

## **CAPITULO I**

### **REVISION BIBLIOGRAFICA**

Durante los últimos 20 años la demanda de los consumidores por adquirir alimentos mínimamente procesados, ha generado un importante cambio en la aplicación de las técnicas de conservación de alimentos, por lo que la industria y los investigadores han orientado sus esfuerzos a cubrir estas necesidades (Alzamora et al., 1995). Uno de los principales problemas en los alimentos es la presencia de microorganismos que causan deterioro al producto o afectan la seguridad del mismo; sin embargo en la naturaleza se encuentran una gran cantidad de compuestos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos (Beuchat y Golden, 1989).

Los factores principales que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano se pueden clasificar de la siguiente forma: (Mossel e Igram 1955, Mossel 1983, Alzamora 1997):

- Factores intrínsecos. Aquellos factores químicos y físicos que actúan dentro del alimento (nutrientes, pH, actividad de agua, presencia de conservadores, sustancias antimicrobianas, etc.).
- Factores de procesamiento. Son factores que se aplican deliberadamente a un alimento para conservarlo.
- Factores extrínsecos. Aquellos factores que actúan durante el almacenamiento.

Giese (1994) y Davidson (1996) mencionan que la seguridad de los alimentos se incrementa y garantiza por el uso de compuestos llamados antimicrobianos, ya que estas sustancias se añaden a los alimentos para prevenir la descomposición microbiana. Las formas conocidas de combatir los efectos deteriorativos de los microorganismos en alimentos incluyen: la prevención de su acceso a los alimentos, la inactivación de los mismos y la disminución o inhibición de su crecimiento (Gould y Russell, 1991). La velocidad de deterioro microbiológico en alimentos depende no solo del tipo de microorganismos presentes sino también de la composición química del

producto y carga de microorganismos inicialmente presente en el mismo (Beuchat y Golden, 1989). Davidson (1996) define a los antimicrobianos, como compuestos químicos añadidos o presentes en alimentos que retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y por tanto, retardan el deterioro de la calidad y garantizan la inocuidad del alimento en el cuál se encuentran. Los antimicrobianos utilizados en alimentos actúan principalmente inhibiendo y/o disminuyendo el crecimiento de los microorganismos, aunque algunos pueden también inactivarlos (Gould, 1996).

### **1.1 Tecnología de obstáculos**

La tecnología de obstáculos es la combinación de factores de conservación que interaccionan aditiva o sinérgicamente controlando la población microbiana en los alimentos. Permite la formulación de alimentos “mínimamente procesados” de características similares a las del producto fresco, con menos aditivos y listos para preparar y servir, satisfaciendo las demandas actuales del consumidor (Alzamora, 1997).

El efecto de los factores es de fundamental importancia para la conservación de alimentos ya que éstos controlan el deterioro microbiológico, las intoxicaciones e infecciones relacionadas con el consumo de alimentos y procesos no deseados como la fermentación en productos estables (Leistner, 1995).

La conservación de alimentos mediante la tecnología de obstáculos está basada en inhibir el desarrollo microbiano y en retardar o evitar las reacciones deteriorativas de alimentos mediante la combinación de distintos factores de estrés: actividad de agua, pH, potencial redox, temperatura, incorporación de conservadores químicos, escaldado, etc. (Leistner, 1995); los que por sí solos necesitan ser aplicados a niveles extremos por lo que provocarían una alteración de las características físicas, químicas y/o sensoriales del alimento. La combinación inteligente de estos factores puede asegurar la estabilidad

microbiana del alimento y al mismo tiempo mejorar las propiedades sensoriales, nutritivas y económicas del producto (Argaiz et al, 1995).

## 1.2 Agentes Antimicrobianos

Un amplio rango de sistemas antimicrobianos naturales están siendo estudiados a partir de microorganismos, plantas y animales. Algunos de ellos se pueden observar en la tabla 1.1.

El azúcar, la sal y el humo de madera son clasificados como antimicrobianos tradicionales que se utilizan frecuentemente en alimentos procesados (Sofos y Busta, 1992). La sal (cloruro de sodio) añadida como saborizante o utilizada en la conservación de alimentos seco-salados, así como algunos azúcares presentes en forma natural en los alimentos ejercen una acción antimicrobiana dada la reducción en la actividad de agua del alimento en el cual se encuentran. El ahumado es otra práctica de conservación de alimentos ancestral, en donde se incorporan agentes con actividad antimicrobiana como algunos compuestos fenólicos, formaldehído y ácido acético (Jay, 1991).

Tabla 1.1 Sistemas antimicrobianos naturales de uso en alimentos.\*

Fuente	Sistema	Aplicaciones
Microbiana	Bacteriocinas	Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> y patógenos en alimentos.
	Acidos orgánicos	Inhibición de mohos y levaduras
	Antibióticos	Diversos efectos dependiendo del tipo de antibiótico y tipo de

		microorganismo.
Animal	Lisozima	Inhibición de bacterias en queso
	Lactoferrina	Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche.
	Lactoperoxidasa	Preservación de leche sin procesar. Preservación de quesocottage. Inhibición de <i>Salmonella</i> en fórmulas lácteas infantiles. Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> in vitro y en quesos frescos. Inhibición de <i>Campylobacter</i> in vitro.
Vegetales	Aceites esenciales	Estudios de inhibición de bacterias y levaduras.
	Puré de plátano	Inhibición de bacterias formadoras de esporas.
	Extracto de ajo	Inhibición de <i>Candida albicans</i>
	Aceitunas	Inhibición de la germinación de esporas de <i>Bacillus cereus</i> .

\*Adaptada de Board y Gould (1991)

Muchos de los agentes antimicrobianos producidos actualmente en forma sintética, se encuentran también en forma natural como componentes de ciertos alimentos. Estos compuestos químicos con acción antimicrobiana pueden clasificarse como aditivos tradicionales con acción directa o indirecta. Aditivos antimicrobianos con acción directa aprobados para ser utilizados en alimentos incluyen a los ácidos orgánicos y sus derivados, ésteres, gases, nitritos, nitratos y antimicrobianos diversos. Los agentes antimicrobianos con acción indirecta son sustancias químicas añadidas con otros objetivos diferentes a la acción antimicrobiana, por ejemplo: fosfatos, antioxidantes fenólicos o EDTA (Davidson y Branen, 1993; Sofos y Busta, 1992).

Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente reconocidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los E.U.A. son (Jay 1991):

- Ácido propiónico y propionatos (mohos)

- Ácido sórbico y sorbatos (mohos)
- Ácido benzoico y benzoatos (mohos y levaduras)
- Parabenos (mohos y levaduras)
- SO<sub>2</sub> y sulfitos (mohos, levaduras y bacterias)
- Óxido de etileno y de propileno (mohos y levaduras)
- Diacetato de sodio (mohos)
- Nisina (bacterias ácido lácticas, Clostridia)
- Ácido dehidroacético (insectos)
- Nitrito de Sodio (Clostridia)
- Etil-formato (mohos y levaduras).

Los blancos o puntos de ataque de los antimicrobianos dentro de las células microbianas incluyen a la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético (Davidson y Branen, 1993). Eklund (1989) menciona que, en general, 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.

La selección de los antimicrobianos a emplear involucra una serie de factores que deben ser considerados y evaluados (Welbourn, 1994):

1. El tipo de organismo presente y su nivel. La mayoría de los antimicrobianos no son de amplio espectro, por lo tanto el antimicrobiano a usar debe corresponder al microorganismo presente. Generalmente, entre mayor sea el nivel de contaminación más grande es la cantidad de antimicrobiano necesario.
2. Las propiedades y composición del alimento. Particularmente el pH afectará al antimicrobiano.
3. Las propiedades del agente antimicrobiano. La estabilidad, actividad y características del antimicrobiano deben de mantenerse a lo largo de toda la cadena distributiva para que el alimento pueda llegar al consumidor en condiciones óptimas.

4. Las condiciones del proceso. Estas deben ser compatibles con el antimicrobiano utilizado. Los antimicrobianos deben permanecer inalterados durante toda la etapa del procesamiento del alimento.
5. Las condiciones y temperatura de almacenamiento. El antimicrobiano debe mantenerse estable durante la vida de anaquel.
6. Las buenas prácticas de manufactura. Un bajo y consistente nivel de contaminación es necesario para que un antimicrobiano sea efectivo.
7. Las combinaciones de los sistemas para lograr efectos sinérgicos. Los tecnólogos de alimentos necesitan buscar efectos sinérgicos entre el antimicrobiano y los demás ingredientes del alimento, tales como acidulantes, antioxidantes, etc. Un efecto sinérgico mejora el espectro de actividad en contra de los microorganismos.
8. El costo y seguridad. Se debe determinar si el costo del antimicrobiano es consistente con la protección y seguridad obtenida por su uso.
9. Verificación. Se debe incorporar el antimicrobiano al producto y hacer pruebas de su efectividad sobre tiempo y uso.
10. Regulaciones. Se debe determinar si el producto y todos sus ingredientes son apropiadamente utilizados de acuerdo a las regulaciones aplicables.

### **1.3 Especies, hierbas, extractos y aceites esenciales**

Entre los antimicrobianos naturales más estudiados se encuentran los presentes en plantas, hierbas y especias los cuáles se pueden observar en la tabla 1.2. La Asociación Americana del Comercio de las Especies (*American Spice Trade Association*) define a las especias como “cualquier producto de plantas seco y utilizado como condimento”, incluyendo semillas, hojas, corteza, flores y vegetales deshidratados. La FDA de los E.U.A. define a las especias de manera similar, sólo que no incluye a los vegetales deshidratados.

Se reconoce que los componentes activos en muchas plantas, hierbas y especias son compuestos fenólicos y aceites esenciales. De acuerdo con Shelef (1983), los compuestos fenólicos son probablemente los componentes

antimicrobianos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de las especias. En la tabla 1.3 se muestran algunos de los constituyentes de plantas que se han identificado como agentes antimicrobianos. En la figura 1.1 se muestran las estructuras químicas de algunos constituyentes de aceites y extractos de plantas que tienen acción antimicrobiana. Se ha reportado que algunos de éstos compuestos fenólicos tienen un amplio espectro de efectividad contra los microorganismos. Wilkins y Board (1989) reportaron que más de 1389 plantas son potencialmente fuentes de agentes antimicrobianos como es el caso del timol obtenido del tomillo y orégano, el aldehído cinámico de la canela y el eugenol de clavos de olor.

Tabla 1.2 Especias, hierbas y condimentos evaluados como posibles antimicrobianos.\*

Pimienta de jamaica (Allspice)	<i>Pimenta dioica</i>
Anis (Anise)	<i>Pimienta anisum</i>
Albahaca (Basil)	<i>Ocimum basilicum</i>
Laurel (Bay)	<i>Laurus nobilis</i>
Alcaravea (Caraway)	<i>Carum carvi</i>
Cardomomo (Cardamom)	<i>Elettaria cardamomum</i>
Semilla de apio (Celery seed)	<i>Apium graveolens</i>
Perifollo (Chervil)	<i>Anthriscus cerefolium</i>
Cebollinos (Chives)	<i>Allium schoenoprasum</i>
Cilantro (Coriander)	<i>Coriandum sativum</i>
Canela (Cinnamon)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
Clavo (Clove)	<i>Syzygium aromaticum</i>
Comino (Cumin)	<i>Cuminum cyminum</i>
Eneldo (Dill)	<i>Anethum graveolens</i>
Hinojo (Fennel)	<i>Foeniculum vulgare</i>
Ajo (Garlic)	<i>Allium sativum</i>
Jengibre (Ginger)	<i>Zingiber officinale</i>

Te-limón (Lemongrass)	<i>Cymbopogon citratos</i>
Macis (Mace)	<i>Myristica fragrans</i>
Mejorana (Marjoram)	<i>Origanum majorana</i>
Menta (Mint)	<i>Mentha vulgaris, M. spicata</i>
Mostaza (Mustard)	<i>Brassica hirta, B. juncea, B. nigra</i>
Nuez moscada (Nutmeg)	<i>Myristica fragrans</i>
Cebolla (Onion)	<i>Allium cepa</i>
Orégano (Oregano)	<i>Origanum vulgare</i>
Pimentón (Paprika)	<i>Capsicum Nahum</i>
Perejil (Parsley)	<i>Petroselinum crispum</i>
Pimienta (Pepper)	<i>Piper nigrum</i>
Pimienta de cayena (Red pepper)	<i>Capsicum frutescens</i>
Romero (Rosemary)	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Azafrán (Saffron)	<i>Crocus sativus</i>
Salvia (Sage)	<i>Salvia officinalis</i>
Ajedrea (Savory)	<i>Satureja hortensis</i>
Estragón (Tarragon)	<i>Artemisa dracunculus</i>
Tomillo (Thyme)	<i>Thymus vulgaris</i>
Cúrcuma (Turmeric)	<i>Curcuma longa</i>
Vainilla (Vanilla)	<i>Vanilla planifolia, V. pompona, V. tahilensis</i>

\*Adaptada de Lopez-Malo (1995)

Tabla 1.3 Constituyentes de extractos y aceites esenciales de plantas.\*

Compuesto	
Denominación usual	Otros nombres
Alicina	
Alil isotiocianato	alil isosulfocianato
Acetol	p-propenilanol, 1-metoxi-4-propenilbenceno
Carvacrol	2-hidroxi-p-cimeno, isotimol
Chavicol	p-alilfenol
Cíñelo	Eucaliptol
Aldehído cinámico	3-fenilpropenal
p-cimeno	isopropil-tolueno
Citral	3,7-dimetil-2-6 octadienal
Cuminal	Cuminaldehído, p-isopropil benzaldehído
Eugenol	4-alil-2-metoxifenol
Geraniol	3,7 dimetil-2,6-octadien-1-ol
Limoneno	
Linalol	3,7-dimetil-3-hidroxi 1,6-octadieno
Mentol	Hexahidrotimol
Pineno	2,6,6-trimetil biciclo(3.1.1.)-2-hepteno
Terpineol	a -terpineol
Timol	5-metil-2-isopropil-1-fenol



Vainillina	3-metoxi-4-hidroxibenzaldehido
------------	--------------------------------

\*Adaptada de Zaika (1988), Beuchat y Golden (1989), Nychas (1995), presentada en López -Malo (1995).

Figura 1.1. Estructura de algunos compuestos presentes en aceites esenciales y extractos de plantas, especias, hierbas y condimentos con actividad antimicrobiana.

#### **1.4 Acción de los antimicrobianos**

La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a la presencia de derivados fenólicos simples y complejos presentes en sus extractos y aceites esenciales, como es el caso del eugenol y el timol (Sofos, 1998). Las plantas contienen proteínas con membranas perturbadoras llamadas defensinas, las cuales las protegen de infecciones microbianas (Board y Gould, 1991). La acción inhibitoria de estas proteínas y péptidos antimicrobianos se debe al rompimiento de la membrana; sin embargo su modo de acción no es conocido (Brul et al., 1999).

Conner y Beuchat (1984) señalan que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, puede ser el resultado del daño a los sistemas enzimáticos de la célula, incluyendo aquellos asociados con la producción y síntesis de los compuestos estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas o con las proteínas de la membrana causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando de esta manera la actividad celular. Nychas (1995) indicó que los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar las enzimas responsables de la germinación de esporas o intervenir con los aminoácidos involucrados en la germinación. Prindle y Wrigth (1977) encontraron que el modo de acción de los compuestos fenólicos era dependiente de la concentración; a bajas concentraciones afectan la actividad enzimática relacionada con la producción de energía, mientras que

a altas concentraciones causan la precipitación de proteínas. Davidson (1993) señala que la relación exacta causa-efecto del modo de acción de los compuestos fenólicos no se ha determinado, pero que éstos deben de inactivar enzimas esenciales que reaccionan con la membrana celular o alteran la funcionalidad del material genético.

Juven et al. (1994), encontraron que el aumento en la concentración de aceite esencial de tomillo, timol y carvacrol no se reflejó en una relación directa con su efecto antimicrobiano. Sin embargo, 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 debe a que los compuestos fenólicos sensibilizan la membrana celular y cuando se saturan los sitios sobre los cuáles actúan se presenta un daño grave y un rápido colapso en la integridad de la membrana citoplasmática con la consecuente pérdida de los constituyentes del citoplasma.

Se ha reportado que el contenido de grasa, proteínas, sal, pH y temperatura del alimento afectan la actividad antimicrobiana de dichos compuestos (Nychas, 1995).

### **1.5 Evaluación de agentes antimicrobianos**

Los métodos utilizados para evaluar la actividad de antimicrobianos en alimentos pueden ser divididos en métodos *in vitro* y métodos aplicados (Davidson y Parish, 1989). Los métodos *in vitro* se subdividen en métodos de evaluación de punto final y métodos descriptivos.

En los métodos de evaluación del punto final, los resultados reflejan el poder inhibitorio del compuesto sólo por un tiempo específico; dentro de estos métodos se incluyen estudios de inoculación y reto microbiano. Existen al menos cuatro tipos de pruebas de evaluación de punto final (Davidson y Parish, 1989).

- Pruebas de difusión en agar. El antimicrobiano es aplicado al agar utilizando un disco de papel filtro impregnado. El compuesto se difunde a través del agar, estableciéndose un gradiente de concentración.
- Gradiente en placas. El agar fundido se vierte en cajas petri, dejando que solidifique inclinado. Se vierte una segunda capa de agar que contenga el antimicrobiano. El resultado es una caja con un gradiente de concentración.
- Pruebas para desinfectantes. El coeficiente de fenol se obtiene por determinación del recíproco de la dilución del compuesto capaz de matar al microorganismo en 10 minutos; éste es dividido por el recíproco de la concentración de fenol con la misma actividad.
- Pruebas de dilución en caldo o en agar. El objetivo es generar una sola estadística para describir la inhibición del microorganismo a un tiempo determinado de incubación. La medida de la inhibición a un determinado tiempo se conoce como concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI se define como la mínima concentración a la cual no hay crecimiento en un medio nutritivo bajo condiciones específicas (Barry, 1976).

Los métodos descriptivos son aquellos en los que los microorganismos se someten a un reto microbiano y se hace un muestreo periódicamente para determinar cambios en el número de células viables en función del tiempo (Davidson y Parish, 1989).

## **1.6 Mezcla de agentes antimicrobianos**

Las mezclas de antimicrobianos en la industria alimentaria se utilizan con gran frecuencia, sin embargo la forma en que estos interactúan para proveer el efecto en contra de los microorganismos no ha quedado claramente elucidada. Cuando dos antimicrobianos se usan en combinación pueden ocurrir tres efectos:

- Efecto aditivo. En el cuál el efecto combinado es igual a la suma de los efectos observados con los dos agentes probados separadamente o es igual al efecto del agente más activo en la mezcla (Barry, 1976). Los efectos aditivos ocurren cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no mejora ni se reduce en presencia de otro agente.
- Efecto sinérgico. En el cuál el efecto observado en combinación es mayor a la suma de los efectos observados con los dos agentes de manera independiente (Barry, 1976). Hay una mejor actividad antimicrobiana.
- Efecto antagónico. Esto ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto se reduce en la presencia del segundo agente.

La evaluación de la combinación de agentes antimicrobianos es necesaria debido a que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un solo antimicrobiano, pero al ser expuesto a una combinación de agentes se puede aumentar su actividad antimicrobiana (Eliopoulos y Mollering, 1991).

Existen además varias razones que llevan a la combinación de antimicrobianos para la inhibición de microorganismos, por ejemplo (Eliopoulos y Mollering, 1991):

1. La probabilidad de que algunas colonias se vuelvan resistentes a algunos antimicrobianos.
2. Algunos agentes sólo se pueden utilizar hasta ciertas concentraciones límites debido a regulaciones existentes y a que pueden causar toxicidad si se utilizan por arriba de dichas concentraciones.
3. La presencia de sinergismo entre agentes.

Los métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes mezclas de agentes sobre el crecimiento microbiano, en su mayoría están basados en el diseño tipo tablero de ajedrez (León, 2002). Las concentraciones evaluadas por lo general se encuentran de 4-5 diluciones por

debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), la CMI y el doble de la CMI (Eliopoulos y Mollering, 1991).

La interpretación de resultados en la evaluación de dos o más agentes antimicrobianos se basa principalmente en el cálculo de las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) y en el cálculo del índice CFI (Davidson y Parrish, 1989):

$$\text{CFI A} = (\text{CMI de A en presencia de B}) / (\text{CMI de A individualmente})$$
$$\text{CFI B} = (\text{CMI de B en presencia de A}) / (\text{CMI de B individualmente})$$
$$\text{Índice CFI} = \text{CFI A} + \text{CFI B}$$

A partir del valor del índice CFI se puede determinar si la mezcla es aditiva, antagónica o sinérgica. Una mezcla es aditiva si el valor del índice CFI es igual a la unidad, antagónica si es  $>1$  y sinérgica si es  $< 1$ . Estas mismas fórmulas y criterios se pueden aplicar a mezclas de 3 o más antimicrobianos (Berenbaum, 1978).

Los isobogramas también son utilizados para definir si existe actividad aditiva, antagónica o sinérgica. En un isobograma se grafican el CFI del agente A contra el agente B, como se muestra en la Figura 1.2. La línea recta representa aditividad entre los antimicrobianos. La mezcla es sinérgica si el isobograma es cóncavo (por debajo de la línea de aditividad) y es antagónico si es convexo (por arriba de la línea de aditividad) Este criterio se aplica en mezclas de 2 o más agentes (Berenbaum, 1978).

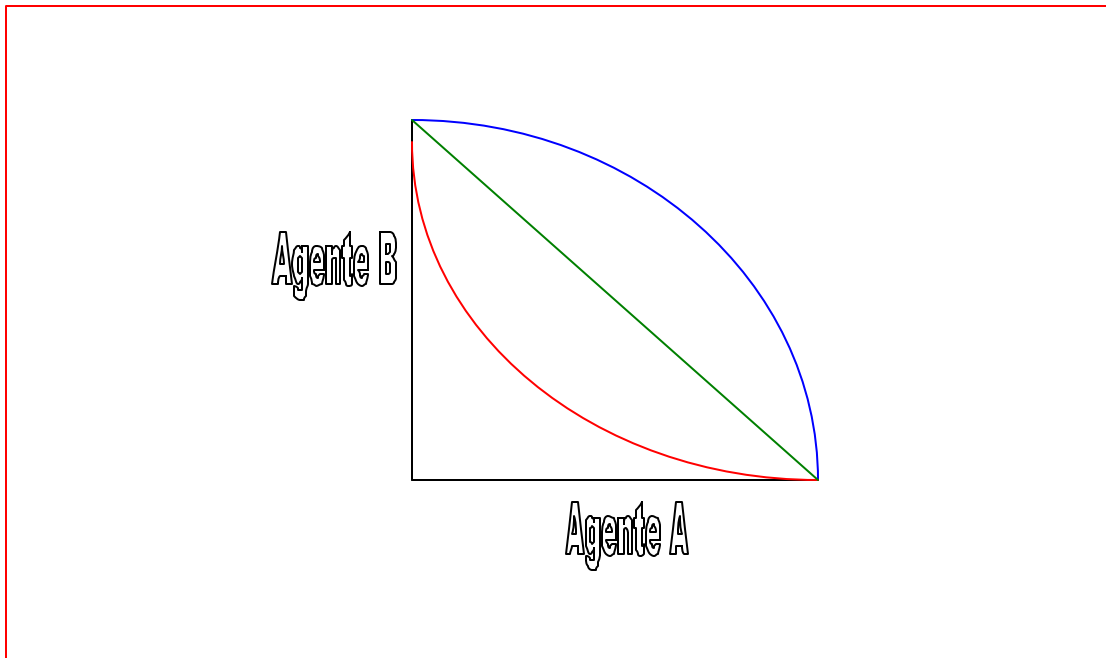


Figura 1.2 Isobolograma de la mezcla de dos antimicrobianos  
 (----- efecto aditivo, ---- efecto antagónico, -.-.- efecto sinérgico)

A pesar de que no hay suficiente información sobre el efecto combinado de antimicrobianos naturales en alimentos, Santiesteban (2002) señala que los agentes antimicrobianos más efectivos contra *S. aureus*, *L. innocua*, *E. coli* y *S. typhimurium* en medios de cultivo sólidos son carvacrol, timol y eugenol en un intervalo de 100 a 3000 ppm; así como las mezclas binarias sorbato de potasio-carvacrol y sorbato de potasio –timol. De la misma manera, León (2002), señala que la mezcla ternaria más efectiva sobre la inhibición de *S. aureus* y *E. coli* en medios de cultivo sólido es sorbato de potasio-carvacrol-timol. Finalmente, Berenbaum et al. (1983) señala que lo más importante al evaluar mezclas de agentes es determinar si la combinación es sinérgica o no, y si el valor de CMI es menor o igual a las concentraciones límites de toxicidad. Por lo que el propósito de este trabajo es desarrollar estudios de esta índole en medio líquido determinando las mezclas sinérgicas y los valores de CMI para cada una de las bacterias en cuestión.