86
- Steytler, D. 1996. Supercritical fluid extraction and its application in the food industry. En A.S. Grandison y M.J. Lewis (Eds). *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries*. Technomic Publishing Company, Inc. Pensilvania. EE.UU. pp 17-31.
- Tsuda, T., Mizuno, K., Ohshima, K., Kawakishi, S. y Osawa, T. 1995. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidative components from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(11):2803-2806.
- Uccella, N. 2001. Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends in Food Science & Technology*. 11(9): 328-339.
- Uy, N., Frankman, G. y Evans, D. A. 1991. Labiatae derived antioxidant composition. European Patent EP0454097.
- Vági, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Peredi, K. V., Balazs, A., Blazovics, A. y Simándi, B. 2005. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(1):17-21.
- Van Acker, S. A., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van der Vijgh, W. J. y Bast, A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(3):331-342.
- Verma, A., Hartonen, K. y Riekkola, M. L. 2008. Optimization of supercritical fluid extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* using experimental design methodology. Comparison with other extraction techniques. *Phytochemical Analysis*. 19(1): 52–63.
- Wei, A., Mura K. y Shibamoto, T. 2001. Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(7):4097- 4101.
- Wei, A. y Shibamoto, T. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(5):1737-1742.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. y Pokorny, J. 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108(9):776–793.
- Yilmaz, Y. y Toledo, R. 2005. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry*. 93(2):273-278.
- Zaporozhets, O. A., Krushynska, O. A., Lipkovska, N. A. y Barvinchenko, V. N. 2004. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(1):21-25.

Zekovic, Z., Lepojevic, Z. y Tolic, A. 2001. Modeling of the thyme supercritical carbon dioxide extraction system. The influence of carbon dioxide flow rate and grinding degree of thyme. *Separation Science and Technology*. 36(15):3459-3472.



Viabilidad de un microorganismo probiótico en un producto cárnico fermentado tipo salami

R. I. Soto-del Castillo^{*}, A. López-Malo, F. San Martín y E. Palou-García

Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México

Resumen

En la actualidad los productos probióticos han tomado gran auge debido a los beneficios en la salud que esta clase de productos ofrecen al consumidor. La industria de los alimentos se ha enfocado en desarrollar productos lácteos, sin embargo, existen gran cantidad de productos no lácteos que pueden ser posibles vehículos para los microorganismos probióticos. En este trabajo se evaluó la viabilidad de un microorganismo probiótico, *Lactobacillus acidophilus* en un producto cárnico fermentado tipo salami. Se elaboró un salami empleando como cultivo iniciador *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* o una mezcla de ambos. El número de bacterias probióticas inoculadas incrementó 2 ciclos logarítmicos mientras que la mezcla de microorganismos incrementa 6 ciclos, el embutido control preparado con *L. plantarum* aumentó 3 ciclos logarítmicos. Los resultados obtenidos muestran que el *L. acidophilus* se puede emplear como cultivo iniciador en un producto cárnico fermentado con las ventajas de un producto probiótico. El *L. acidophilus* es viable en la producción de un producto cárnico fermentado tipo salami.

Palabras clave: *Lactobacillus acidophilus*, probiótico, cárnico fermentado, tipo salami.

Abstract

Now days the probiotics products have been taken a lot of peak because of the benefits that they offer to consumer's health. The food industry has been making dairy products, but there are a lot of non dairy products that could be possible vehicles for the probiotic microorganisms. This work evaluated the viability of a probiotic microorganism, the *Lactobacillus acidophilus* in a fermented sausage, like salami. A salami were made using as starter *L. plantarum*, *L. acidophilus* or both. The number of inoculated probiotic bacteria increase in 2 logarithmic cycles and the mixture increase 6 logarithmic cycles, the control made from *L. plantarum* increase 3 logarithmic cycles. The results show that the *L. acidophilus* could be used as a starter in a fermented sausage with the benefits of a probiotic product. The *L. acidophilus* is viable in a fermented meat product, like salami.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, probiotics, fermented sausage, salami.

^{*} Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: rosario.sotodo@udlap.com

Introducción

A principios del tercer milenio, las enfermedades como alergias, rinitis alérgica, asma, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, diabetes y artritis representan enfermedades crónicas de gran importancia en este mundo industrializado. Las causas de estas enfermedades pueden ser diversas y en muchos casos se encuentran relacionadas con alteraciones en la función de la barrera intestinal (Isolauri, 2001).

La mucosa intestinal, la cual hace función de barrera intestinal, tiene como objetivo proporcionar al huésped defensas contra los antígenos presentes en los alimentos y los generados por los microorganismos del intestino. En esta defensa están involucrados diversos factores como son: la saliva, los ácidos gástricos, peristalsis, mucosa, proteólisis intestinal, flora intestinal, y células epiteliales (Isolauri *et al.*, 2001).

La flora intestinal es el ecosistema de microorganismos del intestino que incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastro intestinal, las cuales se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, y una serie de microorganismos vivos variables que transitan por el tubo digestivo, éstas se adquieren continuamente a través de alimentos y bebidas. Los géneros predominantes son *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* (Guarner, 2007).

El reconocimiento de la composición (número y tipo de especies microbianas) de la flora intestinal y el estudio de su función generó el conocimiento necesario para aislar aquellos microorganismos benéficos que son llamados probióticos cuando se ingieren como alimentos o suplementos alimenticios.

Havenaar y Huis In't Veld (1992) definieron como probiótico a “una preparación de, o un producto que, contiene una gran cantidad de microorganismos específicos los cuales alteran la microflora (por implantación y colonización) en el huésped y por ello ejerce un efecto benéfico en ellos” (Rolfe, 2000). La mayoría de las bacterias probióticas se encuentran dentro del grupo de microorganismos conocidos como *bacterias productoras de ácido láctico* (BAL) (Rowland, 2002).

Roberfroid (2000) menciona que las bacterias que más se usan como probióticos son los *Lactobacillus* y las Bifidobacterias, ya que cumplen con los requisitos que Shortt (1999) propone para que un producto sea denominado probiótico:

- Los microorganismos deben ser de la flora intestinal humana.
- Deben ser no patógenos.
- Tolerantes a los ácidos gastrointestinales y sales biliares.
- Existir evidencia de que proporciona algún beneficio a la salud.

Los efectos benéficos de los probióticos se pueden dividir en 7 áreas importantes (Rowland, 2002):

1. Atenuación de la intolerancia a la lactosa.
2. Efectos preventivos y terapéuticos contra la diarrea.
3. Alivio del estreñimiento y disminución en el tiempo de tránsito.
4. Efectos sobre el sistema inmunológico.
5. Reducción del colesterol plasmático.
6. Enfermedad intestinal inflamatoria.
7. Prevención del cáncer.

En la actualidad los alimentos probióticos se limitan a productos lácteos fermentados, como el yogurt y las leches fermentadas

(Roberfroid, 2000), también se han encontrado en otros tipos de alimentos fermentados como queso cottage y leches acidificadas, así como en cápsulas de microorganismos liofilizados.

El salami es el principal producto cárnico fermentado, de consistencia dura y muy sazonado. Se prepara a partir de carne selecta, triturada, la cual se mezcla con agentes curantes y especias, después se lleva a bajas temperaturas y se embute, se seca ya sea con aire o con humo a altas temperaturas y condiciones de humedad controladas. Es en este período cuando se lleva a cabo la fermentación y la producción de ácido láctico, lo que le proporciona el sabor y color característico (Pederson, 1979). Tradicionalmente se utilizan como cultivos iniciadores cepas de *Lactobacillus* no probióticas, sin embargo, algunas cepas de BAL-probióticas pueden utilizarse durante la fermentación de productos cárnicos como el salami ya que producen ácido y cumplen con las características para considerarse probióticos.

El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de los microorganismos probióticos durante la fermentación y maduración del producto tipo salami, así como evaluar los cambios microbiológicos y fisicoquímicos que ocurren durante la fermentación, y la aceptabilidad sensorial del producto final.

Materiales y métodos

Elaboración del carnico tipo salami fermentado

Para su elaboración se usaron los ingredientes en los porcentajes presentados en la tabla I.

Tabla I. Formulación de Salami

Ingrediente	Porcentaje
Carne magra de cerdo	68.67%
Grasa	29.43%
Sal común	1.00%
Sal de cura	0.30%
Azúcar	0.50%
Ascorbato de Sodio	0.05%
Pimienta Negra	0.01%
Ajo	0.20%
Cultivo iniciador	10 ⁵ UFC/g

Para la elaboración del carnico tipo salami se siguió el diagrama de flujo como se muestra en la Fig. 1.

La carne y la grasa se congelaron previamente y se picaron en un cutter, los agentes de cura como son la sal, los nitritos, el azúcar y los condimentos se añadieron una vez que se hizo la mezcla carne/grasa. El producto se embutió en una tripa artificial de 1cm de diámetro. La fermentación se llevó a cabo en una incubadora Imperial III (Lab Line Instruments, E.U.A.) durante 10 horas a 32°C, posteriormente el carnico se almacenó en una cámara de refrigeración a 7°C y 40 % de HR durante 10 días, posteriormente se rebanó y se empacó al vacío.

Análisis bromatológico

• Porcentaje de grasa

Se determinó el porcentaje de grasa que contenía el producto tipo salami por el método 920.39 de la AOAC (1996), método Soxhlet.

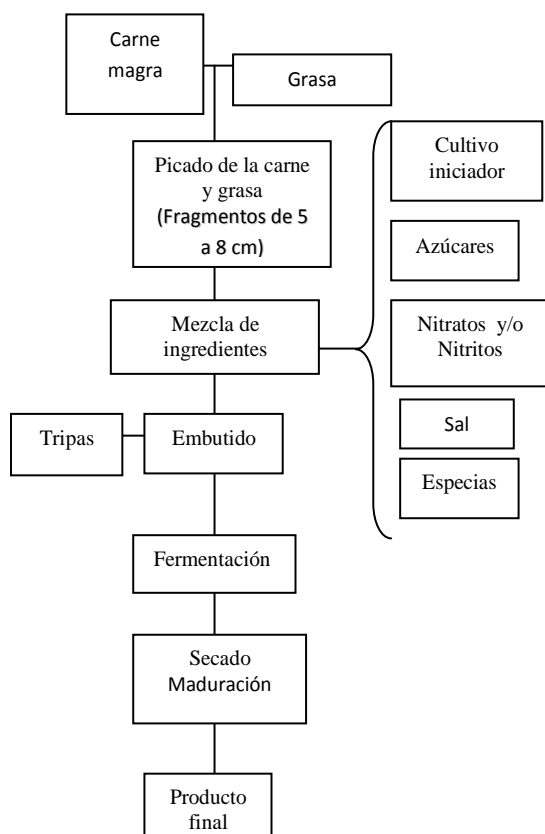


Fig. 1. Diagrama de flujo de la elaboración de un producto cárnico fermentado tipo salami

- Contenido de humedad

Se usó el método modificado de la AOAC (1996) 930.15, basado en la diferencia de pesos por evaporación de agua en una estufa de vacío a 100°C.

- Porcentaje de proteína

Mediante método Micro-Kjeldahl, multiplicando por el factor 6.25 el porcentaje de nitrógeno, basado en el método 988.05 de la AOAC (1996).

Microorganismos

Como cultivo iniciador se usó *L. plantarum* (BioCarna® Protect ALC) liofilizado proporcionado por Danisco Cultor, se

hidrató 1 mg en 9mL de agua estéril por 30min en baño María a 30°C y posteriormente fue mezclado con la carne.

Como microorganismo probiótico se usó *Lactobacillus acidophilus* el cual se obtuvo de las cápsulas Lactocil® de los laboratorios Pharmacaps, el cual se sembró en agar MRS (Merck, Alemania) para aislarlo, una vez aislado se inoculó en caldo MRS (Merck, Alemania), por 24-48h a 35°C, una vez transcurrido el periodo de incubación, se centrifugaron 24mL de caldo, el sedimento se diluyó en 9mL de agua estéril y posteriormente fue mezclado con la carne.

Se elaboraron 3 muestras diferentes, la muestra control se inoculó con *L. plantarum*, la segunda muestra se elaboró con *L. acidophilus*, y la tercera muestra se elaboró con una mezcla de ambos microorganismos.

Análisis microbiológico

Se llevó a cabo el recuento del cultivo iniciador y de la bacteria probiótica (por duplicado) inmediatamente después de la elaboración, y a diferentes intervalos durante la fermentación y el secado. Para preparar la muestra se pesó 1g de salami y se suspendió en 99 mL de agua peptonada. Se hicieron 3 diluciones en agua de peptona esterilizada y se sembró en profundidad, usando agar MRS (Merck, Alemania).

El *Lactobacillus acidophilus* así como el cultivo iniciador se incubaron en agar MRS (Merck, Alemania) a 37°C por 3 días anaerobiamente y se realizó el recuento con la ayuda de una plantilla de conteo.

Determinación de pH

Se midió el pH con un potenciómetro inmediatamente después de la elaboración, durante la fermentación y el secado, con el

método 32.016 de la AOAC (1996), por inmersión de electrodo.

Determinación de ácido láctico

Se determinó la acidez del producto por titulación con NaOH al 0.1N y se expresó como porcentaje de ácido láctico.

Evaluación sensorial

La calidad sensorial del carnico tipo salami elaborado se realizó mediante pruebas sensoriales afectivas con escala hedónica de nueve puntos, siendo el 1 me disgusta demasiado y el 9 me gusta demasiado, realizadas por un panel de 24 jueces no entrenados quienes evaluaron parámetros como sabor, olor, color, textura y aceptabilidad general, de la muestra control y de las dos muestras a evaluar, decidiendo así sobre el carnico de su preferencia.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron por medio de un ANOVA de una vía, con la ayuda del programa MiniTab (14.1.0.0, Minitab, Inc.)

Resultados y discusión

Caracterización del producto cárnico fermentado

Los porcentajes de humedad obtenidos para los embutidos tipo salami elaborados a partir de *L. plantarum*, *L. acidophilus* y mezcla de microorganismos tienen valores de alrededor de 27%, esto es una diferencia menor al 7%, comparado con lo reportado por Pederson (1979) los valores son cercanos, los salami comerciales presenta más del 43.6% de humedad.

El porcentaje de grasa de los salamis comerciales y los elaborados en el laboratorio tienen valores de alrededor del 24%. El porcentaje de proteína obtenido para los embutidos elaborados en el laboratorio fue muy alto (45%) a comparación de los comerciales (26%). Estas diferencias pueden ser atribuibles a diferencias en la formulación, así como a el método de fermentación y secado empleados.

Cambio de pH

Varnam y Sutherland (1995) reportan que la maduración de un salami termina cuando el producto ha alcanzado un pH de 5.1-5.2, este pH se logró después de 11 días de secado como se puede observar en la Figura 2.

El producto tipo salami inoculado con la mezcla de cultivos alcanzó un pH relativamente menor que los embutidos elaborados con un sólo cultivo, ya que éstos llegan al mismo nivel de pH al cabo de 11 días.

En la Fig. 2 se muestra como fue disminuyendo el pH conforme al tiempo. Se puede observar que en el embutido inoculado con *L. acidophilus* el pH disminuye en mayor proporción que cuando se inocula con *L. plantarum* o con la mezcla, sin embargo no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores de los tres embutidos, alcanzando los valores de pH propuestos para su maduración.

El embutido elaborado con *L. plantarum* y el inoculado con la mezcla de microorganismos siguen la misma tendencia mientras que el embutido preparado con *L. acidophilus* sigue una tendencia lineal. Esto nos lleva a inferir que el microorganismo predominante en la fermentación del producto tipo salami inoculado con la mezcla es el *L. plantarum*, sin embargo se requieren más estudios para poder confirmar esto.

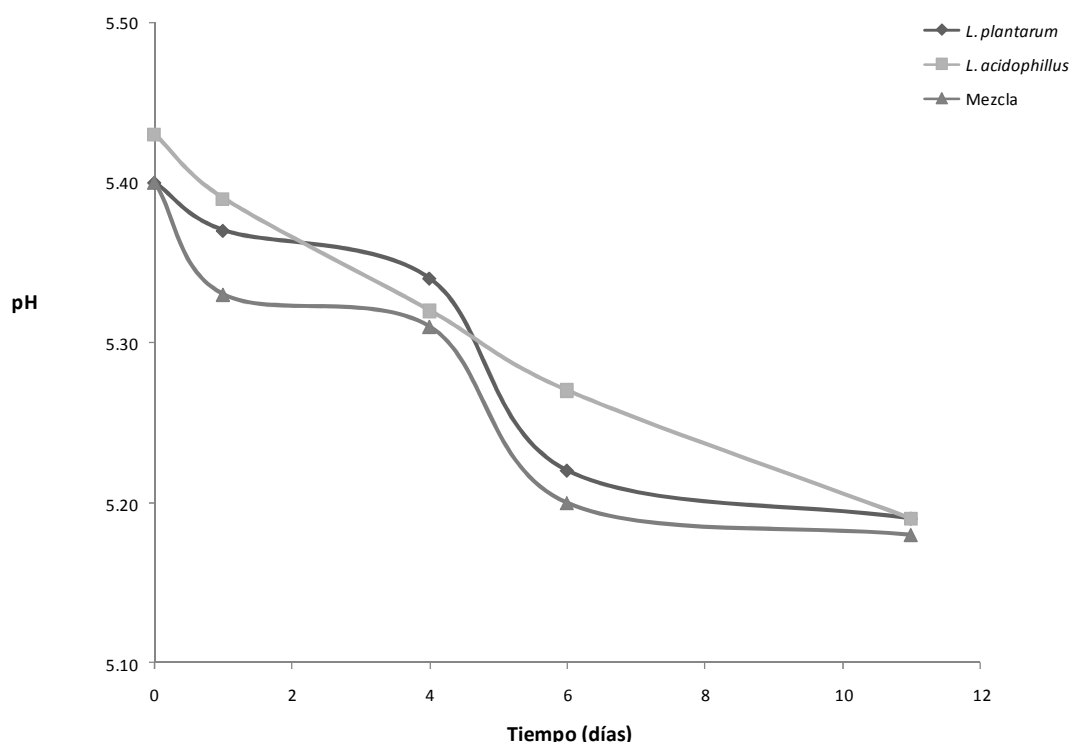


Fig. 2. Cambio de pH en el embutido tipo salami inoculado con diferentes cultivos iniciadores

Los valores obtenidos en esta investigación (5.1-5.2) están muy en línea con los reportados por Työppönen *et al.* en 2003 ya que ellos obtiene valores de pH de 5.0 en productos cárnicos fermentados a partir de BAL en los primeros días de fermentación, y Erkkilä *et al.* (2001) reporta valores de 5.1 para un producto cárnico fermentado a partir de *L. rhamnosus*, en los primeros 7 días de maduración.

Cambio de acidez

Las bacterias empleadas como cultivo iniciador y probiótico son productoras de ácido láctico. En la Figura 3 se puede observar que el aumento de ácido láctico es casi del 100% en los 3 casos. Sin embargo, el embutido que presentó mayor producción de

ácido láctico fue el preparado con la mezcla de cultivos.

Por otro lado el embutido elaborado con *L. acidophilus* es el que menor producción de ácido láctico presentó. No se presentó ninguna tendencia en la producción de ácido. Ya que ambos microorganismos son productores de ácido láctico, no se puede inferir sobre el predominio de un microorganismo en específico.

Viabilidad de microorganismos probióticos

El análisis se llevó a cabo inmediatamente después de la elaboración del embutido tipo salami, durante la fermentación y el secado, hasta cumplir con los 11 días. En la Fig. 4 se puede observar la viabilidad de los microorganismos *L. plantarum* (cultivo

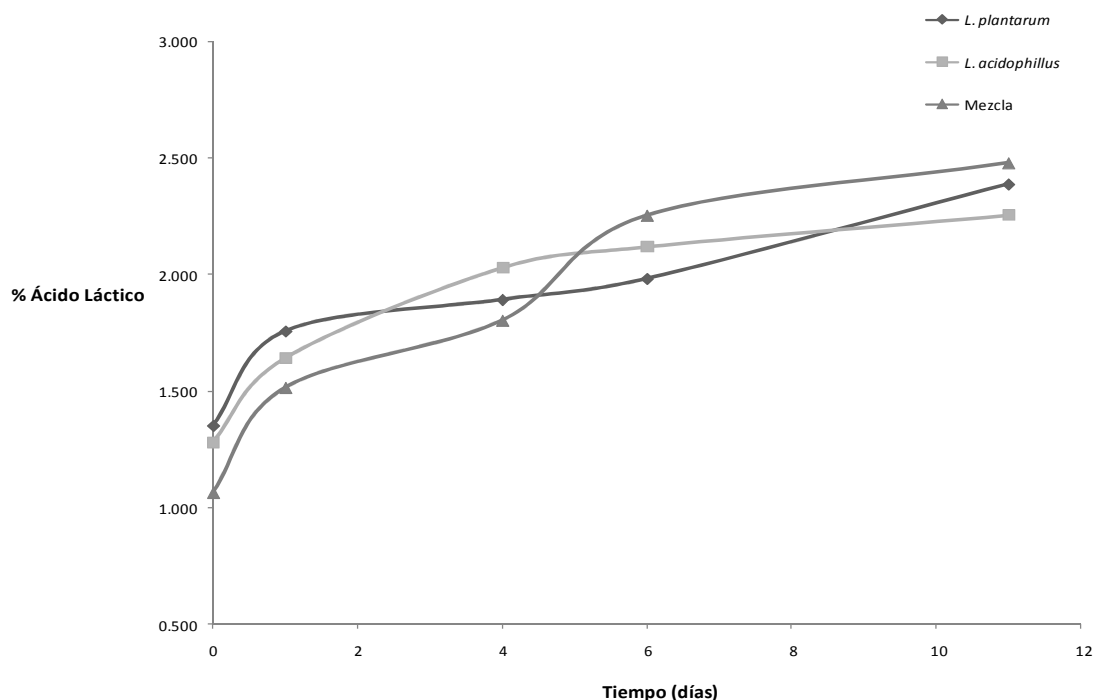


Fig. 3. Aumento de acidez en el embutido tipo salami inoculado con diferentes microorganismos probióticos

iniciador), *L. acidophilus* (probiótico) y la mezcla inoculados en el producto cárnico fermentado tipo salami.

En la gráfica se observa que los *Lactobacillus* crecieron en todos los casos. Para que un alimento sea considerado

como probiótico debe tener al menos 10^6 UFC/g (Shah, 2001) y el producto obtenido tuvo al menos 10^7 UFC/g, por lo que se puede decir que es viable el crecimiento del *L. acidophilus* en el salami, así mismo se pudo observar que la mezcla de microorganismos resultó en un mayor

crecimiento, a pesar que no se logró determinar si los microorganismos presentes en el salami inoculado con la mezcla fueron *L. plantarum* o *L. acidophilus* o ambos.

Por otro lado se puede observar que el embutido inoculado con la mezcla de microorganismos presenta una tendencia exponencial, mientras que los inoculados con un solo microorganismo a partir de los 6 días empiezan a presentar una tendencia estacionaria, ya que en 6 días no aumentaron más de un ciclo logarítmico.

Erkkilä *et al.* (2001) reportan que el número de bacterias aumentó un ciclo logarítmico en el producto cárnico fermentado a partir de *L. rhamnosus* LC-705 y GG mientras que el control inoculado con *Pediococcus* no alcanza a incrementarse ni un ciclo logarítmico.

Arihara *et al.* (1996) reportaron que la cepa de *Lactobacillus gasseri* JCM1131, como microorganismo probiótico, se puede ocupar para mejorar la seguridad del

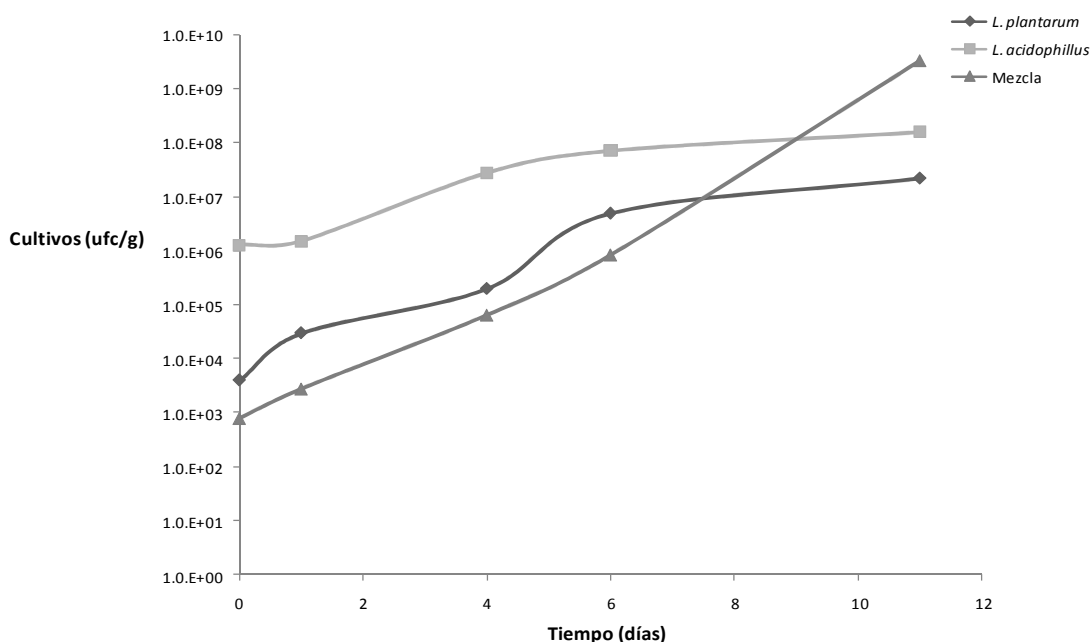


Fig. 4. Crecimiento de microorganismos durante la fermentación y secado del embutido tipo salami

producto. Sameshima *et al.* (1998) demostraron el uso de microorganismos probióticos como *L. rhamnosus* FERM P-15120 y *L. paracasei* FERM P-15121 en carnes fermentadas. Anderson (1998) fermentó un producto cárnico a partir de una mezcla de Bactoferm, como cultivo iniciador, y *L. casei* LC -01 como microorganismo probiótico.

Análisis sensorial

Los resultados del ANOVA indican que no existe diferencia significativa en ninguno de los parámetros evaluados ($p > 0.05$). Por lo que podemos decir que no existe una preferencia por algún embutido tipo salami, los 3 muestran el mismo grado de aceptabilidad.

No afecta el tipo de cultivo iniciador utilizado en la elaboración del cárnico tipo salami sobre las características sensoriales.

Por lo que en principio se podría decir que es factible elaborar un embutido probiótico.

Conclusiones

Los productos cárnicos, en particular la formulación del embutido tipo salami utilizada, son un medio que permite el buen crecimiento de los microorganismos empleados ya que no se observó decremento en la cantidad de microorganismos. La población de microorganismos probióticos en el producto cárnico fermentado tipo salami fue superior a 10^7 UFC/g.

El análisis sensorial aplicado en este estudio, nos muestra que las características del producto no se ven afectadas por el tipo de bacteria empleada, ya que no existió diferencia significativa en la prueba afectiva, siendo el sabor una de las características más

Tabla II. Resultados de la evaluación sensorial

	Media	σ
Color		
<i>L. plantarum</i>	7.13	1.54
<i>L. acidophilus</i>	7.46	1.02
Mezcla	7.50	1.10
Olor		
<i>L. plantarum</i>	7.63	1.28
<i>L. acidophilus</i>	7.13	1.36
Mezcla	6.75	1.19
Textura		
<i>L. plantarum</i>	7.21	1.62
<i>L. acidophilus</i>	6.5	1.59
Mezcla	6.83	1.27
Sabor		
<i>L. plantarum</i>	6.46	1.87
<i>L. acidophilus</i>	7.21	1.14
Mezcla	6.92	1.61
Aceptabilidad General		
<i>L. plantarum</i>	6.92	1.67
<i>L. acidophilus</i>	7.00	1.25
Mezcla	7.04	0.99

importantes debido al tipo de producto elaborado.

Los resultados obtenidos muestran que el *Lactobacillus acidophilus* se puede emplear como cultivo iniciador en un producto cárnico fermentado con las ventajas de un producto probiótico ya que la producción de ácido láctico es muy parecida a la del cultivo iniciador así como la reducción del valor de pH.

La mezcla de microorganismos da mejor resultado en un producto cárnico tipo salami con buen sabor y con las características de un salami. Sin embargo falta analizar si durante el recuento de las BAL en la mezcla predomina alguna de ellas. Los resultados obtenidos cuando se inoculó de manera individual indican que la formulación es adecuada para su crecimiento.

Referencias

- AOAC. 1996. *Official Methods of Analysis of Association of Analytical Communities International*. William Horwitz (Ed.). AOAC International.
- Anderson, L. 1998. Fermented dry sausage products with the admixture of probiotic cultures. *Int Proc. 44th ICoMST*, 826-827.
- Arihara, K., Ota, H., Otoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S. y Miki, T. 1996. Utilization of probiotic lactic acid bacteria for meat products. *Int Proc. 24th ICoMST*, 501-502.
- Erkkilä, S., Suihko, M-L., Eerola, S., Petäjä, E. y Mattila-Sandholm, T. 2001. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Int J Food Microbiol.* 64:205-210.
- Guarner, F. 2007. *Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad*. Nutr Hosp. <http://scielo.isciii.es/scielo.php>, accesada 25/02/2009.
- Havenaar, R. y Huis In't Veld, J.H.J. 1992. Probiotics: a general view. Citado por: Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr.* 130:396S-402S
- Isolauri, E. 2001. Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr.* 73(suppl):399S-405S.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. y Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr.* 73(suppl):444S-450S.
- Pederson, C. S. 1979. *Microbiology of food fermentations*. Segunda Edición. AVI Publishing Co., Inc.. Westport, Connecticut.
- Roberfroid, M. B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr.* 71(suppl):1682S-1687S.
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr.* 130:396S-402S
- Rowland, I. 2002. Alimentos funcionales. Nuevas tendencias. En: R.M. Ortega, A. Marcos, J.

- Aranceta, J.A. Mateos, A.M. Requejo, L. Serra. Editores *Alimentos Funcionales Probióticos*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Shortt, C. 1999. The Probiotic Century: Historical and Current Perspectives. *Trends Food Sci Tech.* 10:411-417.
- Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M. y Kondo, Y. 1998. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behavior of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *Int J food Microbiol.* 41:1-7.
- Työppönen S., Petäjä, E. y Mattila-Sandholm T. 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of food microbiology.* 83:233-244.
- Shah, N.P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technol.* 55(11): 46-53.
- Varnam, A. H. y Sutherland, J. P. 1995. *Meat and meat products*. Chapman & Hall. Food Products Series. Londres, Reino Unido.



Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos

A. P. Porras - Loaiza* y A. López – Malo

*Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla.
San Andrés Cholula, Pue., México*

Resumen

Los componentes fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, que forman parte importante de la dieta humana. Dentro de la clasificación general se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y propiedades. Existe un gran interés en estudiarlos debido a sus propiedades antioxidantes, su participación en procesos sensoriales de los alimentos naturales y procesados, además de sus posibles aplicaciones benéficas para la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio. Esta revisión ofrece una visión de los grupos más importantes de compuestos fenólicos existentes en los alimentos vegetales, su metabolismo y biodisponibilidad. Al mismo tiempo se hace relevante la importancia de continuar con estudios que permitan poner de manifiesto el mecanismo de acción, así como la constitución intrínseca de los alimentos que contienen grupos fenólicos, utilizando sus características antioxidantes para el beneficio del ser humano.

Palabras clave: fenólicos, polifenoles, flavonoides, cumarinas, lignanos, taninos, antioxidante.

Abstract

Phenolic compounds belong to the micronutrients group in plants, being an important group of human diet. Within the general classification of these are phenols, flavonoids and phenolic acids that are part of a large group of chemicals, considered secondary plant metabolites with different chemical structures and properties. There is a great interest to study them, due to its antioxidant properties, its influence in the sensory aspect of natural and processed foods, in addition, to its beneficial applications for human health, such as the treatment and preventing cancer, cardiovascular disease and other inflammatory pathologies. This review provides an overview of the major groups of phenolic compounds in plant foods, their metabolism and bioavailability. At the same time, it is of relevant priority the research on this subjects in order to clarify the mechanism of action, as well as the intrinsic constitution of food matter that contains phenolic antioxidants, using its features for the benefit of the human health.

Keywords: phenolic, polyphenols, flavonoids, cumarinic, lignin, tanin, antioxidant.

* Programa de Doctorado en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: rosario.sotodo@udlap.com

Introducción

Los fenoles son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y vegetales. Originan una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en plantas, en su mayoría derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina (López, 2008). Estos compuestos constituyen un amplio grupo de sustancias, presentes en las plantas con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas. Existen más de 8000 compuestos fenólicos identificados (Shahidi y Nacz, 1995).

Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, frescos y procesados. Actualmente este grupo de compuestos fitoquímicos es de gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana (Clifford, 1992).

Además, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos, por lo que la obtención y preparación de productos con un alto contenido de estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, pudiendo incluso englobarlos dentro de los llamados alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Berra *et al.*, 1995; Posada *et al.*, 2003).

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos (Decker, 1997).

Actualmente las hierbas culinarias cada vez son más populares por sus características saborizantes en gran cantidad de alimentos. Además, son fuentes importantes de compuestos fenólicos; sin embargo los datos de composición específica son insuficientes enfatizando la necesidad de ser estudiados (Zheng y Wang, 2001).

El propósito de este artículo es presentar una breve revisión sobre los compuestos fenólicos, su estructura química, clasificación, funciones e importancia, para conocer de manera específica sus propiedades.

Revisión bibliográfica

Estructura química y clasificación

Los tres grupos más importantes en los que se dividen los compuestos fenólicos son: flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles. Químicamente los fenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo a sus derivados funcionales.

Las plantas y alimentos contienen una amplia variedad de derivados fenólicos incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas; además los fenoles unidos a una cadena larga de ácidos carboxílicos son componentes de la suberina y de la cutina (Fig.1); estas sustancias son esenciales para el crecimiento y la reproducción de plantas. Dentro de otras propiedades que se les confiere a los fenoles son la función de antibióticos, uso como pesticidas naturales, agentes protectores de los rayos UV y aislantes en las paredes celulares (Shahidi y Nacz, 2004).

Las antocianinas son otro grupo derivado de los fenoles, las cuales están distribuidas ampliamente en alimentos, especialmente en frutas y tejidos florales; son utilizadas como nutraceuticos en su forma seca y pulverizada. Son responsables del color rojo, azul, violeta y morado de casi todas las plantas, utilizándose en la industria alimenticia como colorantes (Shahidi y Naczk, 2004).

Lo anterior ha generado el interés de estudiar y cuantificar los compuestos y la generación de metabolitos a partir de los grupos fenólicos, midiendo su capacidad antioxidante entre otras propiedades (Gil *et al.*, 2002).

Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenilacéticos

Los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos como el gálico, vainillínico, *p*-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Por el contrario, existe poca información en la literatura científica sobre los ácidos fenilacéticos en los vegetales

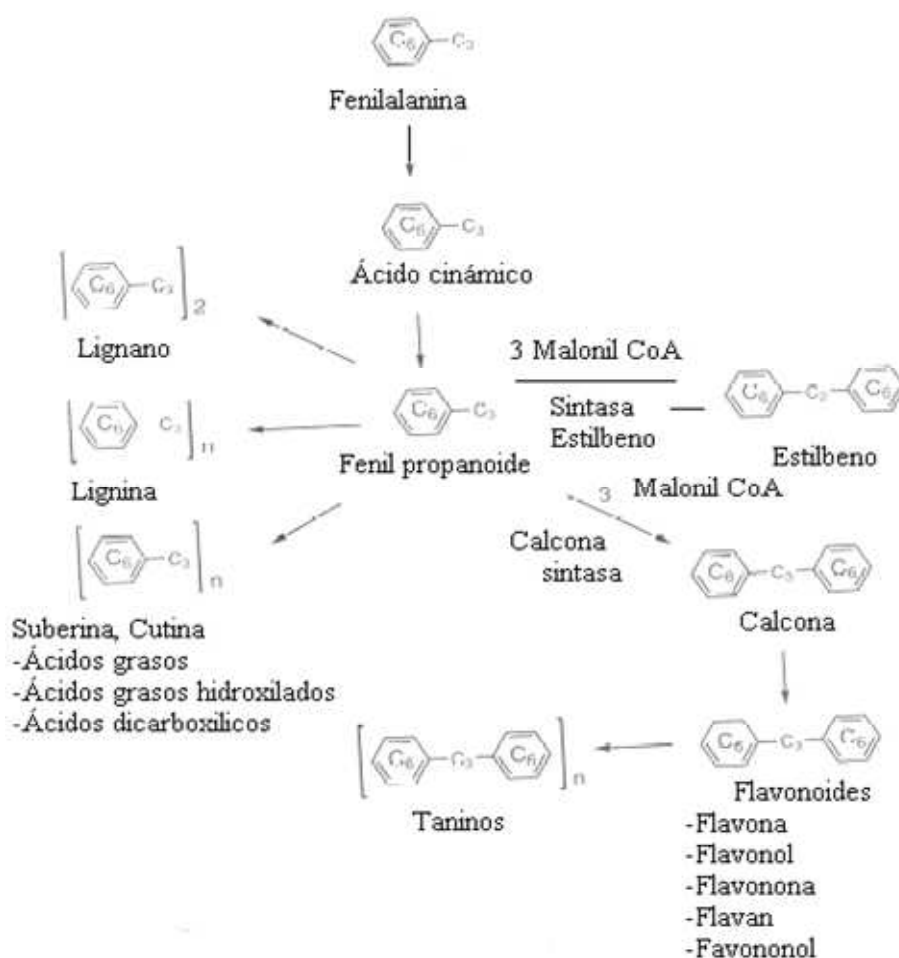


Fig. 1. Producción de fenilpropanoides, estilbenos, lignanos, ligninas, suberinas, cutinas, flavonoides y taninos de la fenilalanina. Adaptado de Shahidi y Naczk (2004).

Tabla I. Radicales de algunos ácidos fenólicos ^a

Ácido	Nombre científico	Radical 1	Radical 2	Radical 3
<i>p</i> -Hidroxibenzoico	4-Hidroxibenzoico	H	OH	H
Protocatecoico	3,4-Dihidroxibenzoico	OH	OH	H
Vainillínico	4-Hidroxi-3-Metoxibenzoico	OCH ₃	OH	H
Siríngico	3,5-Dimetoxibenzoico	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gálico	3,4,5-Trihidroxibenzoico	OH	OH	OH

^a Shahidi y Naczk (2004)(Martínez *et al.*, 2000).

Los ácidos fenólicos presentan generalmente actividad antioxidante en frutas, verduras y otras plantas (Zheng y Wang, 2001). En la Tabla I, se muestran algunos de los ácidos fenólicos de interés en alimentos, con sus respectivos radicales.

Ácidos cinámicos, cumarinas e isocumarinas

Los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general, se hallan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácido clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico. Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido, mientras que los cromonoles son menos conocidos y se forman a partir de las antocianidinas ante el incremento del pH del medio (Martínez *et al.*, 2000).

Lignanos y neolignanos

Los lignanos, otra subclase de polifenoles biológicamente activos, tienen un puente de cuatro carbonos y dan origen a muchas y diferentes estructuras químicas presentes en la naturaleza (Sarría, 2005).

Estos son metabolitos de plantas de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de hidroxifenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno. Los lignanos constituyen monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno. El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano (Martínez *et al.*, 2000).

Taninos

Muchos flavonoides de los alimentos se polimerizan en las propias plantas o como resultado del procesado de los alimentos. Estos polímeros se conocen como taninos, los cuales son responsables de precipitar algunas proteínas y alcaloides para convertir la piel del animal en cuero (Sarría, 2005).

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500 a 3000 Da (Daltons, unidad de masa atómica). Estos compuestos contienen un número importante de grupos hidroxilos entre otros grupos funcionales, siendo capaces de unirse a proteínas y otras macromoléculas (Martínez *et al.*, 2000).

Los taninos se clasifican en dos grupos hidrolizables y no hidrolizables o condensados, estos últimos tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente ya sea con el ácido gálico o el ácido hexahidroxidifénico, formando los galotaninos y elagitaninos respectivamente (Chung *et al.*, 1998). Los taninos condensados también llamados proantocianidinas constan de unidades monoméricas de flavanos ligados por medio de carbono-carbono y uniones éter. Se han identificado quince subclases de proantocianidinas, pero sin embargo, sólo tres tienen hasta el momento, importancia en alimentos de origen vegetal para humanos; procianidinas (catequina y sus polímeros), prodelfinidinas (galocatequina y sus polímeros) y propelargonidinas (afselecina y sus polímeros) o sus mezclas. En estos taninos, las unidades monoméricas están primariamente unidas por medio de uniones $4 \rightarrow 6$ ó $4 \rightarrow 8$ carbono-carbono (unión β), o por medio de uniones $4 \rightarrow 8$ carbono-carbono y $2 \rightarrow 7$ uniones éter (uniones α). Se han identificado otras uniones aisladas en plantas no alimenticias o constituyendo compuestos menores en algunos alimentos, como en el cacao. Los taninos pueden variar desde dímeros hasta grandes polímeros. Se encuentran en una amplia variedad de alimentos como manzanas, bayas, chocolate, vinos rojos, frutos secos y otros (Sarría, 2005).

Una segunda clase de taninos presentes en alimentos son los derivados que se forman principalmente bajo condiciones enzimáticas oxidativas y atmosféricas o durante el procesamiento de los alimentos, como por ejemplo los que se encuentran en vinos rojos,

té y café. A causa de la complejidad de los compuestos, ha sido difícil utilizar una estricta denominación química y con frecuencia se les han asignado nombres populares (Clifford, 1992). De los téis oolong y negro se derivan las teoflavinas y derivados del flavanol. La característica de las teoflavinas es un anillo de siete miembros.

Otra clase de taninos hidrolizables en los alimentos, constan de ácido gálico o ácido elágico, al que se esterifica un poliol no aromático, como el azúcar o el ácido quínico. En esta clase de taninos, también pueden producirse otras uniones (C-C ó C-O-C), para formar dímeros y complejos superiores, que tienen varios grados de resistencia a la fractura química. Se ha demostrado el efecto de la mejora en las características sensoriales de los vinos, derivado de la acción de los taninos hidrolizables (Sarría, 2005).

Flavonoides

En la Fig. 2 se presentan algunos compuestos bioactivos de tipo flavonoides presentes en alimentos, también denominados fitonutrientes. Son una subclase de los polifenoles que se caracterizan por poseer estructuras C6-C3-C6 y dos o más anillos aromáticos, y por tener cada uno, al menos un hidroxilo aromático y conectar con un puente de carbono como lo muestra la Fig. 3. Para los flavonoides, este puente consta de tres carbonos que se combinan con un oxígeno y dos carbonos de uno de los anillos aromáticos (anillo A) para formar un tercer anillo de 6-miembros (anillo C). Los flavonoides se dividen, a su vez, en subclases basadas en la conexión del anillo B al anillo C, así como en el estado de oxidación y en los grupos funcionales del anillo C, como se muestra en la Fig. 4 (Shahidi y Nacz, 2004).

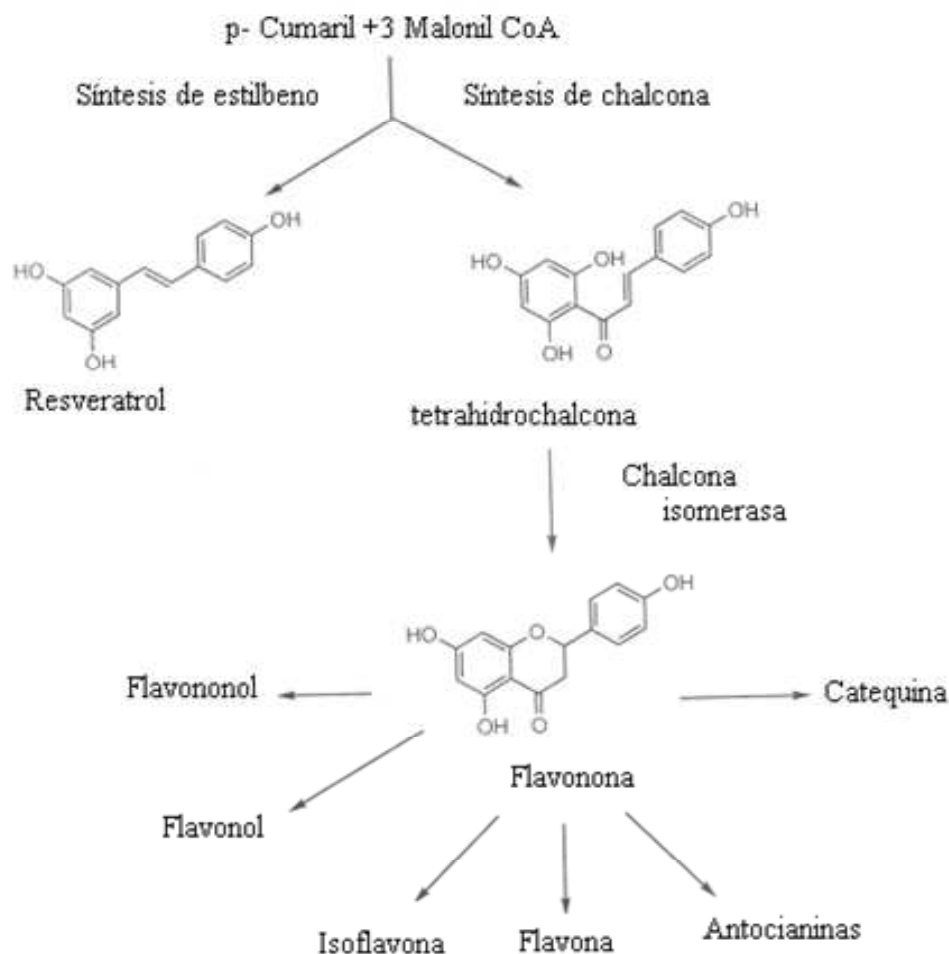


Fig. 2. Producción de flavonoides y estilbenos a partir de fenilpropanoides. Adaptado de Shahidi y Naczki (2004).

La clasificación de los flavonoides en base a sus variaciones estructurales es:

1. Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3: a) flavonas: con H en la posición 3 y b) flavonoles: con OH en la posición 3.
2. Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3: a) flavononas: con H en la posición 3 y b) flavonololes: con OH en la posición 3.
3. Chalconas: con el anillo C abierto.

4. Isoflavonoides: con el anillo B en la posición 3 (3-fenil-gamma-cromona).

Existen también dímeros de flavonoides, denominados diflavonoides (Sarría, 2005). En general los flavonoides que contienen múltiples grupos hidroxilo tienen mayor actividad antioxidante que los ácidos fenólicos contra los radicales peróxidos. Sin embargo el flavonoide glicosidasa posee una baja capacidad antioxidante (Zheng y Wang, 2001).

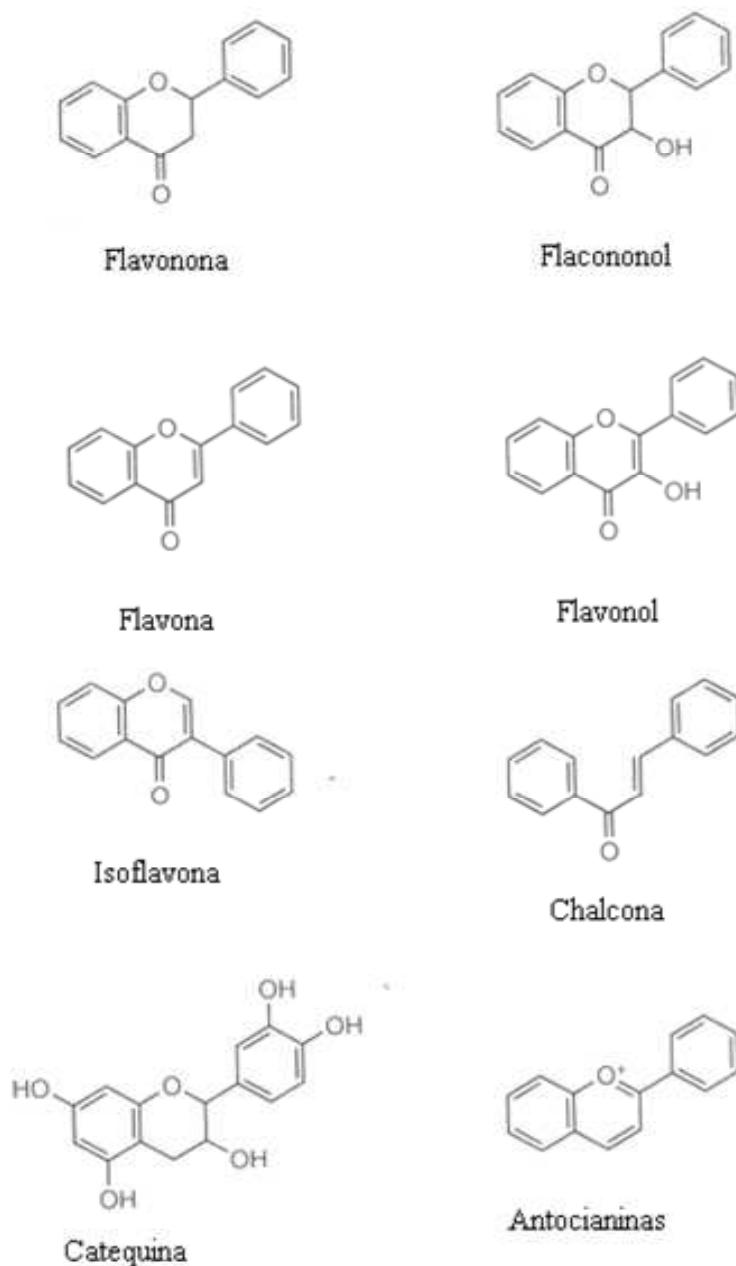


Fig.3. Estructuras químicas de diversos compuestos C6-C3-C6 encontrados en alimentos y nutraceuticos. Adaptado de Shahidi y Naczk (2004).

En la Tabla II se presenta el contenido en flavonoides y taninos de algunos alimentos. En general estos datos muestran que una porción de frutas de manzanas o arándanos, de chocolate negro y de vino rojo tienen un contenido, de moderado alto, en flavonoides

y/o taninos. Sin embargo, una porción de brócoli o de zumo de naranja proporciona bajas concentraciones de estos fitonutrientes (Sarría, 2005).

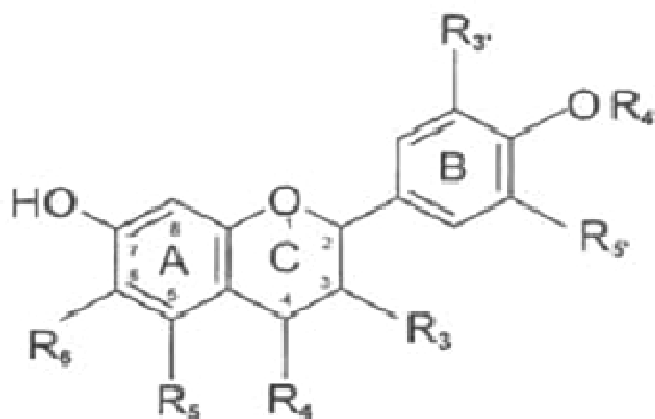


Fig. 4. Estructura general y numeración de los flavonoides de alimentos. Adaptada de Shahidi y Naczki (2004).

Compuestos fenólicos presentes en vegetales

Hay un gran interés en conocer el potencial antioxidante de las plantas con compuestos fenólicos como los flavonoides y como pueden reducir la oxidación de las células. Estudios recientes muestran que algunos grupos fenólicos aparecen en el plasma y cuerpo de estas plantas, por lo que se podrían considerar nutrientes importantes. Sin embargo, esto no se puede establecer con certeza hasta que sus efectos en las marcas biológicas del proceso oxidativo sean establecidas (Duthie y Crozier, 2000).

Los flavonoides son los responsables del color natural de los alimentos, como las

antocianinas de los colores rosa, escarlata, rojo, malva, azul y violeta de los vegetales, jugos de frutas y vinos. Numerosas sustancias encontradas en los vegetales, consideradas como componentes no nutritivos del alimento se comportan como antioxidantes efectivos en estudios *in vitro* e *in vivo*. Las flavononas son los compuestos responsables del sabor amargo en los cítricos (Martínez *et al.*, 2000).

Otros compuestos fenólicos, entre los que destaca el ácido clorogénico, han sido asociados al sabor amargo de la cerveza, el vino y la sidra. Mientras que los ácidos hidroxycinámicos y sus derivados son responsables del sabor amargo de los

Tabla II. Flavonoides y taninos contenidos en algunos alimentos (mg/porción)^a

Alimento	Proantocianidinas	Antocianidinas	Flavan-3-oles	Flavonoles	Flavanonas	Tearubiginas
Árandano	131	82	1	3	-	-
Brócoli Crudo	-	-	0	3	-	-
Chocolate negro	165	-	24	-	-	-
Manzana con piel	147	-	13	6	-	-
Naranja, zumo	-	-	-	>1	28	-
Té negro, infusión	-	-	6	10	-	116
Té verde, infusión	-	-	304	12	-	3
Vino blanco	2 a 3	-	3 a 12	-	-	-
Vino rojo	77 a 103	9 a 405	10 a 20	10	-	-

^a Adaptado de Sarriá (2005)

arándanos. El pardeamiento de las frutas y vegetales está también relacionado con el contenido de compuestos fenólicos. Así, la formación de pigmentos amarillos y marrones durante la manipulación y procesamiento de los alimentos vegetales, está controlada por los niveles de polifenoles, la presencia de oxígeno y la actividad de la polifenoloxidasas. Esta enzima contiene cobre y cataliza la reacción entre un grupo fenol y el oxígeno para dar agua y quinona, compuesto responsable de los pigmentos amarillos y marrones (Martínez *et al.*, 2000).

Efecto sobre macro nutrientes

Algunos polifenoles son considerados inhibidores de nutrientes ya que pueden formar complejos con las proteínas, almidón y enzimas digestivas, causando una reducción en el valor nutritivo de los alimentos (Martínez *et al.*, 2000). Este efecto se ha asociado generalmente a los taninos hidrolizados que se encuentran en cantidades trazas en los alimentos consumidos habitualmente; se considera a los taninos condensados o proantocianidinas como los principales inhibidores de la absorción de nutrientes de entre todos los polifenoles. Numerosos estudios realizados en animales de granja y experimentación, para evaluar el efecto de los taninos sobre las proteínas, ha mostrado que estos compuestos intervienen negativamente sobre la ingesta, la tasa de crecimiento, la digestibilidad de las proteínas y la disponibilidad de los aminoácidos, pudiendo incluso llegar a ocasionar la muerte (Martínez *et al.*, 2000).

Para que se produzca la unión entre los taninos y las proteínas se requieren moléculas con un peso superior a 350 Da, por lo que un flavonoide dimérico o una molécula de ácido elágico serían suficientes para formar este complejo. La unión se realiza mediante enlaces por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de los

taninos y los grupos carboxilos de los enlaces peptídicos de las proteínas, presentando los taninos una alta afinidad por las proteínas ricas en prolina (Martínez *et al.*, 2000).

Además del efecto inhibitorio en la absorción de los nutrientes, la formación de complejos entre los taninos y las proteínas supone un gran problema tecnológico, ya que pueden dar lugar a la formación de dispersiones coloidales, que pueden llegar a hacerse incluso más grandes con la sedimentación. Este hecho se ha observado en bebidas como cervezas, vinos, zumos de frutas, cafés y té, dando lugar a la aparición de turbidez, afectando la vida útil de los productos (Martínez *et al.*, 2000).

Los taninos pueden unir proteínas endógenas en el intestino, principalmente enzimas digestivas, lo que afecta a la absorción de otros macronutrientes, debido principalmente a la inhibición enzimática de procesos digestivos y de las enzimas microbianas que intervienen en la fermentación (Martínez *et al.*, 2000).

Efecto sobre biodisponibilidad de minerales

Cada vez se dispone de mayor evidencia sobre la absorción y la biodisponibilidad de los flavonoides (Ross y Kasum, 2002).

Los polifenoles están reconocidos como inhibidores de la absorción de distintos minerales, ya que tienen la capacidad de quelar cationes divalentes, principalmente Fe y Zn, a través de su unión a los grupos hidroxilos y carboxilos, reduciendo la biodisponibilidad de los mismos en el intestino. Los compuestos fenólicos son liberados de los alimentos durante la digestión y pueden unirse al Fe en el lumen intestinal haciéndolo no biodisponible. La capacidad de quelar este catión varía de unos compuestos fenólicos a otros, al estar directamente relacionada con la estructura

química. Así, la reducción en la biodisponibilidad del Fe se encuentra relacionada con la presencia en la dieta de los flavonoides monoméricos, catequinas y ésteres del ácido gálico, que se hallan en el té, de las catequinas del cacao, del ácido clorogénico del café, de los ácidos fenólicos, flavonoides monoméricos y poliméricos del vino y de los taninos del sorgo y de las habas (Lunte *et al.*, 1988). Estudios realizados por Hurrell *et al.*, (1997), han demostrado que la presencia de polifenoles en té y en distintas infusiones de hierbas, causan una reducción en la biodisponibilidad del Fe del pan enriquecido con sulfato ferroso, cuando se administran de forma conjunta durante el desayuno, siendo esta reducción más evidente en el té que en otras infusiones como consecuencia del mayor contenido en polifenoles (Martínez *et al.*, 2000).

El efecto de los polifenoles sobre la absorción de Zn y Cu ha recibido poca atención, aunque la información disponible sugiere que tales compuestos pueden quelar dichos minerales, afectando su biodisponibilidad. Estudios realizados por Ganjii y Kies (1994), mostraron que el consumo de té provocaba un efecto no significativo sobre el balance de Zn en humanos. Esto fue confirmado con estudios posteriores realizados en ratas no mostraron efecto alguno de los polifenoles presentes en el té sobre la absorción de Zn (Martínez *et al.*, 2000).

De forma general, los polifenoles estudiados en la bibliografía científica se pueden ordenar del siguiente modo, con relación a su mayor o menor efecto sobre la biodisponibilidad mineral: ácido gálico > ácido clorogénico = ácido cafeico > catequinas (Martínez *et al.*, 2000).

Se ha investigado acerca de la biodisponibilidad *in vitro* de los polifenoles del cacao. Se evaluó la absorción de 80g de

cacao semidulce rico en procianidinas y después de dos horas de su ingestión se presentó un incremento significativo en los niveles de epicatequina plasmática.

De igual manera dentro del mismo periodo se presentó un incremento en la capacidad antioxidante del plasma a un 31% y una reducción de 40% de las sustancias óxido-reactivas. Estos resultados apoyan el concepto de que los flavonoides del chocolate son bien absorbidos y que su consumo disminuye las concentraciones plasmáticas de sustancias oxidantes (Balasundram *et al.*, 2005).

Investigaciones recientes se han centrando en la biodisponibilidad de los polifenoles mediante el estudio de la ingesta y excreción en sus formas conjugadas. Pocas de éstas enfatizan la presencia de metabolitos *in vivo*, formados vía degradación por las enzimas de las bacterias presentes en el colon, para después ser metabolizadas en el hígado. Estos metabolitos son: glucuronidas de 3-hidroxifenilacético, ácido vaníllico, homovaníllico, e isoferúlico, así como los ácidos propiónicos 3-(3-metoxi-4-hidroxifenil), 3-(3-hidroxifenil), y el ácido 3-hidroxipúrico, en contraste con los polifenoles conjugados como las glucuronidas de la quercetina, naringenina, ácido sinápico, ferúlico y *p*-cumárico, que fueron detectados en menores concentraciones. Esto sugiere que se le debe dar mayor atención a productos que contengan derivados polifenólicos, por demostrar una función importante como componentes bioactivos *in-vivo* (Rechner *et al.*, 2003).

Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

Un antioxidante es un compuesto químico que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un

sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Igualmente se definen como compuestos que protegen el sistema celular de efectos potencialmente perjudiciales en los procesos que puedan causar una oxidación excesiva (Posada *et al.*, 2003).

En el organismo existen sistemas biológicamente activos conocidos como antioxidantes que actúan para proteger y contribuir al equilibrio fisiológico garantizando la vida. Los estudios epidemiológicos, experimentales y clínicos han demostrado que los antioxidantes proveen una eficacia biológica en la prevención y en la disminución de los efectos negativos de las enfermedades producidas por el estrés oxidativo (Posada *et al.*, 2003).

Los antioxidantes deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente que permita prevenir la acumulación de elementos prooxidantes, estado conocido como estrés oxidativo. El antioxidante al

reaccionar con el radical libre le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico, que en algunos casos como el de la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Posada *et al.*, 2003).

La actividad antioxidante de muchas sustancias depende del metabolismo celular y son conocidas como antioxidantes endógenos, como lo muestra la Tabla III, entre los cuales están la superóxido dismutasa, las catalasas y la glutathion peroxidasa. También existen factores nutricionales conocidos como antioxidantes exógenos, siendo los más estudiados el alfa tocoferol, el beta-caroteno, el ácido ascórbico y los polifenoles.

Es importante destacar que algunos minerales como el hierro, el zinc, el cobre, el selenio y el manganeso actúan como cofactores para la producción de antioxidantes endógenos (Posada *et al.*,

Tabla III . Clasificación de antioxidantes exógenos y endógenos ^a

Antioxidantes exógenos	Antioxidantes endógenos
Ácido-ascórbico	Glutathión
Alfa-tocoferol	Coenzima Q
Beta-carotenos, carotenos, luteína, licopeno y zeaxantina	Proteínas: Ceutoplasmina, lactoferrina, transferrina y ferritina
Flavonoides	Bilirrubina
Cofactores enzimáticos:	Uratos
Minerales:	Enzimas:
Selenio, cobre, zinc, hierro, manganeso	Glutathion
	Glutathion reductasa
	Glutathion transferasa
	Glutathion peroxidasa
	Superóxido dismutasa
	Catalasa
	Glucosa 6-fosfato-dehidrogenasa
	NADPH-FADH+H

^aPosada *et al.* (2003)

2003).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debida a sus propiedades redox, las cuales juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres y en la descomposición de peróxidos. Existen dos tipos de antioxidantes, los naturales y los sintéticos. La desventaja de los últimos son las características carcinógenas atribuidas. La relación entre los contenidos fenólicos y la actividad antioxidante en las hierbas medicinales tuvo una correlación lineal positiva; el resultado fue el mismo para las hierbas culinarias, en especial para los tres tipos de orégano (*P. longiflora*, *Origanum Majoricum* y *O. vulgare ssp*).

Sin embargo, éstas presentaron mayor composición de grupos fenólicos y actividad antioxidante. Los resultados muestran que los componentes fenólicos presentes en las hierbas tienen una mayor capacidad antioxidante (Zheng y Wang, 2001).

Para comprender mejor la actividad fisiológica de los fenólicos, se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante varía en función del grupo de compuestos estudiados y de su solubilidad en fase acuosa o lipídica. Asimismo, la gran diversidad de métodos empleados proporciona diferentes resultados, difíciles de comparar. Para solventar este problema en la mayoría de los estudios científicos en los que se valora la actividad antioxidante, ya sea de compuestos puros o de extractos vegetales, se utiliza el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7 S-tetrametilcroman-2-carboxílico), como patrón, sustancia que se caracteriza por ser un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Owen *et al.*, 2000). Todas las clases de fenoles han demostrado ser antioxidantes potentes, como se demuestra en el aceite de oliva, relacionándolo con la actividad anti cancerígena (Owen *et al.*, 2000).

Compuestos fenólicos y su relación con diversas patologías

Las hierbas medicinales en las que se encontró mayor contenido de compuestos fenólicos fueron *Catharanthus roseus*, *Thymus vulgaris*, *Hypericum perforatum* y *Menta piperita*. La primera se ha utilizado en tratamientos de leucemia, linfomas y cáncer. *Hypericum perforatum* se ha utilizado tradicionalmente de forma externa para tratar heridas y quemaduras; como forma interna se ha utilizado como tónico, antidepresivo y tranquilizador. *Thymus. vulgaris* se utiliza de forma tópica en cremas por su acción antibacterial. *Menta piperita* es un híbrido natural, empleado en el tratamiento de cólicos, indigestión y flatulencia (Zheng y Wang, 2001).

El cacao parece ser efectivo al poseer bioactivadores que disminuyen las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Sarría, 2005). A los compuestos fenólicos, se les han atribuido actividades farmacológicas y médicas relacionadas con la prevención y/o mejora del estado de salud, destacando sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos e inhibidores de la fosfolipasa A2, de la cicloxigenasa, lipoxigenasa, glutatión reductasa y xantina oxidasa (Jiang y Dusting, 2003).

Los polifenoles pueden interferir distintas etapas que conducen al desarrollo de tumores malignos al proteger al ADN del daño oxidativo, inactivando los carcinógenos e inhibiendo los genes mutagénicos de la actividad de las enzimas encargadas de la activación de procarcinógenos. Numerosos estudios *in vivo* con animales se han desarrollado para establecer los efectos anticarcinogénicos de los polifenoles, mediante aplicaciones tópicas, o bien con la

administración de dietas enriquecidas con polifenoles y/o con alto contenido en estos compuestos, siendo necesarias altas concentraciones para poder observar este tipo de respuesta. Diferentes estudios epidemiológicos han puesto en evidencia el efecto preventivo de los polifenoles frente al cáncer de vejiga así como frente a otros tipos de cánceres, como el de pulmón, aunque en algunos casos los resultados obtenidos pueden no ser concluyentes o ser contradictorios (Galati y O'Brien, 2004).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la dieta que incluye compuestos fenólicos provenientes de las plantas reduce el riesgo de enfermedades coronarias del corazón. La actividad antioxidante e hipolipidémica de estos compuestos tienen importantes funciones en la prevención de la oxidación lipoproteica y en lesiones arterioscleróticas. Los compuestos fenólicos tienen efectos antiinflamatorios incluyendo la inhibición del proceso de adición de la molécula citosina y quemoquina y supresión suave de la actividad muscular entre otros efectos pro-inflamatorios. Sin embargo la evidencia terapéutica de los beneficios de estos compuestos es aún dispersa (Jiang y Dusting 2003).

Los alimentos de origen vegetal, poseen una gran diversidad de compuestos fenólicos, que pueden significar una fuente natural de antioxidantes como los flavonoides, otros como las antocianinas que mejoran las características sensoriales de color en los alimentos procesados y los taninos que contribuyen a mejorar los padecimientos de origen cardiovascular. La importancia de consumir estos productos como parte de la dieta, beneficiará a la población debido a los antioxidantes que poseen los grupos fenólicos. Con base a lo anteriormente expuesto, es importante continuar con las investigaciones relacionadas con aspectos químicos, estudios sobre la biodisponibilidad

y los efectos *in vivo* de los diferentes compuestos fenólicos presentes en la gran diversidad de alimentos endémicos de México.

Conclusión

Las investigaciones científicas reportan una gran variedad de compuestos fenólicos disponibles en el reino vegetal, así como su relación entre los polifenoles y los efectos fisiológicos positivos para la salud, como en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer, procesos patológicos de carácter inflamatorio, infecciones, entre otros; además de tener una importante participación en la calidad sensorial de los alimentos naturales y procesados. Por lo tanto, se recomienda profundizar las investigaciones en diferentes productos naturales que contengan, compuestos fenólicos para definir tipos, concentraciones, biodisponibilidad y sus mecanismos de acción, así como su posible sinergismo y/o antagonismo con otros componentes de la dieta o del organismo, con el fin de aprovechar mejor todas sus propiedades.

Referencias

- Balasundram, N., Sundram, K. y Samman, S. 2005. Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*. 99(1):191-203.
- Berra, B., Caruso, D., Cortesi, N., Fedeli, E., Rasetti, M. F. y Galli, G. 1995. Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. *Rivista Italiana Sost Grasse*. 72:285-291.
- Clifford, M. N. 1992. Sensory and dietary properties of phenols. *Proceedings of the 16th international conference of grape polyphenol*. 16(11):18-23.

- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W. y Lin, Y. 1998. Tannins and Human Health. *Critical Reviews Food Sciences and Nutrition*. 38(6):421-464.
- Decker, E. A. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews*. 55(1):396-398.
- Duthie, G. y Crozier, A. 2000. Plant derived phenolic antioxidants. *Current Opinion on Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 3(6):447-51.
- Galati, G. y O'Brien, P. J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine*. 37(3):287-303.
- Ganjii, V. y Kies, C. V. 1994. Zinc bioavailability and tea consumption: study in healthy humans consuming self-selected and laboratory controlled diets. *Plant Foods for Human Nutrition*. 46:267-276.
- Gil, I. M., Barberán, A. F., Hess, P. B. y Kader, A. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Agricultural Food Chemistry*. 50(17):4976-4982.
- Hurrell, R. F., Reddy, M. y Cook, J. D. 1997. Influence of polyphenol containing beverage on iron absorption. En: Proceedings of a European cost concerted action scientific workshop. *Polyphenols in foods*. Aberdeen. Escocia. pp. 169-172.
- Jiang, F. y Dusting, G. J. 2003. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Current Vascular Pharmacology*. 1(22):135-156.
- López, J. 2008. *Los Alimentos Funcionales: Importancia y Aplicaciones*. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Chile.
- Chile potencia alimentaria. http://chilepotenciaalimentaria.cl/content/view/129789/Los_alimentos_funcionales_Importancia_y_Aplicaciones.html, accesada 10/02/2009.
- Lunte, J. M., Blankenship, K. D. y Scott, A. R. 1988. Detection and identification of procyanindins and flavonoids in wine by dual-electrode liquid chromatography. *Analyst*. 113:99-103.
- Martínez, V. I., Periago, M. J. y Ros. G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50(1):1-19.
- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalter, B. y Bartsch, H. 2000. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids y lignans and squalene. *Food Chemistry and Toxicology*. 38(8):647-659.
- Posada Jaramillo, M., Pineda-Salinas, V. y Agudelo-Ochoa, G. M. 2003. *Los antioxidantes de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas*. http://chocolatecorona.com.co/docs/libro_antioxidantes.pdf, accesada 15/02/2009.
- Rechner, A., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, K., Moore, R. y Evans, A. 2003. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(2):220-235.
- Ross, J. A. y Kasum, C. M. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22:19-34.
- Sarría, C. A. 2005. Flavonoides: compuestos bioactivos de los alimentos. *Boletín Pediátrico de la Sociedad Aragonesa*. 34:88-92.
- Shahidi, F. y Naczk, M. 1995. *Food Phenolics Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic Publishing Co. EE.UU. 106 p.
- Shahidi, F. y Naczk, M. 2004. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press. Londres. pp. 1-16.
- Zheng, W. y Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Agricultural and Food Chemistry*. 49(11):5165-5170.