IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

4.1. AGENTES ANTIMICROBIANOS.

La demanda de alimentos procesados se ha incrementado con el crecimiento de la población mundial de manera considerable, esto a su vez, implica un cambio en el estilo de vida (Holdsworth,1988).

A pesar de las diferentes técnicas de conservación disponibles, la alteración de alimentos por parte de los microorganismos, es un problema no controlado del todo.

El uso de agentes químicos es uno de los métodos de conservación más antiguos y tradicionales que existen, sin embargo, no cumplen con el concepto de natural o seguro que los consumidores demandan.

Cada día se introducen al mercado nuevos productos que responden a las necesidades de una vida útil más larga y la seguridad de que están libres de microorganismos deteriorativos o patógenos.

Los principales métodos de conservación de los alimentos se pueden clasificar en tres grupos (Holdsworth,1988):

- *Métodos de duración corta.* Refrigeración, atmósfera controlada, atmósfera modificada, tratamientos químicos de superficie.

- *Tratamientos químicos.* Empleo de azúcar, sulfitado, salmuera, aditivos.
- *Métodos de larga duración.* Pasteurización, deshidratación, concentración, congelación e irradiación.

Los microorganismos y los procesos bioquímicos son las principales causas de alteración de los alimentos. En las frutas y hortalizas, el problema principal es el ataque de mohos y levaduras, así como, el oscurecimiento enzimático.

La sociedad actual, demanda también, productos con menos aditivos químicos ya que, algunos de éstos son sospechosos de poseer cierto grado de toxicidad. Es así, como los productores de alimentos han sido forzados a tratar remover completamente el uso de antimicrobianos químicos o adoptar alternativas naturales para el mantenimiento o extensión de la vida útil de sus productos (Nychas,1995).

Como consecuencia de esto, es como ha surgido la industria de los "alimentos mínimamente procesados", los cuales son productos altamente perecederos, y con el peligro potencial de la supervivencia y crecimiento de ciertos microorganismos patógenos (Smid y Gorris,1999).

Los compuestos antimicrobianos pueden ser compuestos sintéticos adicionados de manera intencional o de ocurrencia natural que pueden ser utilizados comercialmente como aditivos para la preservación de los alimentos.

De acuerdo al *Food Protection Committee of the Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences*, se define como aditivo a "cualquier sustancia o mezcla de sustancias distintas a los componentes básicos que están presentes en los alimentos como consecuencia de su producción, procesado, almacenamiento o envasado". Desde un punto de vista técnico, un aditivo alimenticio, puede ser una sustancia intencionalmente añadida a un producto o una sustancia que se convierte en componente de un alimento como consecuencia de su cosecha desde el campo a la mesa.

A los añadidos de manera intencional, se les denomina *aditivos voluntarios* y cumplen con funciones específicas en el alimento (aromatizar, edulcorar, colorear o prevenir la alteración de los mismos). Existen otros aditivos, los *aditivos involuntarios*, son los que están presentes en cantidades muy pequeñas y llegan a los alimentos por el contacto con los compuestos químicos utilizados en la agricultura, con el equipo utilizado durante el procesado o con los propios recipientes (Roberts,1986).

Las sustancias originalmente presentes en los alimentos pueden ser consideradas como aditivos cuando sus niveles originales son incrementados por el hombre (Roberts, 1986).

Una amplia variedad de sistemas antimicrobianos naturales, han sido desarrollados a partir de microorganismos, plantas y animales, muchos de los cuales ya han sido empleados para la conservación de los alimentos y otros están siendo investigados. (Tabla I).

Tabla I. Antimicrobianos naturales presentes en los alimentos.

Componentes	Alimentos en los que se encuentran
Conalbúmina y avidina	Huevo
Lactoferrina	Leche
Lactoperoxidasa	Leche
Lisozima	Leche y huevo
Acidos orgánicos	Frutas y verduras
Ac. grasos cadena Mediana	Grasas de plantas y animales
Ac. Esenciales	Plantas y especias
Pigmentos	Frutas y verduras

- Beuchet y Golden, 1989.

4.2. ANTIMICROBIANOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL.

Plantas, hierbas y especias, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos (Tabla II). Wilkins y Board (1989) reportan más de 1340 plantas como potenciales fuentes de antimicrobianos. Los compuestos antimicrobianos de las plantas, se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de hojas, flores, bulbos, risomas y frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos. Los aceites esenciales se pueden obtener con destilación por arrastre de vapor, entre otros métodos.

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especias, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides. La mayoría de estos compuestos, son identificados como metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) y proteínas que actúan principalmente sobre las membranas de los microorganismos invasores.

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana, incluye a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético (Conner,1993), todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula microbiana. Eklund (1989) menciona que los compuestos utilizados como antimicrobianos tienen varios sitios de ataque dentro de las células microbianas y que dependiendo de las concentraciones utilizadas en los alimentos, pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos.

Tabla II. Plantas utilizadas como saborizantes en alimentos y con actividad antimicrobiana.

Ajedrea	*Satureja hortensis*
Ajo	*Allium sativum*
Albahaca	*Ocimum basilicum*
Alcaravea	*Carum carvi*
Anís	*Pimpinella anisum*
Azafrán	*Crocus sativus*
Canela	*Cinnamomum zeylanicum*
Cardamomo	*Elletaria cardamomum*
Cebollines	*Allium shoenoprasum*
Cilantro	*Coriandum sativum*
Clavo	*Syzygium aromaticum*
Comino	*Cuminum cyminum*
Cúrcuma	*Curcuma longa*
Eneldo	*Anetum graveolens*
Estragón	*Artemisa dracunculus*
Hinojo	*Foeniculum vulgare*
Jengibre	*Zingiber officinale*
Laurel	*Laurus nobilis*
Macis	*Myristica fragans*
Mejorana	*Origanum majorana*
Menta	*Mentha vulgaris*
Mostaza	*Brassica hirta,B. Juncea*
Nuez moscada	*Myristica fragans*
Perejil	*Petroselinum crispian*
Perifollo	*Anthriscus cerefolium*
Pimienta	*Piper nigrum*
Pimienta de Cayenne	*Capsicum frutescens*
Pimienta de Jamaica	*Pimienta dioica*
Pimentón	*Capsicum annun*
Romero	*Rosmarinus officinalis*
Salvia	*Salvia officinalis*
Semilla de apio	*Appium graveolens*
Té limón	*Cymbopogon citratus*
Tomillo	*Thymus vulgaris*
Vainilla	*Vainilla planifolia*

- López-Malo et al. (1995).

Los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Smid y Gorris, 1999).

Nychas (1995) demostró el efecto del extracto fenólico del té negro, el cual puede ser catalogado como un agente bacterioestático o bactericida contra microorganismos como *Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Vibrio cholerae, Staphylococcus aureus, S. epidermis, Salmonella typhi, S. typhimurium.*

El carvacol y el timol tienen un menor efecto de inhibición en el crecimiento de mohos en comparación con los aceites extraídos del orégano y el clavo, debido a la presencia de otros componentes presentes en los extractos y no solo a los compuestos fenólicos. (Pasteur et al; 1994).

Se han realizado numerosas investigaciones acerca del poder antimicrobiano de especias y sus aceites esenciales (p.e. clavo, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, orégano, mostaza y vainilla)(Hefnawy et al;1993).

Igualmente, la FDA (Foods and Drugs Administration), considera a los agentes antimicrobianos de origen natural, como sustancias del tipo GRAS, en la tabla III, figuran productos vegetales de los que se obtienen aceites esenciales, oleoresinas y extractos naturales incluyendo a sus destilados, para su uso como agentes antimicrobianos.

Tabla III. Lista de FDA de especias, aromatizantes y saborizantes naturales considerados GRAS.

Ajo	Glicirriza
Ajonjolí	Hinojo
Albahaca	Jengibre
Albahaca	Manzanilla
Alcaparra	Mejorana
Alfalfa	Menta Inglesa
Angélica	Mostaza
Anis	Nuez moscada
Apio	Orégano
Azafrán	Perejil
Caléndula	Pimentón
Canela	Pimienta
Cardamono	Pimienta de Cayena
Cebolla	Pimienta de Jamaica
Cilantro	Pimiento
Clavo	Rábano
Comino	Romero
Cúrcuma	Tilo
Geranio	Vainilla

* Adaptada de Roberts,1986.

4.3. MODO DE ACCION DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL.

Conner (1993) sugirió que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así a la actividad celular.

Juven et al. (1994) encontraron que el aumento en la concentración de aceite esencial de tomillo y carvacrol no se reflejó en una relación directa con su efecto antimicrobiano. Sin embargo, se encontró que después de rebasar una cierta concentración crítica, se presentó una rápida y significativa reducción en el número de células viables de *Salmonella typhimurium.* Esta situación se interpretó de la manera siguiente: los compuestos fenólicos sensibilizan a la membrana celular y cuando se saturan los sitios sobre los cuales actúan se presenta un grave daño a la membrana citoplasmática.

Kabara (1991), menciona que los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser a dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación (Nychas,1995).

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por especias y sus aceites esenciales (Davidson,1996). Sin embargo, se supone que dada la estructura fenólica de muchos de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las especias y sus aceites esenciales, el modo de acción debe similar al de otros compuestos fenólicos.

4.4. ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL: EL AJO.

El ajo es una lanta comúnmente utilizada como agente saborizante y condimento en los alimentos.

El ajo (*Allium savitum),* pertenece a la familia de las *liláceas* junto con la cebolla, el puerro y el tulipán. Es probablemente el alimento con potencial antimicrobiano más consumido. Las propiedades medicinales del ajo, han sido estudiadas desde hace ya varios siglos. Sin embargo, es hasta los años cuarentas, que aparece evidencia científica de sus propiedades antimicrobianas; Cavallito y Bailey en 1944, fueron los primeros en aislar el componente antimicrobiano del ajo a partir de bulbos frescos, utilizando destilación por arrastre con vapor. Identificaron al compuesto obtenido como *alicina* o *ácido dialiltiosulfónico* (Beuchat y Golden, 1989),.

Este compuesto, se describe como un aceite altamente aromático, incoloro y el responsable del olor característico en el ajo y la cebolla. En concentraciones de 1:85,000 en pruebas de laboratorio, la *alicina* se muestra como bactericida con un amplio espectro para microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

En los tejidos frescos de ajo, se encuentra la *alina* (S-alil-L-cisteína-S-óxido), la cual por medio de hidrólisis se convierte en *alicina*, piruvato y amonio (Figura 1).

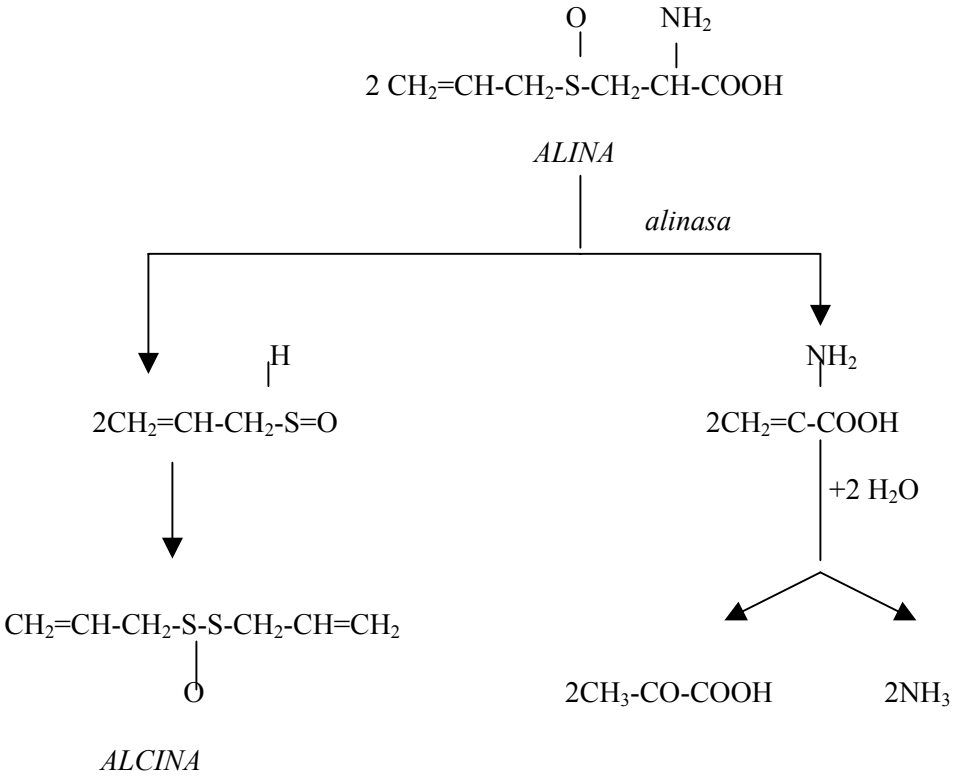

Fig.1. Conversión enzimática de alina a alicina.

El mecanismo de la actividad antimicrobiana del ajo, se basa en la inhibición de la actividad de enzimas como: fosfatasa alcalina, invertasa, ureasa y papaína, así como de enzimas sulfihídiricas. La alicina inhibe la actividad de enzimas sulfihídricas debido a la

presencia de los grupos químicos S-O-S. La mayoría de estas enzimas son inhibidas a concentraciones 0.0005molar de alicina. Esto incluye a ureasa, papaína, colina estereasa, hexocinasa, triosafosfatodeshidrogenasa, carboxilasas, adenosin trifosfatasa y β-amilasa. Igualmente, muestra inhibición para enzimas no sulfihídricas como lactodeshidrogenasa, tirosinasa, fosfatasa alcalina.

Muchos de los trabajos realizados sobre la actividad antimicrobiana del ajo, hacen referencia a su acción sobre bacterias patógenas, mohos micotoxigénicos y microorganismos deteriorativos. Organismos que tienen en común a las enzimas sulfihídricas (Davidson y Parish,1989).

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado también su eficacia para bacterias Gram positivas: *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Shigella.* Puede prevenir el crecimiento de *S. aureus, B. cereus;* con una eficacia comparada con la de la ampicilina a diferentes concentraciones. Aunque resulta ineficaz para *C. botulinum* (Davidson y Parish,1989).

Un gran número de levaduras y mohos son susceptibles a la acción inhibitoria del ajo. El jugo de ajo resulta efectivo para atacar a *Candida albicans*, esto debido a la habilidad de inactivar a las proteínas por oxidación de los tioles.

4.5. EFICACIA DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.

Existe un número importante de reportes acerca de la actividad antimicrobiana de extractos, aceites, especias y condimentos, es difícil obtener estimaciones cuantitativas y hacer comparaciones de sus efectos debido, al menos parcialmente, a la gran variedad de métodos que se han utilizado para evaluar su efectividad (Zaika,1988).

Para la aplicación de los antimicrobianos de origen natural, se necesita comprobar su eficacia “in vitro”, en medios microbiológicos y en productos alimenticios. Las pruebas “in vitro” proporcionan información valiosa acerca de la efectividad de un compuesto, y pueden ser evaluados de igual manera, las variables que afectan a la actividad antimicrobiana, la cual depende, como se ha visto, del tipo, género, especie, y microorganismos a probar. Por ejemplo, las esporas bacterianas, son más resistentes al efecto de los

antimicrobianos que las células vegetales. También el tipo de pared celular es un factor a considerar.

Una variable asociada a la efectividad de un agente antimicrobiano en los alimentos, es el número inicial de microorganismos en el sistema. Debido a que la mayoría de los antimicrobianos son bacterioestáticos más que bactericidas. Los agentes antimicrobianos de origen natural no contribuyen al desarrollo de cadenas de resistencia o alteran el ambiente del alimento de manera que crezcan otros organismos patógenos.

Algunos factores intrínsecos y extrínsecos o variables asociados a la aplicación de los agentes antimicrobianos a los alimentos se determinan en las pruebas “in vitro”. Estas incluyen temperatura, atmósfera, pH, potencial de óxido-reducción y actividad de agua. Para el éxito de estas pruebas, se requiere que estos factores sean controlados. Uno de estos factores, es el microorganismo en si, la actividad de los antimicrobianos depende de la especie, tipo y género del microorganismo.

Las variaciones en la preparación del antimicrobiano se debe a la pureza del disolvente utilizado así como del método de

esterilización (p.ej. calor, filtración por membrana.) El tiempo de exposición debe ser cuidadosamente controlado para establecer resultados significativos. El número inicial de microorganismos, debe ser consistente para obtener resultados reproducibles. El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación y la exposición. En la mayoría de los casos, el incremento de la temperatura de exposición incrementa la actividad del antimicrobiano. La temperatura de incubación debe ser la óptima para el microorganismo a probar. La composición de la atmósfera, juega un rol muy importante, es necesario definir si el microorganismo es anaerobio o no. La actividad de los antimicrobianos se ve afectada de igual manera por el pH, generalmente la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se atribuye principalemente a su forma no disociada (Beuchat y Golden,1989).

Estas pruebas demuestran los problemas potenciales que se pueden encontrar en los sistemas alimenticios. Para el éxito de dichas pruebas, es necesario que las propiedades del agente antimicrobiano,

se especifiquen dentro de un esquema de aplicación para conocer los propósitos del mismo.

4.6. MÉTODOS DE PRUEBA PARA LA EFICACIA DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.

Los métodos que se utilizan para evaluar la actividad de los antimicrobianos, se pueden dividir en: pruebas “in vitro” y pruebas de aplicación. Estas últimas, también se conocen como “métodos de barrido” y pueden incluir cualquier prueba en la que el compuesto no se aplica de manera directa al sistema alimenticio; generalmente, este tipo de pruebas, proveen información preeliminar para determinar la eficacia del compuesto. Las pruebas “in vitro”, incluyen pruebas en las que el agente antimicrobiano se aplica directamente al producto (Davidson y Parish,1989).

En la tabla IV, se muestra la clasificación de algunos de los métodos más utilizados para evaluar la eficacia de los compuestos antimicrobianos en los alimentos.

Tabla IV. Métodos para evaluar la eficacia de antimicrobianos para alimentos.

Métodos exploratorios.

- Métodos de evaluación de punto final.
  - Difusión en agar.
  - Dilución en agar y caldo.
  - Gradiente en placa.
  - Pruebas para desinfectantes.
- Métodos descriptivos.
  - Ensayos turbidimétricos.
  - Curvas de inhibición o muerte.
- Métodos aplicados.
  - Punto final
  - Curvas de inhibición o muerte.
- Métodos para evaluar mezclas de sustancias.

* Adaptada de Davidson y Parish (1989).

Davidson y Parish (1989) mencionan que para la aplicación de cualquiera de éstos métodos deben controlarse los demás factores que puedan intervenir en la respuesta del microorganismo (temperatura, pH, actividad de agua, nutrientes) y señalan que uno de los factores es el propio microorganismo, es decir, depende del tipo, género, especie y cepa del organismo de prueba. El número inicial de células

o esporas utilizadas durante los ensayos con el antimicrobiano debe ser consistente para asegurar que los resultados son reproducibles. En el caso de los antimicrobianos naturales, Zaika (1988) señala que el medio en que se prueba su eficacia, la especie, aceite o extracto a evaluar y el microorganismo afectan significativamente los resultados de las pruebas.

Un método ampliamente utilizado para la evaluación de los antimicrobianos naturales es el conocido como “zona de inhibición” (Zaika ,1988). Se trata de un método sencillo, sin embargo, el efecto inhibitorio del compuesto que se va a evaluar, dependerá de su habilidad para difundirse en el medio. Este método, cae en la clasificación de los llamados de punto final y se le conoce como “ensayo de disco”. Uno de los requisitos para obtener resultados confiables y repetibles es que el microorganismo a evaluar se desarrolle rápida y uniformemente (Davidson y Parish, 1989).

4.7. *Escherichia coli.*

Este organismo, originalmente fue llamado *Bacterium coli,* y fue identificado a partir de las heces fecales de infantes. Fue rebautizado en 1920 con el nombre de su descubridor. Se ha identificado como la responsable de cuadros diarreicos en los seres humanos y en los animales.

E.coli, se trata de una bacteria perteneciente a la familia *"Enterobacteriaceae"*; organismo Gram-negativos, catalasa-positiva,oxidasa-negativa, anaerobia facultativa.

Se han identificado variantes de esta bacteria:

E.coli enteropatogénica.(EPEC).

E. coli eteroinvasiva. (EIEC).

E. coli enterohemorrágica.(E.coli O157:H7).

En la tabla V, se enlistan las condiciones de crecimiento para *E. coli*.

Tabla V. Condiciones de crecimiento para E.coli.

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (ºC)	7-8	35-40	44-46
pH	4.4	6.7	9
Actividad de agua (a_w)	0.95	0.995	--

- Adaptada de "Microbiological Specifications of Food Pathogens"1996.

4.8. *Listeria innocua.*

Se trata de una bacteria Gram-positiva, no esporulador, catalasa positivo y anaerobio facultativo. En la tabla VI, se muestran las condiciones de crecimiento para *Listeria innocua.*

Tabla VI. Condiciones de crecimiento para *Listeria innocua.*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (ºC)	-0.4	37	45
PH	4.39	7.0	9.4
Actividad de agua (a_W)	0.92	-	-

- Adaptada de "Microbiological Specifications of Foods Pathogens"1996.

4.9. FUTURO DE LOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL.

Como se comentó anteriormente, el futuro de los agentes antimicrobianos de origen natural, se encuentra determinado por la actitud del consumidor actual ante los conservadores químicos. Los antimicrobianos de origen natural, se consideran como fuentes potencialmente seguras, pero su uso real en los productos alimenticios, se ha establecido para pocos casos. Cualquiera de estos extractos, deberá ser sometido a rigurosos estudios toxicológicos.

La legislación de muchos países, ha sido modificada para hacer extensiva el uso de cantidades mínimas de conservadores de origen químico para la próxima década. Este avance en materia legislativa, hacia estrategias no químicas puede favorecer sus probabilidades y ventajas económicas (Smid y Gorris, 1999).