



TENDENCIAS EN LA CIENCIA DE ALIMENTOS

TEMAS SELECTOS

*Editores: María Teresa Jiménez Munguía, Fidel Vergara Balderas,
Emma Mani López y María Eugenia Bárcenas Pozos*

María Eugenia Bárcenas Pozos
Silvia del Carmen Beristain Bauza
Alfredo Salvador Castro Díaz
Avelina Franco Vega
José Ángel Guerrero Beltrán
Luis Ricardo Hernández
María Teresa Jiménez Munguía
Zaida Nelly Juárez
Alma Remedios Juárez Roldán
Aurelio López-Malo Vigil

Mauro Luna Fernández
Carlos Enrique Ochoa Velasco
Enrique Palou García
Hilda Areli Peredo Luna
María Armida Patricia Porras Loaiza
Nelly Ramírez Corona
Carolina Ramírez López
Manuel Octavio Ramírez Sucre
Fatima Reyes Jurado
Jorge Fernando Vélez Ruíz

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA
[ESCUELA DE INGENIERÍA]

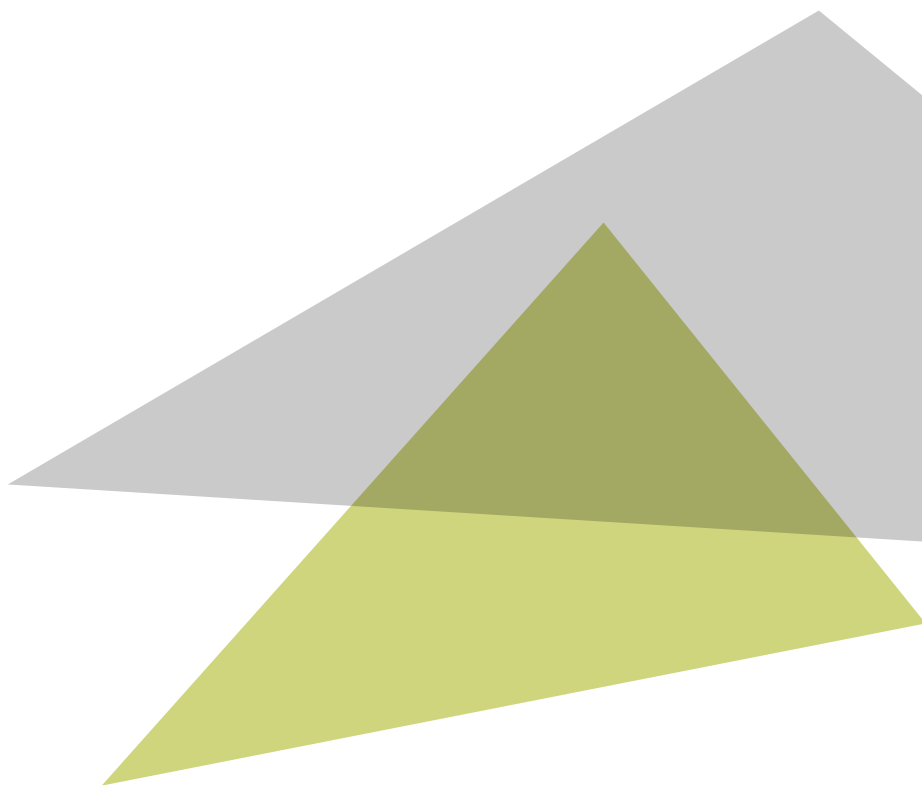
**COLECCIÓN
SAPIENTIA UDLAP**



[ESCUELA DE INGENIERÍA]

TENDENCIAS EN LA CIENCIA DE ALIMENTOS

TEMAS SELECTOS





TENDENCIAS EN LA CIENCIA DE ALIMENTOS

TEMAS SELECTOS



María Teresa Jiménez Munguía
Fidel Vergara Balderas
Emma Mani López
María Eugenia Bárcenas Pozos
Editores

Autores

María Eugenia Bárcenas Pozos
Silvia del Carmen Beristain Bauza
Alfredo Salvador Castro Díaz
Avelina Franco Vega
José Ángel Guerrero Beltrán
Luis Ricardo Hernández
María Teresa Jiménez Munguía
Zaida Nelly Juárez
Alma Remedios Juárez Roldán
Aurelio López-Malo Vigil
Mauro Luna Fernández
Carlos Enrique Ochoa Velasco
Enrique Palou García
Hilda Areli Peredo Luna
María Armida Patricia Porras Loaiza
Nelly Ramírez Corona
Carolina Ramírez López
Manuel Octavio Ramírez Sucre
Fátima Reyes Jurado
Jorge Fernando Vélez Ruíz

D.R. © 2019 Fundación Universidad de las Américas, Puebla
Ex hacienda Santa Catarina Mártir, 72810
San Andrés Cholula, Puebla, México.
Tel.: +52 222 229 20 00 • www.udlap.mx • editorial.udlap@udlap.mx

Primera edición: octubre de 2017
Primera edición electrónica: diciembre de 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total, por cualquier medio, del contenido de la presente obra, sin contar con autorización por escrito del titular de los derechos de autor. El contenido de este libro, así como su estilo y las opiniones expresadas en él son responsabilidad de los autores y no necesariamente reflejan la opinión de la UDLAP.

Impreso en México.

DIRECTORIO UDLAP

Luis Ernesto Derbez Bautista

Rector

Cecilia Anaya Berrios

Vicerrectora académica

Martín Alejandro Serrano Meneses

Decano de Investigación y Posgrado

Luis Ricardo Hernández Molina

Director de Investigación y Posgrado

René Alejandro Lara Díaz

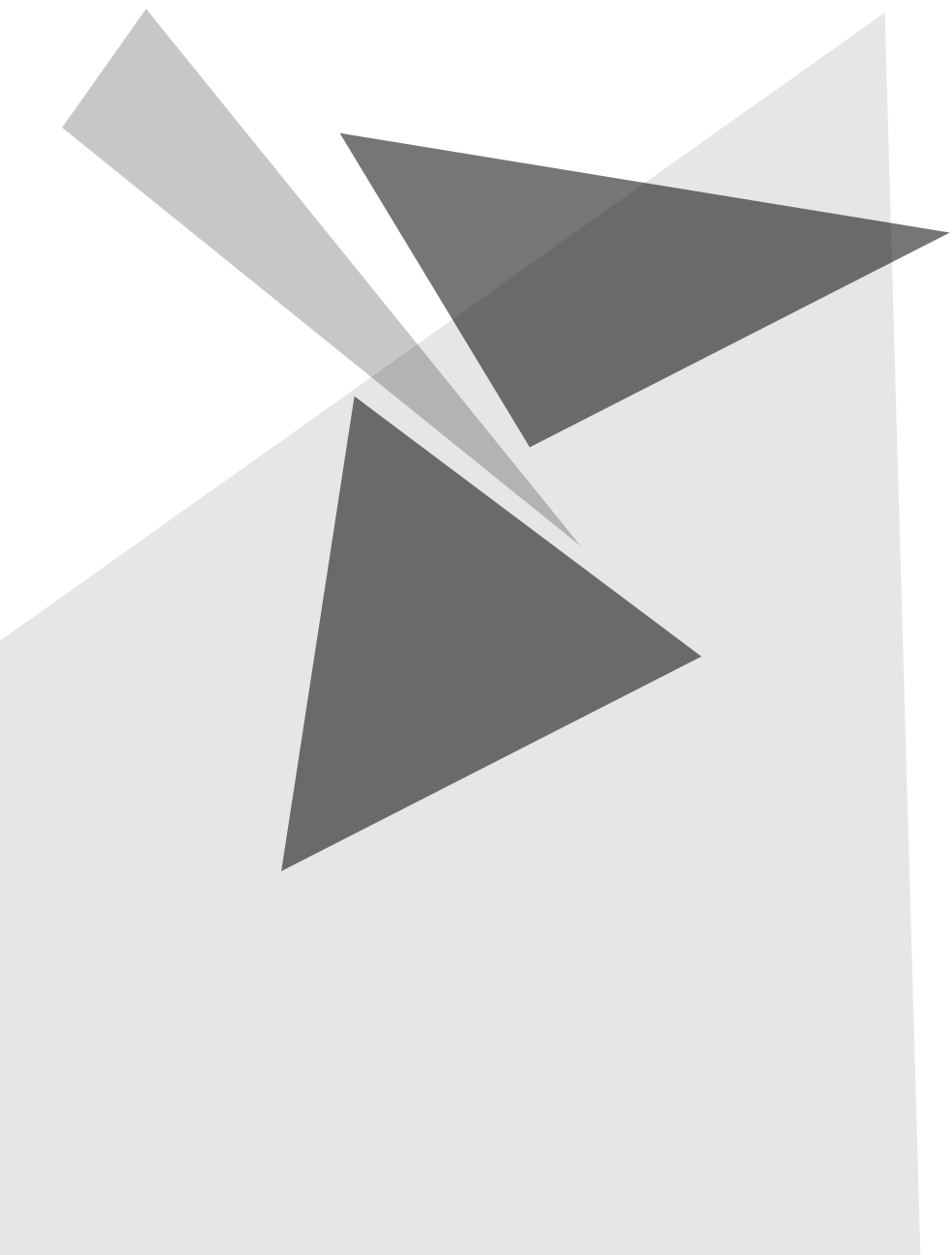
Decano de la Escuela de Ingeniería

Mayra Ortiz Prida

Directora general de la Oficina de Rectoría

Izraim Marrufo Fernández

Director de Comunicación



Índice

Prólogo / 11

Parte I. Fundamentos de tendencias actuales en ciencia de alimentos

1 Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos / 17

A. P. Porras-Loaiza y A. López-Malo

2 Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales / 39

F. Reyes-Jurado, E. Palou y A. López-Malo

3 Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos / 63

S. C. Beristain-Bauza, E. Palou y A. López-Malo

4 Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados / 87

A. R. Juárez-Roldán y M. T. Jiménez-Munguía

5 Mecanismos de inestabilidad y métodos de estabilización de emulsiones múltiples / 105

H. A. Peredo-Luna y M. T. Jiménez-Munguía

6 Líquidos iónicos: una alternativa «verde» para procesos de extracción en la industria de alimentos / 121

A. Franco-Vega, E. Palou, N. Ramírez-Corona, A. López-Malo

Parte II. Revisión de la transformación, conservación y calidad de algunos alimentos

7 La tuna: una perspectiva de su producción, propiedades y métodos de conservación / 149

C. E. Ochoa-Velasco y J. A. Guerrero-Beltrán

8 El agave y sus productos / 173

A. S. Castro-Díaz y J. A. Guerrero-Beltrán

9 El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento / 191

Z. N. Juárez, M. E. Bárcenas-Pozos y L. R. Hernández

10 Envejecimiento del pan: causas y soluciones / 221

M. Luna-Fernández y M. E. Bárcenas-Pozos

11 Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad / 243

C. Ramírez-López, J. F. Vélez-Ruiz

12 Efecto de la incorporación de estabilizantes en la viscosidad de bebidas lácteas no fermentadas / 273

M. O. Ramírez-Sucre y J. F. Vélez-Ruiz

Reseña biográfica / 289

PRÓLOGO

Desde el 2007, como parte de las actividades académicas de los programas de Posgrado en Ciencia de Alimentos, ofrecidos por el Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental de la Universidad de las Américas Puebla, se ha venido publicando la revista *TSIA: Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

Tomando como base el material publicado en la mencionada revista, surge el presente libro, *Tendencias en la ciencia de alimentos: Temas selectos*, el cual consta de una compilación de contribuciones, tanto de revisión bibliográfica, como de investigación científica. Se incluyen temas diversos que no necesariamente presentan una secuencia o una relación entre sí, pues se trata de un libro de «avances» en la disciplina, con el propósito de contribuir a la difusión de conocimientos actualizados para especialistas en la ciencia de alimentos.

Se abordan tópicos diferentes: algunos tienen que ver con alimentos específicos, sus características, transformación y conservación; en otros casos se abordan temas sobre componentes de los alimentos que han despertado interés por sus posibles efectos benéficos en la salud del consumidor, o bien, por su capacidad de inhibir el desarrollo microbiano, ayudando a lograr tanto la conservación de un alimento, como su inocuidad; también se abordan temas sobre técnicas usadas en el procesamiento de alimentos. En todos los casos se ha buscado incluir información científica completa y actualizada, con el respaldo de una amplia bibliografía.

Hago un reconocimiento al trabajo profesional desarrollado por cada uno de los autores de los trabajos incluidos, el contar con su visión y conocimientos ha sido de mucha ayuda para poder generar esta obra. También es importante resaltar el meticuloso trabajo de las editoras y editores, el cual ha sido decisivo para que este libro sea una realidad. Finalmente, se agradece el apoyo de la Universidad de las Américas Puebla, que a través del Decanato de Investigación y Posgrado, así como de la Editorial UDLAP ha hecho posible la publicación de este libro.

FIDEL TOMÁS VERGARA BALDERAS
Departamento de Ingeniería Química y Alimentos
Universidad de las Américas Puebla



Parte I

**Fundamentos de tendencias
actuales en ciencia de
alimentos**



Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos

A. P. Porras-Loaiza y A. López-Malo

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 Nazk, 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 da Jaramillo *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 del presente es mostrar una breve revisión sobre los compuestos fenólicos, su estructura química, clasificación, funciones e importancia, para conocer de manera específica sus propiedades.

1.1 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 (figura 1.1); estas sustancias son esenciales para el crecimiento y la reproducción de plantas. 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 Naczk, 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).

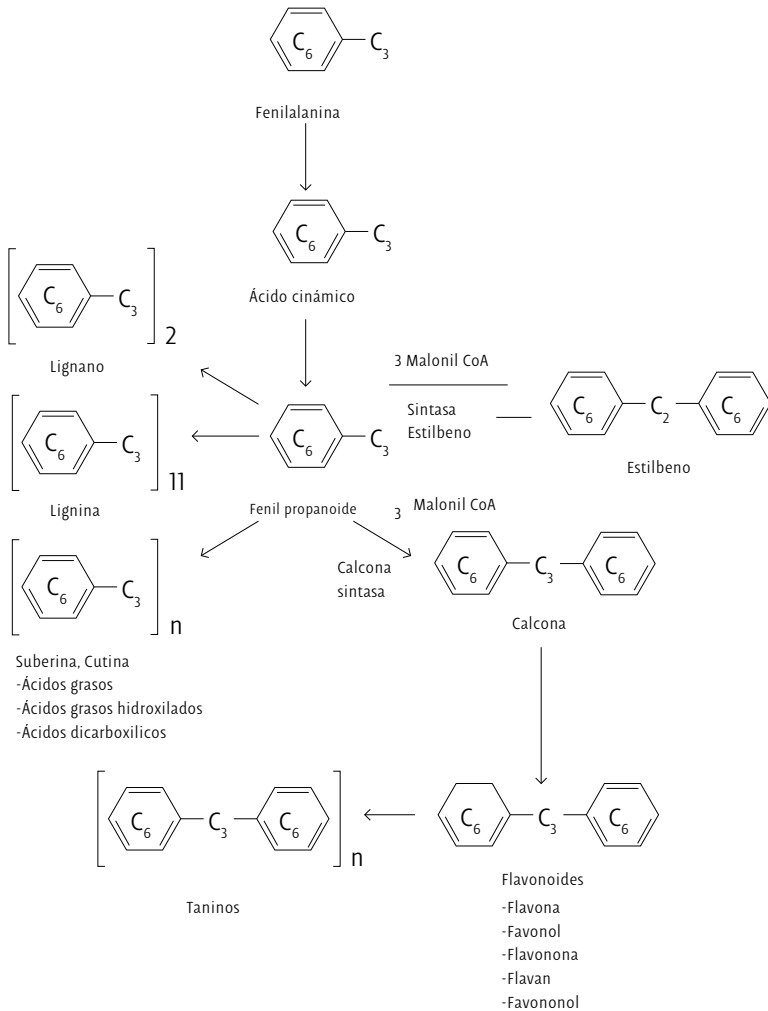


Figura 11

Producción de fenilpropanoides, estilbenos, ligninas, suberinas, cutinas, flaconoides y taninos de la fenilalanina

Adaptado de Shahidi y Naczki, 2004.

1.2 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 (Martínez *et al.*, 2000).

Los ácidos fenólicos presentan generalmente actividad antioxidante en frutas, verduras y otras plantas (Zheng y Wang, 2001). En la tabla 1.1, se muestran algunos de los ácidos fenólicos de interés en alimentos, con sus respectivos radicales.

Tabla 1.1 Radicales de algunos ácidos fenólicos

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

Shahidi y Nacz, 2004.

1.3 ÁCIDOS CINÁMICOS, CUMARINAS E ISOCUMARINAS

Los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general, están presentes en forma de derivados. 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).

1.4 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).

1.5 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 elagitánicos respectivamente (Chung *et al.*, 1998). Los taninos condensados también llamados proantocianidinas constan de unidades monoméri-

cas de flavanos ligados por medio de carbono-carbono y uniones éter. Se han identificado quince subclases de proantocianidinas, sin embargo, sólo tres tienen, hasta el momento, importancia en alimentos de origen vegetal para humanos; procianidinas (catecina y sus polímeros), prodelfinidinas (galocatecina 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 $4 \rightarrow 6$ o $4 \rightarrow 8$ 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, 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 tés 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 o 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).

1.6 FLAVONOIDES

En la figura 1.2 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 figura 1.3. Para los flavonoides, este puente

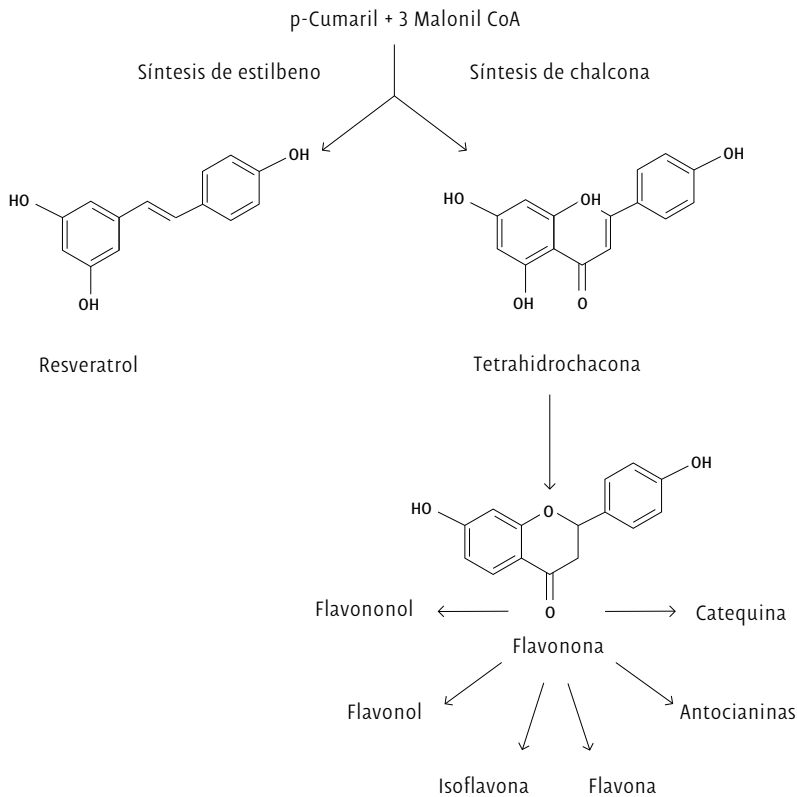


Figura 1.2

Producción de flavonoides y estilbenos a partir de fenilpropanoides

Adaptado de Shahidi y Naczki, 2004.

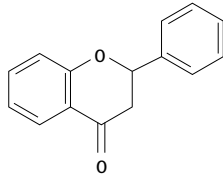
consta de tres carbonos que se combinan con un oxígeno y dos carbonos de uno de los anillos aromáticos (anillo A) para formar un tercer anillo de 6-miembros (anillo C). Los flavonoides se dividen, a su vez, en subclases basadas en la conexión del anillo B al anillo C, así como en el estado de oxidación y en los grupos funcionales del anillo C, como se muestra en la figura 1.4 (Shah di y Naczk, 2004).

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

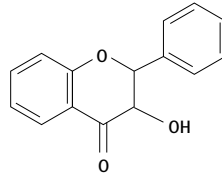
1. Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3: a) flavonas: con H en la posición 3 y b) flavonoles: con OH en la posición 3.
2. Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3: a) flavononas: con H en la posición 3 y b) flavonololes: con OH en la posición 3.
3. Chalconas: con el anillo Cabierto.
4. Isoflavonoides: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

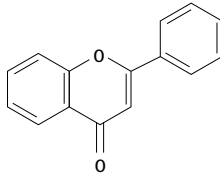
En la tabla 1.2 se presenta el contenido en flavonoides y taninos de algunos alimentos. En general estos datos muestran que una porción de frutas de manzanas o arándanos, de chocolate negro y de vino rojo tienen un contenido, de moderado alto, en flavonoides y/o taninos. Sin embargo, una porción de brócoli o de zumo de naranja proporciona bajas concentraciones de estos fitonutrientes (Sarría, 2005).



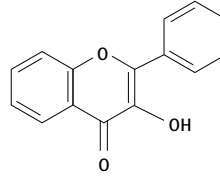
Flavonona



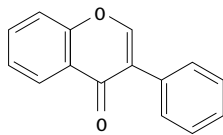
Flaconol



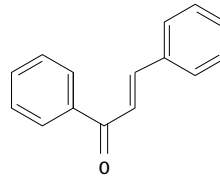
Flavona



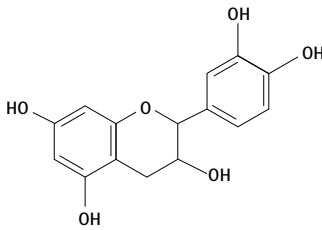
Flavonol



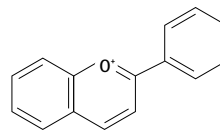
Isoflavona



Chalcona



Catequina



Antocianinas

Figura 13

Estructuras químicas de diversos compuestos C6-C3-C6 encontrados en alimentos y nutraceuticos

Adaptado de Shahidi y Naczk, 2004.

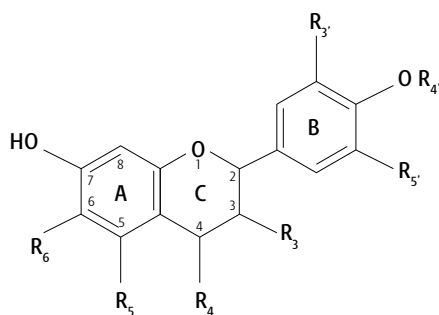


Figura 1.4

Estructura general y numeración de los flavonoides de alimentos

Adaptado de Shahidi y Nacz, 2004.

Tabla 1.2 Flavonoides y taninos contenidos en algunos alimentos (mg/ porción)

Alimento	Proantocianidinas	Antocianidinas	Flavan-3-oles	Flavanoles	Flavanonas	Tearubiginas
Arándano	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	-	-

Adaptado de Sarria, 2005.

1.7 COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN VEGETALES

Hay un gran interés en conocer el potencial antioxidante de las plantas con compuestos fenólicos como los flavonoides y cómo 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 hidroxicinámicos y sus derivados son responsables del sabor amargo de los 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 procesado 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).

1.8 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, han 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 dímérico 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 tés, 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).

1.9 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 que 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 80 g 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 centrado 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 vanílico, homovanílico, e isoferúlico, así como los ácidos propiónicos 3-(3-metoxi-4-hidroxifenil), 3-(3-hidroxifenil), y el ácido 3-hidroxihipúrico, 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).

1.10 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 1.3, entre los cuales están la superóxido dismutasa, las catalasas y la glutatión 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.*, 2003).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debida a sus propiedades redox, las cuales juegan un papel importante en la ab-

Tabla 1.3 Clasificación de antioxidantes exógenos y endógenos

Antioxidantes exógenos	Antioxidantes endógenos
Ácido-ascórbico	Glutati6n
Alfa-tocoferol	CoenzimaQ
Beta-caroteno, carotenos, luteína, licopeno y zeaxantina	Proteínas: ceutoplasmina, lactofemina, transferrina y ferritina.
Flavonoides	Bilirrubina
Cofactores enzimáticos	Uratos
Minerales	Enzimas
Selenio, cobre, zinc, hierro, manganeso	Glutati6n
	Glutati6n reductasa
	Glutati6n transferasa
	GLutati6n proxidasa
	Super6xido dismutasa

Posada *et al.*, 2003.

sorci6n y neutralizaci6n de radicales libres y en la descomposici6n de per6xidos. Existen dos tipos de antioxidantes, los naturales y los sint6ticos. La desventaja de los 6ltimos son las caracteristicas carcin6genas atribuidas. La relaci6n entre los contenidos fen6licos y la actividad antioxidante en las hierbas medicinales tuvo una correlaci6n lineal positiva; el resultado fue el mismo para las hierbas culinarias, en especial para los tres tipos de or6gano (*P. longiflora*, *Origanum Majoricum* y *O. vulgare ssp*). Sin embargo, 6stas presentaron mayor composici6n de grupos fen6licos y actividad antioxidante. Los resultados muestran que los componentes fen6licos presentes en las hierbas tienen una mayor capacidad antioxidante (Zheng y Wang, 2001).

Para comprender mejor la actividad fisiol6gica de los fen6licos, se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante varía en funci6n 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 científcos en los que se valora la actividad antioxidante, ya sea de compuestos puros o de ex-

tractos vegetales, se utiliza el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7S-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).

1.11 COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU RELACIÓN CON DIVERSAS PATOLOGÍAS

Las hierbas medicinales en las que se ha encontrado mayor contenido de compuestos fenólicos son *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; de 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 Dusing, 2003).

Los polifenoles pueden interferir en 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. Las actividades 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 proinflamatorios. 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 radica en que beneficiará a la población debido a los antioxidantes que poseen los grupos fenólicos. Con base en 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.

CONCLUSIONES

Las investigaciones científicas reportan una gran variedad de compuestos fenólicos disponibles en el reino vegetal, así como la 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 anti-cancer 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* (169-172). Aberdeen. Escocia.
- Jiang, F. y Disting, 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. En línea. Obtenido desde: 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., Spiegelhalder, 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. En línea. Obtenido desde: http://chocolatecorona.com.co/docs/libro_antioxidntes.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.
- Sarria, C. A. (2005). «Flavonoides: compuestos bioactivos de los alimentos». *Boletín Pediátrico de la Sociedad Aragonesa*, 34, 88-92.
- Shahidi, F. y Naczki, M. (1995). *Food phenolics sources, chemistry, effects, applications*. EE.UU.: Technomic Publishing Co.
- Shahidi, F. y Naczki, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. Londres: CRC Press.
- Zheng, W. y Wang, S.Y. (2001). «Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs». *Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.



Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales

F. Reyes-Jurado, E. Palou y A. López-Malo

La conservación de alimentos ha sido utilizada desde hace varios siglos con el fin de preservar diversos productos. Actualmente, la demanda por alimentos naturales, seguros y de buena calidad, ha conducido a estudiar nuevas tecnologías, las cuales garanticen la inocuidad de los alimentos. Por un lado, las tecnologías emergentes como las altas presiones, pulsos eléctricos, o ultrasonido de baja frecuencia, están siendo estudiadas con el objetivo de inactivar microorganismos (Leistner, 2000). Por otro lado, los agentes antimicrobianos tienen como principal objetivo inhibir a los microorganismos presentes en el alimento por medio del control en los procesos naturales del deterioro de los alimentos, para poder así prevenir y controlar el crecimiento de microorganismos patógenos y aquellos causantes del deterioro (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Actualmente se sabe que los aceites esenciales derivados de plantas aromáticas y algunas especias han mostrado tener efecto antimicrobiano sobre levaduras, mohos y bacterias, con la ventaja de que su extracción, en algunos casos, no daña al medio ambiente (Adam *et al.*, 2009).

Por otra parte, dado que los aceites esenciales tienen un uso potencial en alimentos, especialmente en frutas y vegetales frescos, pueden llegar a convertirse en una alternativa para reducir o suplir a los agentes antimicrobianos tradicionales (Fisher y Phillips, 2008). Sin embargo, tanto los métodos de evaluación, como los mecanismos por los cuales actúan no se han definido del todo (Burt, 2004, Tajkarimi *et al.*, 2010); esto repercute en su éxito al utilizarlos como agentes antimicrobianos.

crobianos, debido a la dificultad para comparar los resultados de diferentes investigaciones (López-Malo *et al.* 2005).

Debido a esto, hay un esfuerzo cada vez mayor por estandarizar métodos rápidos, fiables y reproducibles que determinen el efecto que ejercen los aceites esenciales en su fase vapor y por contacto directo sobre el crecimiento microbiano. Además, nuevas técnicas para muestrear y determinar sus componentes químicos han empezado a emplearse, con lo que será posible identificar a los componentes mayoritarios y, por lo tanto, relacionarlos con la acción antimicrobiana (Rizzolo *et al.*, 2007).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica de los métodos mayormente utilizados para determinar la composición química y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

2.1 ACEITES ESENCIALES COMO ANTIMICROBIANOS

Los aceites esenciales (AE) son líquidos viscosos semivolátiles, obtenidos de material vegetal como hierbas, flores, hojas, semillas, ramas, y cortezas, entre otros (Burt, 2004). Antiguamente, los AE se habían estudiado sólo desde el punto de vista aromático y como saborizantes. Sin embargo, en años recientes, los AE y sus componentes químicos han ganado un creciente interés debido a su posible uso como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Sacchetti *et al.*, 2005).

Si bien las propiedades antimicrobianas de los AE han sido reconocidas durante años, actualmente, y debido a la gran demanda, y a los cambios de legislación por alimentos seguros y de buena calidad, los AE parecen ser una alternativa natural para la conservación de alimentos (Fisher y Phillips, 2008); además de que muchos de ellos ya han sido reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA (Turek y Stintzing, 2013).

La mayoría de los estudios, actualmente, han encontrado que los AE son efectivos, tanto en su fase vapor, como por contacto directo contra numerosas bacterias patógenas, Gram-negativas y Gram-positi-

vas, así como contra mohos, levaduras (López *et al.*, 2005) e incluso algunos mohos productores de micotoxinas (da Cruz-Cabral *et al.*, 2013). En la misma línea, recientes investigaciones han reportado que dichas propiedades se deben principalmente a los compuestos químicos presentes en los AE, siendo los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos los posibles responsables de las propiedades aromáticas, antioxidantes y antimicrobianas de los AE (Kalemba y Kunicka, 2003).

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a uno específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas partes de la célula microbiana.

Es por esto que diversos investigadores mencionan que la actividad antimicrobiana depende principalmente de tres características: el carácter hidrófilo o hidrófobo del AE, los componentes químicos presentes y el tipo de microorganismo al que debe atacar (Kalemba y Kunicka, 2003; Holley y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008; Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2012). El carácter del AE podría indicar si éste tiene la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la membrana celular del microorganismo, lo que conduce a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndola más permeable, terminando en ruptura o fuga del material del citoplasma, lisis celular y, por ende, en la muerte del microorganismo. Con respecto a los componentes químicos presentes, éstos pueden actuar como agentes que interfieren con la translocación de protones y la fosforilación del ATP (Holley y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008). Conforme al tipo de microorganismo que debe atacar, Tajkarimi *et al.* (2010) mencionan que las bacterias Gram-negativas son generalmente menos sensibles a los AE debido a los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa, lo que restringe la difusión de compuestos hidrófobos; no obstante, esto no significa que las bacterias Gram-positivas sean siempre más susceptibles. Fisher y Phillips (2008) afirman que en las bacterias Gram-negativas sólo hay un retardo del efecto, por lo que para alcanzar el mismo efecto letal en ambos tipos de bacterias se requeriría de un mayor tiempo de exposición a los AE.

Como se mencionó anteriormente, existe una relación directa entre los componentes químicos presentes y la efectividad de los AE. Esto supone que la presencia de un componente mayoritario de un AE, tanto en una atmósfera controlada como en un alimento, es la principal responsable de la acción antimicrobiana del AE.

2.2 MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Ni los mecanismos de acción, ni los métodos para determinar la actividad antimicrobiana que tienen los AE, se han definido del todo. En consecuencia, existen diferentes métodos que incluyen las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), la eficacia antimicrobiana y la evaluación de espectro antimicrobiano, entre otros. La tabla 2.1 muestra estudios realizados con los métodos más utilizados en los últimos años, a fin de determinar las CMI y, por lo tanto, la actividad antimicrobiana de los AE.

La mayoría de los métodos *in vitro* consisten en añadir un volumen conocido del AE diluido (principalmente en etanol o metanol) o no, directamente en un tubo o caja Petri que contenga el medio adecuado para el microorganismo en prueba, o bien tener el medio estéril y después inocular el microorganismo de interés (López *et al.*, 2005).

El problema de utilizar un método u otro es la dificultad para comparar los resultados de diferentes investigaciones, lo cual, a menudo hace difícil determinar el éxito potencial de los AE como agentes antimicrobianos en un alimento (López-Malo *et al.*, 2005). Debido a la insolubilidad en agua y volatilidad de los AE, su evaluación es compleja, ya que sus propiedades pueden reducir la capacidad de dilución o causar separación de fases en los medios en los que se requiere evaluar. Además, periodos muy largos de incubación pueden dar lugar a la evaporación o descomposición de algunos de los componentes químicos presentes en el AE durante su evaluación (Kalemba y Kunicka, 2003). Por otra parte, la efectividad de cada método puede ser afectada por

Tabla 2.1. Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales realizados con los diferentes métodos

Metódo utilizado	Aceite esencial	Nombre científico	Microorganismo	CMI	Referencia
Difusión en agar	Orégano	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	79.25µg/mL	Bendahou <i>et al.</i> , 2008
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	58 µg/mL	
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Escherichia coli</i>	79.25 µg/mL	
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Salmonella Thyphimurium</i>	64.25 µg/mL	
		<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	52.25 µg/mL	
	Eucalipto blanco	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>E. coli</i>	4.5µg/mL	Tyagi Malik, 2011
<i>Bacillus subtilis</i>			2.25 µg/mL		
Dilución en agar	Canela de cassia	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	0.05% p/v	Oussalah <i>et al.</i> , 2006
	Mejorana	<i>Origanum najorana</i>	<i>P. putida</i>	0.4% p/v	
Dilución seriada	Canela	<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	<i>E. coli</i>	250 µg/mL	Chang <i>et al.</i> , 2001
		<i>Cinnamomum osmophloeum</i>	<i>S. aureus</i>	250µg/mL	
Microdilución seriada	Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>S. aureus</i>	0.03% v/v	Hammer <i>et al.</i> , 1999
		<i>Thymus vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	0.03% v/v	
	Tomillo	<i>Thymus zygis</i>	<i>E. coli</i>	12.5µg/L de aire	Inouye <i>et al.</i> , 2001
		<i>Thymus zygis</i>	<i>S. aureus</i>	6.25 µg/L de aire	
	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>S. aureus</i>	100 µg/L de aire	

Tabla 2.1 (Continuación)

Metódo utilizado	Aceite esencial	Nombre científico	Microorganismo	CMI	Referencia
Cámara hermética	Naranja	<i>Citrus sinensis</i> var. Valencia	<i>A. flavus</i>	800 µg/L de aire	Velázquez- Nuñez <i>et al.</i> , 2013
	Orégano mexicano	<i>Lippia berlandieri</i> Schauer	<i>A. flavus</i>	1,470.6 µg/L de aire	Gómez-Sánchez <i>et al.</i> , 2011
	Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Bacillus cereus</i>	17.5 µg/L de aire	López <i>et al.</i> , 2007
		<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>S. aureus</i>	34.9 µg/L de aire	
Caja Petri invertida	Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>A. flavus</i>	17.5 µg/L de aire	
		<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>L. monocytogenes</i>	26.2 µg/L de aire	
	Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Aspergillus niger</i>	62.5 µg/L de aire	
		<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Salmonella</i> Enteritidis	62.5 µg/L de aire	
	Canela	<i>Cinnamomum aromaticum</i> Nees	<i>Staphylococcus aureus</i>	250 µg/L de aire	Kloucek <i>et al.</i> , 2012

diferentes factores tales como el origen del AE, el volumen del inóculo, la fase de crecimiento del microorganismo, el medio de cultivo utilizado, el tiempo de incubación, la temperatura, el pH y la actividad de agua del medio, entre muchos otros factores (Burt, 2004).

A continuación se describen los métodos mayormente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los AE, por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), tanto en fase vapor como por contacto directo. La CMI se define como la menor concentración requerida del AE que tenga la capacidad de frenar el crecimiento del microorganismo (propiedades bacteriostáticas o fungistáticas) (Smith-Palmer *et al.*, 1998) o la concentración mínima letal que asegure la reducción de un 99.9% de la población del mi-

croorganismo (propiedades bactericidas o fungicidas) (Burt, 2004). Además, la actividad de los aceites esenciales contra mohos también puede ser evaluada por el control en la inhibición de la esporulación o la producción de toxinas (Kalemba y Kunicka, 2003).

2.2.1 Contacto directo

Los métodos de evaluación de los AE mediante el contacto directo han sido probablemente los más utilizados en los diversos estudios, ya que se busca remplazar a los conservadores sintéticos; los cuales son añadidos durante la formulación de un alimento, de tal manera que los aceites esenciales se evalúan al añadirlos directamente en forma líquida, ya sea en un producto alimenticio o un medio sintético.

2.2.1.1 Dilución en agar

El método de dilución en agar es utilizado generalmente para determinar si el AE es letal contra un microorganismo, además se usa con microorganismos aeróbicos o microaerofílicos con una velocidad variable de crecimiento. Para esta técnica, se preparan diferentes diluciones de los AE; posteriormente, las diluciones se añaden a los agares y estos son puestos en cajas Petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos (de 16 a 24 horas).

Para esta técnica, la CMI es considerada como la menor concentración que inhiba el crecimiento visible. Entre las principales ventajas se incluyen la posibilidad de evaluar muchos microorganismos a la vez, la facilidad para detectar contaminación y el hecho de que el agar puede contener materiales opacos sin afectar los resultados, a diferencia de otros métodos que evalúan mediante turbidez o lectura de absorbancia (López-Malo *et al.*, 2005).

2.2.1.2 Dilución y microdilución en caldo

El método de dilución y microdilución seriada se lleva a cabo en tubos o pocillos con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes (serie de dilución doble) de AE diluido en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución (cuando se utilizan tubos con un volumen total de 1-10 mL) o de microdilución (si se realiza en placas de pocillos usando un máximo de 500 µL por pocillo). Posterior a la incubación (16 a 24 horas, dependiendo del microorganismo), la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo. Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pocillos sin turbidez y se hace un sembrado en agar.

La CMI en esta técnica se determina de acuerdo a la concentración más baja que impida el crecimiento visible del microorganismo. Estos métodos son mayormente utilizados en estudios con bacterias (López-Malo *et al.*, 2005; Wiegand *et al.*, 2008).

2.2.1.3 Difusión en agar

El método de difusión en agar ha sido probablemente el más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismos aeróbicos. En este método, existen dos formas de identificar la difusión y, por lo tanto, la efectividad del AE. En la primera, el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; un papel filtro es impregnado con una solución de concentración conocida del AE, el cual es colocado en la superficie del agar. En la segunda, se perfora el agar solidificado y previamente inoculado, usando un perforador estéril, y se vierte una solución de cierta concentración del AE en las perforaciones.

Posteriormente, las cajas Petri son incubadas a la temperatura y tiempo óptimos. El principio es la difusión del AE hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación de zonas de inhibición. Lo anterior supone que el diámetro de las zonas aumentará al incrementar la concentración del AE (Bonnev *et al.*, 2008).

Los resultados de la prueba de difusión en agar son generalmente cualitativos. La susceptibilidad del microorganismo en prueba está relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros. Los microorganismos se denominan susceptibles cuando el diámetro de la zona es mayor a 30-35 mm, intermedios cuando el diámetro de la zona varía entre 20 y 30 mm, o resistentes con una zona cuyo diámetro es menor a 15-20 mm (López-Malo *et al.*, 2005).

Por otra parte, este método no es tan apropiado para todos los AE, debido a que su alta volatilidad causará que algunos componentes químicos se evaporen durante la incubación; además, su hidrofobicidad impedirá la difusión de todos los componentes. Debido a lo anterior, aunque la determinación de la CMI puede obtenerse mediante esta técnica, otros métodos darían mejores resultados (Kalemba y Kunicka, 2003; López-Malo *et al.*, 2005).

2.2.1.4 Sembrado en espiral

La técnica de sembrado en espiral se ha utilizado para enumerar células en suspensión microbiana; no obstante, también se ha empleado para determinar las CMI de algunos agentes antimicrobianos (López-Malo *et al.*, 2005).

El método se basa en dispensar continuamente un volumen decreciente de una concentración conocida de AE en un medio sólido (agar) por medio del patrón de espiral de Arquímedes. Esto resulta en un gradiente del AE con una alta concentración cerca del centro de la caja Petri; el inóculo es sembrado radialmente sobre la superficie de la caja desde el borde exterior hasta el centro de la placa. Posterior a la incubación, se mide y registra la distancia desde el final del crecimiento del microorganismo hasta donde comenzó. La CMI se puede calcular a partir del radio en el que se detiene el crecimiento. La distancia se utiliza para calcular la dilución tanto del inóculo como del AE, en comparación con un control (López-Malo *et al.*, 2005).

Aunque el método ha tenido bajo impacto en la determinación de la actividad antimicrobiana, al igual que en la CMI de los AE, se ha demostrado su utilidad al evaluar la actividad de algunos compuestos como el timol y el eugenol contra diferentes bacterias (Holley y Patel, 2005).

2.2.2 Fase vapor

El uso potencial que tienen los AE al utilizarlos de manera directa, se ha limitado principalmente por las alteraciones que causan en las características organolépticas de los alimentos. Por lo anterior, recientes investigaciones han planteado algunas soluciones a este problema, entre las cuales destaca la utilización de los vapores generados por los AE; lo que resultaría en una menor modificación sensorial en el producto final (Suhr y Nielsen 2003; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006; Goñi *et al.*, 2009). En este caso, el uso potencial de los vapores de los aceites esenciales sería un sistema en el que interactúen el producto, el ambiente y un empaque; sin tener que añadirlo como un aditivo alimentario (Kuorwel *et al.*, 2013).

Las técnicas de fase vapor se basan en la generación de vapores de los AE y la creación de una atmósfera a una cierta temperatura, o un microambiente dado por los propios AE (López *et al.*, 2005). Si bien el efecto que ejercen los vapores de los AE está siendo estudiado recientemente, los principales métodos utilizados se describen a continuación.

2.2.2.1 Caja Petri invertida

La técnica de caja Petri invertida consiste en colocar los agares inoculados de forma separada de los AE. Para ello, papel filtro impregnado con el AE previamente disuelto en acetato de etilo o en otro solvente, es colocado sobre la tapa de una caja Petri; posteriormente, la caja Petri que contiene en la base el agar solidificado e inoculado y en la tapa el papel filtro, se coloca de manera invertida. Con esto se espera una volatilización de los AE con dirección al microorganismo en prueba (Suhr y Nielsen, 2003; Kloucek *et al.*, 2012).

La CMI será la menor concentración probada que inhiba el crecimiento del microorganismo. Esta técnica es mayormente utilizada para bacterias, las cuales tienen mayor velocidad de crecimiento en comparación con los mohos (Edris y Farrag, 2003).

2.2.2.2 Cámara hermética

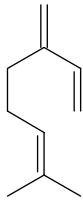
La técnica de cámara hermética consiste en crear una atmósfera a partir de AE; para ello se utilizan cámaras de plástico (aproximadamente de 1-2 L) con tapa hermética transparente; en su interior y en el centro se coloca una cantidad conocida del AE y sobre una rejilla se colocan agares previamente inoculados. Las cámaras se mantienen a una temperatura controlada; en condiciones estándar para mohos a 25 °C durante 72 horas (Suhr y Nielsen, 2003; Gómez-Sánchez *et al.*, 2011) o 37 °C durante 18 a 24 horas para bacterias (Kloucek *et al.*, 2012). De tal manera que los vapores generados por los AE entran en contacto con los microorganismos y dan lugar a zonas de inhibición, disminución del crecimiento o reducción en el número de colonias. La CMI en esta técnica es la menor concentración de AE utilizada que logre inhibir el crecimiento visible de los microorganismos. Este método se usa principalmente para mohos, ya que su velocidad de crecimiento es lenta.

2.3 DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Existe una variación en los componentes químicos mayoritarios de los AE presentes en diferentes entornos tales como un sistema modelo, una atmósfera controlada o un alimento. Asimismo, también existen diferencias en composición de acuerdo a las diferentes partes de la planta de donde se obtuvo el AE o de la especie de la misma. Entre los principales componentes químicos presentes en los AE se encuentran las diferentes clases de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos (figura 2.1) como los alcoholes, cetonas, óxidos, aldehídos, fenoles o ésteres (tabla 2.2) (Aridoğan *et al.*, 2002).

Debido a la gran importancia que tienen los compuestos químicos de los AE, se han empleado diferentes métodos físicos y químicos que ayudan a determinarlos y cuantificarlos (Turek y Stinzinger, 2013).

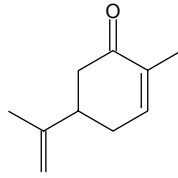
Los métodos de cromatografía acoplados a diferentes sistemas son los más utilizados para determinar la composición química de los AE,



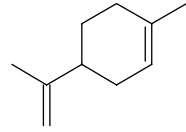
A1. Mirceno



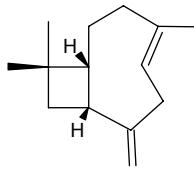
A2. α -Pineno



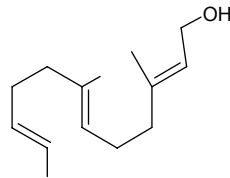
A3. Carvoneno



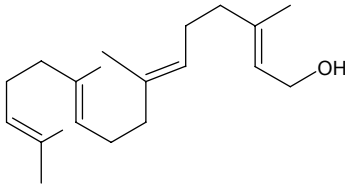
A4. Limoneno



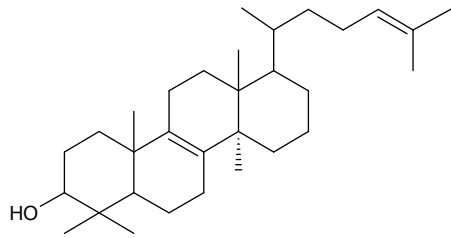
B1. Cariofileno



B2. Farnesol



C1. Geranilgeraniol



C2. Lanosterol

Figura 2.1

Algunas estructuras químicas de (A) Monoterpenos, (B) Sesquiterpenos y (C) Diterpenos

Tabla 2.2 Componentes volátiles de acuerdo al grupo funcional del aceite esencial

Grupo Químico Funcional	Componentes	Grupo Químico Funcional	Componentes
Fenoles	Carvacrol Eugenol Timol	Alcoholes sesquiterpenos	Famecol Cedrol
		Cetonas	Alcanfor Carvona α -tujona
Aldehídos	Citral Citronela Benzaldehído Perilaldehído Cinamaldehído	Ésteres	Acetato de linalilo Salicilato de metilo Etil acetato Anetol
		Éteres y óxidos	Metil timol Anetol Cineol
Alcoholes	Terpenos Borneol Mentol Geraniol Linalol Feniletanol	Hidrocarburos	Careno β -cariofileno α -pineno Limoneno

Adaptada de Inouye *et al.*, 2006.

obteniendo información de identidad, posibles impurezas, adulteraciones, reacciones de degradación, así como de parámetros de calidad. Además, son una opción para una rápida separación cuantitativa de macro y microcomponentes con estructuras químicas simples o complejas (Marriott *et al.*, 2001).

2.3.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite separar e identificar los componentes químicos de una muestra. Esta técnica utiliza un gas inerte como fase móvil y un líquido como fase estacionaria en una columna capilar; la fase móvil está constantemente recorriendo el sistema. Otro aspecto característico de la

GC es que trabaja en un amplio rango de temperaturas (-70 a 400 °C). La muestra a evaluar debe ser volatilizada antes de ingresar a la columna cromatográfica. En esta técnica pueden darse los fenómenos de adsorción y de partición (Hernández-Molina, 2007).

La GC es uno de los métodos de análisis más eficaces, ya que permite la separación de cantidades muy pequeñas; además se usa generalmente para análisis cuantitativo. La principal limitante para esta técnica es la termoestabilidad de la muestra, es decir, que mantenga su estructura a la temperatura de trabajo (Hernández-Molina, 2007).

Por otra parte, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) permite obtener el espectro de masas de cada componente, con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural, por lo que se logra identificarlos, ya que existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes (Marriott *et al.*, 2001; Cserhádi *et al.*, 2005). La GC-MS da como resultado un cromatograma, que muestra los compuestos separados y el área del pico de cada uno de ellos, la cual es proporcional a su concentración (Cserhádi *et al.*, 2005).

Numerosos estudios han empleado la GC-MS a fin de determinar cualitativa y cuantitativamente la composición química de los AE; estos estudios reportan resultados adecuados y repetibles. Ávila-Sosa *et al.* (2012) identificaron al eugenol (3.402 g/ml) y al cinamaldehído (0.652 g/ml) como componentes mayoritarios del AE de canela (*Cinnamomum verum*). Asimismo, determinaron que en el AE de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer L) el timol (2.103 g/ml) y el carvacrol (0.533 g/ml) son los componentes presentes en mayor proporción. Por otra parte, Tian *et al.* (2011) identificaron 45 componentes en el aceite esencial de la cicuta (*Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak) y determinaron que el γ -terpineno (40.92%), p-cimeno (27.93%) y el cuminaldehído (21.20%) son los componentes mayoritarios. Bendahou *et al.* (2008), por su parte, determinaron que timol (41.6%), γ -terpineno (27%), y p-cimeno (17.1%) son los componentes mayoritarios en el AE de orégano (*Origanum glandulosum*). La mayoría de las investigaciones que reportan la composición química de los AE utilizan GC-MS.

Si bien la GC-MS puede emplearse para identificar y cuantificar componentes químicos que pueden ser volatilizados, la correcta determinación y cuantificación de los componentes químicos presentes en una matriz de un alimento, en un producto empacado o en el AE recién obtenido, depende de un adecuado muestreo o extracción del mismo (Hui, 2002; Sánchez-Cabrera y Pino, 2011).

2.3.2 Influencia de los métodos de extracción en la composición química

Para la determinación de los compuestos químicos de los AE relacionados con el sabor, efectos antimicrobianos y antioxidantes, se han empleado diferentes métodos de extracción; entre los más utilizados se encuentran la extracción con solventes orgánicos, la hidrodestilación (HD por sus siglas en inglés) (Périno-Issartier *et al.*, 2010), la extracción asistida con microondas (MAE por sus siglas en inglés), la extracción con microondas libre de solvente (SFME, por sus siglas en inglés) (Sparr y Björklund, 2000) y la extracción asistida con ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés) (Vilkhu *et al.*, 2008).

El uso de cualquier método de extracción para la posterior determinación de la composición química, ha sido criticado debido a los posibles procesos de transformación que sufren los compuestos por la influencia del calor y el vapor de agua (Richter y Schellenberg, 2007).

Diversas investigaciones han referido que entre los métodos de extracción más efectivos se encuentra MAE, debido a que requiere poca energía y hay una mejor retención de los compuestos químicos.

Uno de los estudios que fundamentan lo anterior, es el de Flamini *et al.* (2007) quienes determinaron y compararon los componentes químicos presentes en el AE de laurel (*Laurus nobilis* L.) obtenido por HD y por MAE, utilizando GC-MS para la cuantificación de los componentes; en este estudio concluyeron que los monoterpenos se obtenían sólo con MAE. En la misma línea, Bendahou *et al.* (2008) determinaron la composición química del AE de orégano (*Origanum glandulosum*) extraído por medio de HD, MAE y SFME utilizando GC-MS; identificaron al timol, γ -terpineno, p-cimeno y carvacrol como los principales com-

puestos del AE, siendo la MAE el método que mejor retuvo los compuestos químicos. Por otro lado, en un estudio realizado por Lucchesi *et al.*, (2007), se evaluó la influencia de HD y SFME en la composición química del AE de cardamomo (*Elletaria cardamomum* L.); se encontró que con SFME se obtuvieron mayores cantidades de compuestos oxigenados y menores cantidades de hidrocarburos y monoterpenos en comparación con HD.

Finalmente, se ha observado que los diversos métodos de extracción además de afectar a la retención de los componentes químicos, también pueden producir cambios físicos distinguibles en la materia prima (Lucchesi *et al.*, 2007).

2.3.3 Muestreo selectivo de analitos

Como se describió previamente, en la evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales en fase vapor, el AE en estado líquido se coloca en un sitio cercano al medio de cultivo inoculado con el microorganismo en prueba, de tal manera que los compuestos volátiles del aceite entran en contacto con el microorganismo y ejercen su efecto sobre éste; todo lo anterior se lleva a cabo dentro de un recipiente cerrado. En consecuencia, la determinación de la composición del aire en el espacio de cabeza de dicho recipiente, es fundamental para obtener información importante sobre los compuestos que pueden afectar al microorganismo. Para esto, es necesario tomar una muestra del aire en equilibrio con el AE, mediante una jeringa, para luego inyectarlo en el puerto de un cromatógrafo de gases. En este caso, el aire contendrá todos los compuestos volátiles que se difundieran, tanto del aceite hacia el aire, como del medio de cultivo hacia el aire, es decir, los analitos con actividad antimicrobiana no serán los únicos recolectados. En este sentido, un nuevo enfoque para la toma de muestras es la técnica de microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) que fue desarrollado por Pawliszyn en 1989 (Pawliszyn, 2000). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en diferentes campos de la química analítica y de alimentos (Hui, 2002). La SPME tiene ventajas significativas, tales como la reducción de consumo de solventes orgá-

nicos y la no degradación de la muestra; además, es de bajo costo, rápida, sensible y selectiva, cuando es combinada con métodos de detección apropiados (Adam *et al.*, 2009).

El instrumento usado en esta técnica consta de una fibra de sílica fundida recubierta por un material capaz de retener solo cierto tipo de analitos (por ejemplo, polidimetilxiloxano). Esta fibra está protegida por una aguja retractable. Para la toma de los analitos, la aguja se inserta a través de un septum en un espacio de cabeza, lo cual causa que la aguja se retracte y deje la fibra expuesta. Entonces el recubrimiento de la fibra retiene los analitos compatibles con él. En seguida, la fibra con los analitos es retirada del espacio de cabeza, siendo nuevamente protegida por la aguja, y transferida al puerto de inyección de un GC, donde los analitos son térmicamente liberados, para luego ser identificados (Hui, 2002 y Vas Vékey, 2004).

Entre los estudios que han utilizado la SPME para el análisis de AE, puede mencionarse el de Popovici *et al.* (2008), quienes utilizaron dos tipos de fibra; en este estudio identificaron 57 compuestos volátiles en el AE de mirto de brabante (*Myrica gale* L.). Asimismo, Fang *et al.*, (2006), usaron SPME para muestrear los compuestos volátiles del AE de hinojo (*Foeniculum vulgare*). Ambos estudios muestran la eficacia de la SPME cuando se requiere muestrear selectivamente compuestos volátiles de un AE; además refieren a la técnica como simple, rápida y factible.

CONCLUSIONES

La determinación de la concentración mínima inhibitoria es la forma más común para reportar la efectividad de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos.

Los métodos de evaluación antimicrobiana de los aceites esenciales, tanto en fase vapor como por contacto directo, muestran ventajas y desventajas dependiendo principalmente del tipo de microorganismo objetivo. El utilizar la técnica adecuada permitiría obtener

información certera sobre la efectividad del aceite esencial y la posibilidad de usarlo como agente antimicrobiano.

Los métodos instrumentales para la determinación de los compuestos químicos son herramientas relevantes para la identificación de los compuestos responsables del efecto antimicrobiano. Finalmente, el ahorro en tiempo, la reducción de solventes y la aparente simplicidad de las técnicas de muestreo selectivo de analitos continúan atrayendo el interés en el área de alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, M., Dobiáš, P., Pavlíková, P. y Ventura, K. (2009). «Comparison of solid-phase and single-drop microextractions for headspace analysis of herbal essential oils». *Central European Journal of Chemistry*, 7(3), 303-311.
- Aridoğan, B., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Ozbaşar, D. y Mumcu, E. (2002). «Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils». *Archives of Pharmacal Research*, 25(6), 860-864.
- Ávila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez-Munguía, M., Nevárez-Moorillón, G., Navarro-Cruz, A. y López-Malo, A. (2012). «Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films». *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 66-72.
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J., Bernardini, A. y Costa, J. (2008). «Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation». *Food Chemistry*, 106(1), 132-139.
- Bonev, B., Hooper, J. y Parisot, J. (2008). «Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295-1301.
- Burt, S. (2004). «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review». *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

- Chang, S., Chen, P. y Chang, S. (2001). «Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*». *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 123-127.
- Cserháti, T., Forgács, E., Deyl, Z. y Miksik, I. (2005). «Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: a review». *Biomedical Chromatography*, 19(3), 183-190.
- Cruz-Cabral, L., Fernández-Pinto, V. y Patriarca, A. (2013). «Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods». *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1-14.
- Edris, A. y Farrag, E. (2003). «Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase». *Journal Nahrung Food*, 47(2), 117-121.
- Fang, L., Qi, M., Li, T., Shao, Q. y Fu, R. (2006). «Headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 791-797.
- Fisher, K. y Phillips, C. (2008). «Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?». *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 156-164.
- Flamini, G., Tebanoa, M., Cionia, P., Ceccarini, L., Riccio, A. y Longo, I. (2007). «Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses micro-waves applied in situ, without resorting to an oven». *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 36-40.
- Gómez-Sánchez, A., Palou, E. y López-Malo, A. (2011). «Antifungal activity evaluation of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on the Growth of *Aspergillus flavus* by gaseous contact». *Journal of Food Protection*, 74(12), 2192-2198.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. y Nerin, C. (2009). «Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils». *Food Chemistry*, 116(14), 982-989.
- Hammer, K., Carson, C. y Riley, T. (1999). «Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts». *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.

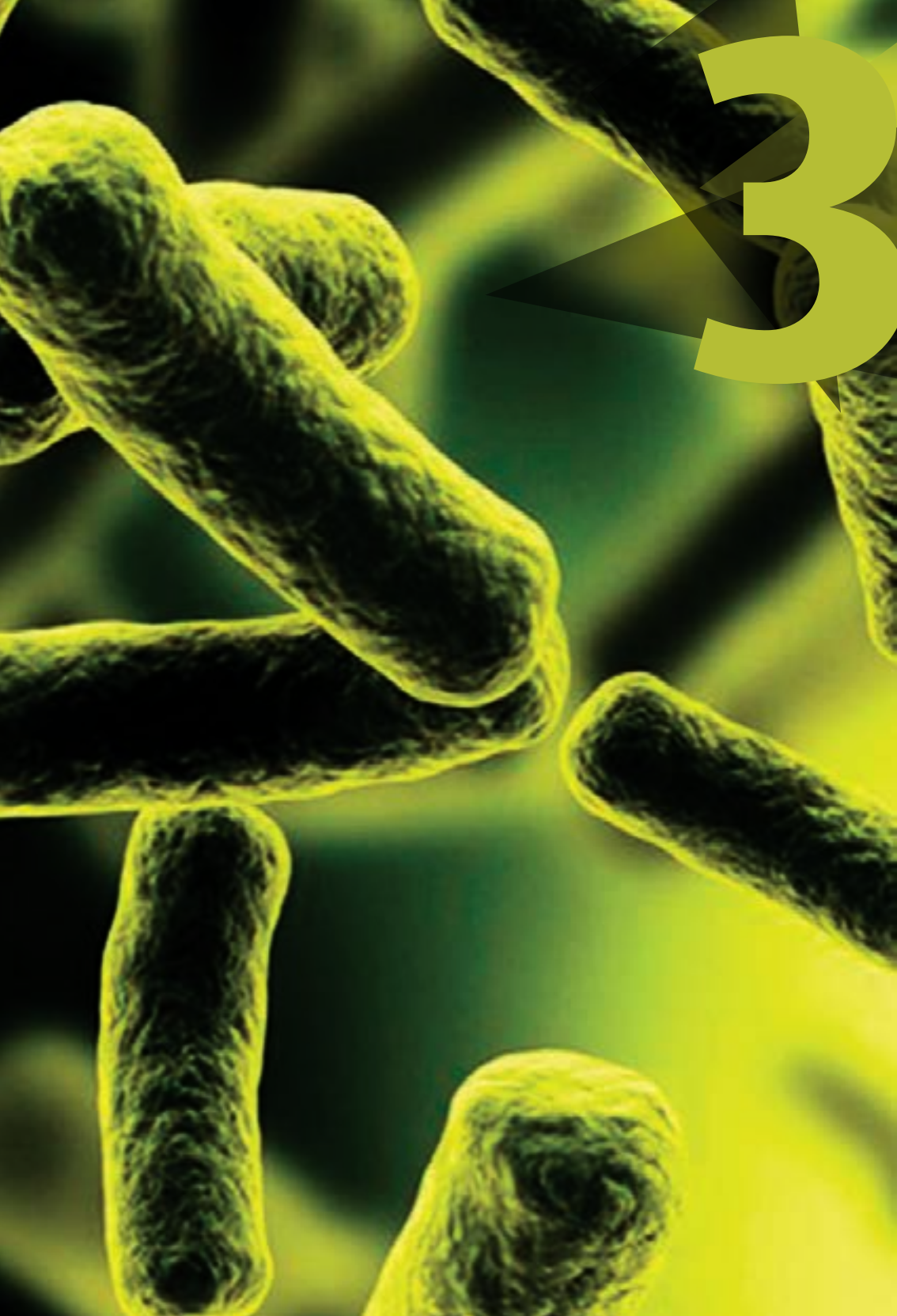
- Hernández-Molina, L. R. (2007). «Purificación cromatográfica de metabolitos secundarios de origen vegetal». En J. F. López-Olguín, A. Aragón-García y A. M. Tapia-Rojas (Eds.). *Avances en Agroecología y Ambiente* (173-192). Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Holley, R. y Patel, D. (2005). «Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials». *Food Microbiology*, 22 (4), 273-292.
- Hui, C. (2002). «A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373 (1-2), 23-30.
- Inouye, S., Takizawa, T. y Yamaguchi, H. (2001). «Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 47 (5), 565-573.
- Inouye, S., Uchida, K. y Abe, S. (2006). «Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*». *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12 (4), 210-216.
- Kalembe, D. y Kunicka, A. (2003). «Antibacterial and antifungal properties of essential oils». *Current Medicinal Chemistry*, 10 (10), 813-829.
- Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I. y Pavela, R. (2012). «Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase». *Food Research International*, 47 (2), 161-165.
- Kuorwel, K., Cran, M., Sonneveld, K., Milts, J. y Bigger, S. (2013). «Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant». *LWT - Food Science and Technology*, 50, 432-438.
- Leistner, L. (2000). «Basic aspects of food preservation by hurdle technology». *International Journal of Food Microbiology*, 55 (1-3), 181-186.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R. y Nerín, C. (2005). «Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (17), 6939-6946.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R. y Nerín, C. (2007). «Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (11), 4348-4356.

- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M. y Davidson, P. (2005). «Methods for activity assay and evaluation of results». En P.M. Davidson, J. Sofó, y A. Branen (Eds.). *Antimicrobials in Food* (pp. 659-680). Boca Ratón: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Marriott, P., Shellie, R. y Cornwel, I. C. (2001). «Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils». *Journal of Chromatography A*, 936(1-2), 1-22.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. y Lacroix, M. (2006). «Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat». *Meat Science*, 73(2), 236-244.
- Pawliszyn, J. (2000). «Theory of solid-phase microextraction». *Journal of Chromatographic Science*, 38(7), 270-278.
- Périno-Issartie, S., Huma, Z., Abert-Vian, M. y Chemat, F. (2010). «Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products». *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1020-1028.
- Popovici, J., Bertrand, C., Bagnarol, E., Fernandez, M. y Comte, G. (2008). «Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity». *Natural Product Research*, 22(12), 1024-1032.
- Raybaudi-Massilia, R., Soliva, R. y Belloso, O. (2006). «Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frutas cortadas». En G. González-Aguilar y F. Cuamea (Eds.). *I Simposio Iberoamericano de Vegetales Frescos Cortados*. San Pedro, SP, Brasil.
- Richter, J. y Schellenberg, I. (2007). «Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(6), 2207-2217.
- Rizzolo, A., Gerli, F., Prinziavalli, C., Buratti, S. y Torreggiani, D. (2007). «Headspace volatile compounds during osmotic dehydration of strawberries (cv *Camarosa*): Influence of osmotic solution composition and processing time». *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 529-535.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, 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, 621-632.

- Sánchez-Cabrera, Y. y Pino, J. (2011). «Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile compounds from spice essential oils in dry flavourings». *International Journal of Food Science and Technology*, 46(10), 2118-2123.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. y Fyfe, L. (1998). «Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens». *Letters in Applied Microbiology*, 26 (2), 118-122.
- Solórzano-Santos, F. y Miranda-Navales, M. (2012). «Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents». *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (2), 136-141.
- Sparr, C. y Björklund, E. (2000). «Analytical-scale microwave-assisted extraction». *Journal of Chromatography A*, 902 (1), 227-250.
- Suhr, K. y Nielsen, P. (2003). «Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi». *Journal of Applied Microbiology*, 94 (4), 665-674.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. y Cliver, D. (2010). «Antimicrobial herb and spice compounds in food». *Food Control*, 21 (9), 1199-1218.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B. y Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (2-3), 464-470.
- Turek, C. y Stintzing, F. (2013). «Stability of essential oils: a review». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12 (1), 40-53.
- Tyagi, A. y Malik, A. (2011). «Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms». *Food Chemistry*, 126, 228-235.
- Vas, G. y Vékey, K. (2004). «Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis». *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 233-254.
- Velázquez-Nuñez, M., Avila-Sosa, R., Palou, E. y López-Malo, A. (2013). «Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact». *Food Control*, 37 (1), 1-4.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. y Bates, D. (2008). «Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry -

A review». *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.

Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. (2008). «Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances». *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.



3

Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos

S. C. Beristain-Bauza, E. Palou y A. López-Malo

Actualmente existe una tendencia importante por parte de los consumidores en demandar alimentos naturales o que sean mínimamente procesados y sin conservadores sintéticos. Los consumidores consideran que muchos alimentos procesados presentan una calidad nutricional pobre y que los aditivos sintéticos son peligrosos para la salud. Como resultado de estas demandas, se tiene un gran interés en desarrollar alimentos con agentes antimicrobianos naturales, los cuales deben ser inocuos, que cumplan con los parámetros de calidad y seguridad de las normativas aplicables para agentes antimicrobianos y que además presenten alto espectro de efectividad contra microorganismos.

La industria alimentaria ha desarrollado la aplicación de bacteriocinas, producto del metabolismo secundario de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) en la conservación de los alimentos. Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen proteínico, que a bajas concentraciones presentan inhibición microbiológica efectiva (Beshkova y Frengova, 2012). Algunas BAL productoras de bacteriocinas han sido aisladas de alimentos como la carne y los productos lácteos, además pueden ser utilizadas como iniciadores en procesos de fermentación de otros alimentos. Por lo tanto, las BAL y/o bacteriocinas pueden ser utilizadas como conservadores biológicos puros, que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores sintéticos.

La mayoría de las bacteriocinas son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, tales como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylo-*

coccus aureus, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* (Wu *et al.*, 2004; Jeevaratnam *et al.*, 2005). Sin embargo, sólo la nisina ha sido aprobada legalmente para su uso en alimentos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), en la categoría Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, por sus siglas en inglés).

Debido a esta razón, las bacteriocinas se han convertido en un campo importante de investigación y estudio en los últimos 25 años, por lo que el objetivo de esta revisión es dar a conocer un panorama general sobre el concepto de bacteriocinas, su clasificación, actividad antimicrobiana, modo de acción y principalmente la importancia de la aplicación de estos compuestos como agentes antimicrobianos naturales en la preservación de los alimentos.

3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos heterogéneos, con diferentes niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas (Stoyanova *et al.*, 2012). Éstas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Jeevaratnam *et al.*, 2005); sin embargo, las producidas por las BAL han sido de gran interés para la industria alimentaria debido a las siguientes razones: se encuentran fácilmente en BAL comerciales (lactococos, lactobacilos, pediococos), son consideradas seguras para su consumo, no son tóxicas para las células eucariotas y presentan un espectro de inhibición más amplio en comparación con los espectros de las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram-negativas (Nes *et al.*, 2007).

De acuerdo con Chen y Hoover (2003) las bacteriocinas, metabolitos secundarios de las BAL, se definen como productos de la síntesis ribosómica, conformados por péptidos de entre 20 y 60 aminoácidos (lactococinas A, B, M y G, lactacina B y helveticina J), entre otras). Son secretados extracelularmente y presentan una alta actividad bactericida o bacteriostática, sobre cepas o especies relacionadas y sobre microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos (Cotter *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas están conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (Cotter *et al.*, 2005).

La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando una relación directa con la biomasa producida. Entre sus características principales destacan el ser estables al calor y a medios con pH ácido, ambas propiedades están estrechamente relacionadas: es decir, un incremento de pH reduce la estabilidad al calor (Chen y Hoover, 2003). Sin embargo, aunque las bacteriocinas presentan estabilidad a pH ácido o neutro, son fácilmente destruidas a pH mayor de 10 (Jack *et al.*, 1995). La alta termorresistencia en las bacteriocinas con peso molecular menor a 5 kDa, les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche, pero son parcialmente destruidas por arriba de los 100°C. Dicha estabilidad puede deberse a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones hidrofóbicas, así como a la formación de enlaces cruzados estables (Alquicira, 2006).

Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son inactivadas por proteasas, incluyendo las de origen pancreático y gástrico, debido a ello durante su paso por el tracto gastrointestinal son inactivadas, sin ser absorbidas como compuestos activos (Quintero, 2006), resultando así presuntamente inocuas para el consumidor.

Las bacteriocinas presentan un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas a bajas concentraciones (menores a 10 ppm) frente a bacterias Gram-positivas patógenas o deteriorativas de alimentos. Se ha demostrado que dicha actividad también se extiende a bacterias Gram-negativas sub-letalmente dañadas por los tratamientos térmicos o por la presencia de agentes quelantes. Estudios comparativos demuestran que presentan mayor inhibición contra las bacterias Gram-positivas. Las bacteriocinas presentan inhibición potencial contra patógenos como *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y algunas especies de *Bacillus* (Wu *et al.*, 2004; Jeevaratnam *et al.*, 2005).

3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Anteriormente las bacteriocinas producto de las BAL fueron clasificadas en cuatro clases principales, de acuerdo a su estructura, propiedades fisicoquímicas y propiedades moleculares (Chen y Hoover, 2003). Sin embargo, en la actualidad se ha reducido esa clasificación a tres grupos (Savadogo *et al.*, 2006; De Vuyst y Leroy, 2007; Beshkova y Frengova, 2012), ya que la cuarta clasificación no ha sido totalmente justificada.

3.2.1 Clase I. Lantibióticos

Los lantibióticos son péptidos pequeños conformados por 19-38 aminoácidos (Savadogo *et al.*, 2006; Montalbán-López *et al.*, 2011), policíclicos, con un peso molecular menor a 5 kDa, con poca estabilidad al calor y son modificados postraduccionalmente (cambio químico ocurrido en las proteínas después de su síntesis proteica) por la deshidratación de la serina y la treonina formando aminoácidos como dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb). Estos residuos pueden unirse a través de un grupo tioéter a cadenas laterales de cisteína, dando lugar a los aminoácidos inusuales como lantionina (Lan) y α -metil-lantionina (MeLan) (Riley y Wertz, 2002) mostrados en la figura 3.1. Los lantibióticos son los únicos que se producen en el ribosoma como un prepeptido, que experimenta una modificación postraducciona extensa para formar un péptido activo (McAuliffe *et al.*, 2001).

Los lantibióticos son subdivididos en dos grupos, de acuerdo a sus características estructurales y a su modo de acción contra microorganismos (Guder *et al.*, 2000).

Clase Ia. Son péptidos elongados en forma de tornillos con moléculas anfipáticas, presentan un peso molecular menor a 4 kDa, flexibles, con carga neta positiva, cuya actividad antimicrobiana se debe a la destrucción de la célula por la despolarización de la membrana citoplasmática (Chen y Hoover, 2003; Stoyanova *et al.*, 2012). La bacteriocina más representativa de este grupo es la nisina (Cintas *et al.*, 2001).

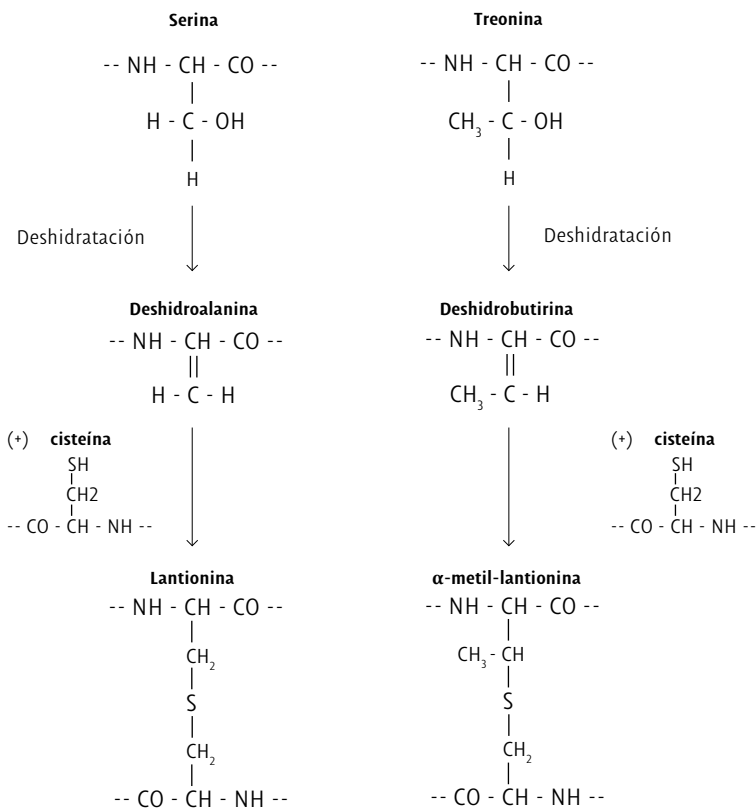


Figura 3.1

Modificaciones postraduccionales de la lantionina y α-metil-lantionina de los lantibióticos

Adaptado de Suárez, 1997.

Clase Ib. Son péptidos globulares e hidrófobos, con un peso molecular entre 1.8 y 2.1 kDa. Presentan una carga neta negativa o sin carga. Su actividad antimicrobiana está relacionada principalmente con la inhibición enzimática (Riley y Wertz, 2002). Bacteriocinas como duramicina A, B, C y la cinamisina son representativas de este grupo (Naidu *et al.*, 2006).

3.2.2 Clase II. No-lantibióticos

Los no-lantibióticos están conformados por bacteriocinas constituidas por 30 a 60 aminoácidos (Montalbán-López *et al.*, 2011), con un peso molecular menor a 10 kDa, no contienen aminoácidos modificados y son estables al calor y al pH (Beshkova y Frengova, 2012). Este grupo de bacteriocinas es considerado como el mayor subgrupo de bacteriocinas provenientes de las BAL, no sólo por su gran número, sino también por su actividad antimicrobiana y aplicaciones potenciales.

Los no-lantibióticos son subdivididos en tres grupos:

- *Clase IIa.* Este grupo se caracteriza por contar con una secuencia amino terminal - Tirosina - Glicina - Asparagina - Glicina - Valina - Xaa - Cisteína (-Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-; donde Xaa indica cualquier residuo de aminoácido) y contiene uno o dos puentes disulfuro (Chen y Hoover, 2003). Este grupo es reconocido principalmente por su alta actividad antimicrobiana contra *Listeria* (Zouhir *et al.*, 2010). Sólo tres bacteriocinas de este grupo han sido caracterizadas: pediocina PA-1, enterocina A y divercina V41 (Chen y Hoover, 2003).
- *Clase IIb.* Este grupo está conformado por bacteriocinas con dos péptidos y la actividad antimicrobiana requiere de la presencia de ambos péptidos en proporciones similares (Oppergård *et al.*, 2007), son formadores de poros en la membrana celular. La sakacina es la bacteriocina más representativa de este grupo (Cintas *et al.*, 2001).
- *Clase IIc.* Poseen una estructura cíclica como resultado de la unión covalente de sus extremos carboxilo y amino terminal, son termoestables y no modificados después de la traducción (Šušković *et al.*, 2010). Éstos carecen de la secuencia amino terminal Tirosina - Glicina - Asparagina - Glicina - Valina - Xaa - Cisteína - que contienen la clase IIa y IIb. La enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis*, es la bacteriocina más representativa de este grupo (Dimov *et al.*, 2005).

3.2.3 Clase III. Termolábiles

Este grupo es denominado «bacteriolisinas», incluye péptidos con un peso molecular mayor a 30 kDa y son lábiles al calor (Abriouel *et al.*, 2011). Su mecanismo de acción se realiza a través de la catálisis e hidrólisis de la pared celular de las células sensibles; las bacteriolisinas más representativas son la helveticina J, producida por *Lactobacillus helveticus*, y la enterocina, producida por *Enterococcus faecium* (Naidu *et al.*, 2006).

3.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y MODO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

De acuerdo con Cintas *et al.* (2001), se ha determinado que las bacteriocinas demuestran alta actividad bactericida que se relaciona principalmente con el contenido de cistina; y de acuerdo a ello, se establecen los tres espectros de acción:

- a) Bacteriocinas con espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben microorganismos de la misma especie.
- b) Bacteriocinas con espectro inhibitorio intermedio, cuyos productos inhiben otros géneros de BAL, bacterias Gram-positivas y patógenos presentes en alimentos.
- c) Bacteriocinas con amplio espectro de inhibición que actúan contra un gran número de bacterias Gram-positivas.

La mayoría de las investigaciones han demostrado que la actividad bactericida de las bacteriocinas, se dirige principalmente contra bacterias Gram-positivas (Jack *et al.*, 1995). Sin embargo, existen numerosas bacteriocinas que presentan un amplio rango de acción, inhibiendo especies Gram-negativas (Mota-Meira *et al.*, 2000; Chung y Yousef, 2005; Gautam y Sharma, 2009), hongos patógenos (Ennahar *et al.*, 2000) y virus (Jenssen *et al.*, 2006).

Cotter *et al.* (2005), determinaron que las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas presentan diferentes modos de acción de acuerdo a su clasificación (figura 3.2).

El modo de acción de los antibióticos se atribuye a la desestabilización (debido a la formación de poros) de las funciones de la membrana citoplasmática. La estructura de estos péptidos, α -hélice o β -laminar, puede formar dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica, creando oligómeros que pueden atravesar la membrana formando poros (Chen y Hoover, 2003). El lado apolar de la molécula se situará próxima a los lípidos de la membrana y el lado polar al centro del poro. Como consecuencia, se observa una pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos, aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de la membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando la muerte celular (McAuliffe *et al.*, 2001). Algunos miembros de la clase I, como la nisina, han demostrado un modo de acción dual. La nisina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente, la nisina se une al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular, y por lo tanto previene la síntesis correcta de la pared celular, provocando la formación de un poro transmembranal y permitiendo la salida de aminoácidos y ATP, lo que conduce a la muerte celular (Cotter *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2012).

Los no-lantibióticos contienen dos péptidos en su estructura principal, los cuales pueden presentar actividades duales distribuidas a través de sus dos péptidos (Ennahar *et al.*, 2000). En general, los péptidos de esta clase tienen una estructura anfifílica helicoidal, lo que les permite orientarse e insertarse en la membrana de la célula, provocando la muerte celular. El modo de acción principal se debe a las interacciones con la membrana celular, se inicia con el reconocimiento entre la bacteriocina y el receptor de la membrana celular, seguido de una serie de interacciones electrostáticas, que le permite insertarse dentro de la membrana interfiriendo con su estructura y conduciendo a

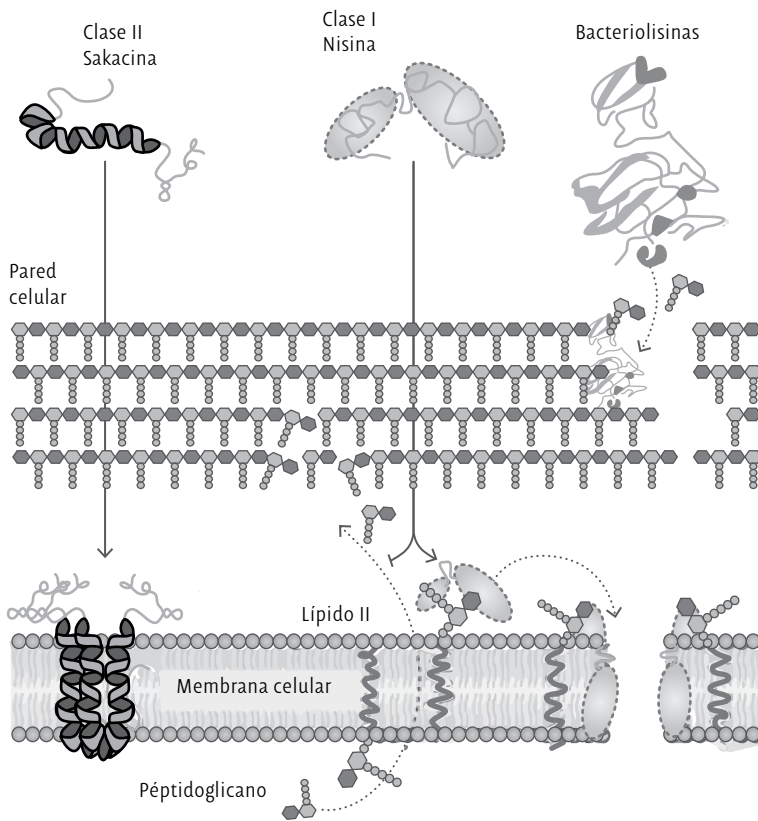


Figura 3.2

Modo de acción de los lantibióticos (Clase I), no-lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III)

Adaptado de Cotter *et al.*, 2005.

una despolarización y muerte (Hu *et al.*, 2006). El mecanismo de la pediocina PA-1 es el más estudiado. En este caso, el extremo N-terminal de la molécula adopta una conformación β que es estabilizada por un puente disulfuro entre Cisteína-9 y Cisteína-14, para promover la unión de los aminoácidos catiónicos (Lisina-11 e Histidina-12) a los fosfolípidos aniónicos, en la membrana, a través de interacciones electrostáticas. Posteriormente, el extremo C-terminal sufre una transformación donde el puente disulfuro entre Cisteína-24 y Cisteína-44, ayuda a la formación de una estructura α -helicoidal que favorece el contacto con los lípidos de la membrana celular. La pediocina PA-1 se introduce en la membrana, provocando la formación de poros y la disipación de protones, lo que causa un colapso en el gradiente de la membrana, incrementando el voltaje celular y haciendo susceptible a la célula de perder iones intracelulares y ATP, absorbiendo radiación UV y evitando el transporte de aminoácidos; para finalmente provocar la muerte celular (Naidu *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase III «bacteriolisinas» es menos complejo con respecto a los de los lantibióticos y los no-lantibióticos, ya que actúan directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram-positivas, lo que conduce a la muerte y lisis de la célula (Cotter *et al.*, 2005).

Los investigadores se han centrado en realizar estudios para determinar el efecto inhibitorio que presentan las bacteriocinas sobre las bacterias Gram-negativas y han encontrado que su inhibición es menor. Esta resistencia posiblemente se debe a que éstas cuentan con la presencia de una membrana externa, conformada por lipopolisacáridos que actúa como una barrera de permeabilidad efectiva (Chung y Yousef, 2005). Debido a ello, los investigadores han propuesto la combinación de métodos, donde las bacteriocinas podrían ejercer un efecto sinérgico con tratamientos como altas presiones hidrostáticas (ННР) y pulsos eléctricos (Ananou *et al.*, 2010; Saldaña *et al.*, 2011). También han adicionado sustancias quelantes que hacen permeables la pared y membrana celular a las bacteriocinas, permitiendo así la inactivación de las bacterias Gram-negativas (Rodgers, 2001).

3.4 BACTERIOCINAS DE USO POTENCIAL EN ALIMENTOS

Las bacteriocinas son una opción atractiva como conservadores naturales para el desarrollo de alimentos mínimamente procesados. Actualmente, se ha demostrado que presentan alto potencial en la biopreservación de carne, productos lácteos, alimentos enlatados, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas, huevo, productos de panificación, vegetales fermentados, entre otros, ya sea solos o en combinación con otros métodos.

De acuerdo con lo propuesto por Cleveland *et al.* (2001), las bacteriocinas pueden ser utilizadas en los alimentos de las siguientes maneras:

- a) Como cultivos iniciadores en alimentos fermentados
- b) Adicionadas directamente al producto, purificadas o semipurificadas
- c) Como un ingrediente en la elaboración de alimentos (aditivos)

Sin embargo, las bacteriocinas deben cumplir con importantes criterios de regulación para su aplicación en los alimentos (Gautam y Sharma, 2009), describiéndose a continuación:

- a) La cepa productora debe estar dentro de la clasificación GRAS, es decir, no estar asociada con proveer algún riesgo a la salud.
- b) Deben ser reconocidas y aceptadas para su uso en alimentos por una autoridad reguladora.
- c) Deben cumplir con un espectro de inhibición que puede incluir microorganismos patógenos o tener actividad contra uno en particular.
- d) Su adición en los productos debe de presentar efectos benéficos, tales como mejorar la seguridad, calidad y/o sabor.
- e) Alta actividad antimicrobiana a bajas concentraciones.

Entre las aplicaciones más importantes de las bacteriocinas en alimentos, se encuentran las siguientes:

- a) En los productos enlatados como en granos de elote, chícharos, papas, hongos y zanahoria se aplican para controlar el crecimiento de termófilos esporulados. Estos alimentos de baja acidez (pH mayor a 4.5), son susceptibles al crecimiento de esporas resistentes a los tratamientos térmicos como *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium thermosaccharolyticum*. La adición de la nisina, además de inhibir dichos microorganismos, prolonga el almacenamiento de estos productos a temperatura ambiente (Delves-Broughton, 2005).
- b) El uso de las bacteriocinas en los productos del mar es muy complejo, debido a la constitución del producto (matriz baja en azúcares), por lo tanto, la bacteriocina que se adicione no debe ocasionar un deterioro en el producto, por la baja acidificación que ésta puede proveer. Sin embargo, en estos alimentos retoma importancia, ya que las investigaciones actuales han demostrado la inhibición de *L. monocytogenes* en langosta y *C. botulinum* en alimentos marinos empacados con atmósferas modificadas (Pilet y Leroi, 2011).
- c) En los productos cárnicos se utilizan para inhibir *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *E. coli* (Naidu *et al.*, 2006). También se busca reducir el uso de los nitritos y sus derivados que pueden formar nitrosaminas carcinogénicas.
- d) En el vino y cerveza, el objetivo principal es inhibir levaduras, el crecimiento de lactobacilos y pediococos como microorganismos deteriorativos. Las bacteriocinas son adicionadas en los vinos para prevenir el crecimiento de las BAL y asegurar la ausencia de la fermentación maloláctica, evitando la disminución del pH del producto que causa defectos como la mucosidad y el exceso de acetato, que promueven un efecto negativo en la calidad del vino. En la cerveza, inhiben el crecimiento de lactobacilos y pediococos que conducen a una cer-

veza con exceso de acidez y sabores extraños, debido a la producción de diacetilo (Naidu *et al.*, 2006).

- e) El uso de las bacteriocinas en productos lácteos es más común. En los quesos, las bacteriocinas controlan el crecimiento de las BAL, ya que un exceso de ellas proveerá de sabores extraños a los productos, por otro lado, su aplicación promueve la aceleración de su maduración (Beshkova y Frengova, 2012). En los postres lácteos, se utilizan para extender su vida útil, ya que éstos no pueden ser completamente esterilizados sin dañar sus características sensoriales. En la leche, previene la esporulación de bacterias termofílicas resistentes al calor que pueden sobrevivir a la pasteurización (Ekbal *et al.*, 2012). Principalmente, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en estos productos es inhibir microorganismos como *Clostridium* y *Listeria* (Cleveland *et al.*, 2001).

Como lo demuestran los reportes de investigación, las bacteriocinas son potencialmente útiles para garantizar la inocuidad de los alimentos, así como mejorar sus características sensoriales y fisicoquímicas. En la tabla 3.1, se muestra un resumen de algunas bacteriocinas provenientes de las BAL y sus principales aplicaciones en los alimentos.

3.5 BACTERIOCINAS COMERCIALES UTILIZADAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

3.5.1 Nisina, regulación y su aplicación en los alimentos

La nisina es la bacteriocina comercial más importante y la primera aprobada para su uso en la industria alimentaria. La nisina es producida por *Lactococcus lactis*, es un péptido pequeño policíclico con un peso molecular de 3.4 kDa, que se encuentra conformado por 34 ami-

Tabla 3.1 Bacteriocinas de uso potencial aplicadas en los alimentos

BAL	Bacteriocina	Microorganismo susceptible	Alimento	Referencia
<i>Enterococcus durans</i> 41D	Duracina GL	<i>Listeria monocytogenes</i> SCOTT A	Queso artesanal	Du <i>et al.</i> , 2011
<i>Lactobacillus curvan</i>	Curvaticina FS47	<i>L. monocytogenes</i>	Carne molida	Naidu <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina P		Filetes de salmón	
<i>Enterococcus</i>	Enterocina AS-48	<i>L. monocytogenes</i>	Jugo de lechuga	Settanni y Corsetti, 2008
		<i>Bacillus cereus</i>	Purés y sopas de vegetales Alimento infantil a base de arroz	Grande <i>et al.</i> , 2007 Grande <i>et al.</i> , 2006
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina	<i>L. monocytogenes</i>	Carne	Grande <i>et al.</i> , 2002
	Sakacina P	<i>L. monocytogenes</i>	Pollo refrigerado	Katla <i>et al.</i> , 2002
<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterocina A y Enterocina B	<i>Listeria innocua</i> CTC1014	Salchichas	Aymerich <i>et al.</i> , 2000
<i>Lactococcus lactis</i>	Lacticina 3147	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 <i>Listeria innocua</i> DPC1770	Leche y suero de leche	Morgan <i>et al.</i> , 2000
<i>Enterococcus faecal</i>	Enterocina 226 NWC	<i>L. monocytogenes</i>	Queso mozzarella	Villani <i>et al.</i> , 1993

noácidos, con residuos deshidratados (dehidrolanina y dehidrobutirina) y cinco anillos de lantionina.

En 1969, la nisina fue reconocida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO, por sus siglas en inglés), como un preservativo en los alimentos, pero fue hasta el año 1988 cuando la FDA aprobó su uso como un aditivo, estableciéndolo en el Código Federal de Regulaciones (CFR) título 21, apartado 184 de la sección 184.1538 «Prepa-

ración de nisina». Su uso se permite en productos enlatados y quesos fermentados para la inhibición del crecimiento de *C. botulinum* y en procesos de pasteurización para inhibir *L. monocytogenes*, estableciendo un límite máximo de 250 ppm en el producto terminado, límite establecido por los métodos estándares del instituto británico (FDA, 2012).

Debido a ello, la nisina ha sido uno de los conservadores más utilizados en la industria alimentaria, además, sus características la convierten en un aditivo adaptable a la naturaleza de los alimentos; es aplicable en bebidas como vinos y cerveza, inhibiendo la fermentación de la levadura y evitando el deterioro del producto; en algunos jugos de frutas, es utilizada para inhibir el crecimiento de *Bacillus*; en lácteos, su principal aportación es la inhibición de *L. monocytogenes* por su alta estabilidad térmica; y en productos enlatados, la inhibición de *C. botulinum*; siendo éstas sus principales aplicaciones. La tabla 3.2 muestra algunas de las aplicaciones más relevantes de la nisina en la industria alimentaria.

Tabla 3.2 Aplicación de la nisina en la industria alimentaria

Alimento	Concentración	Microorganismo susceptible	Referencia
Cerveza	3 mg/L	<i>Lactobacillus brevis</i> CCT 3745	Franchi <i>et al.</i> , 2012
	>100mg/L	<i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565	
	0.8 mg/L	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649	
	>200 mg/L	<i>Schizosaccharomyces ludwiggi</i>	
Leche y huevo líquidos	250 mg	<i>L. monocytogenes</i> SCOTT A 724	Jin, 2010
Jugo de manzana y zanahoria	10 UI/ml	<i>Escherichia coli</i> K12 <i>Listeria innocua</i> ATCC 51742	Pathanibul <i>et al.</i> , 2009
Jugo de naranja	100 UI/ml	<i>Salmonella typhimurium</i>	Lian <i>et al.</i> , 2002
Queso cheddar	300 UI/g	<i>Listeria innocua</i>	Benech <i>et al.</i> , 2002 Zottola <i>et al.</i> , 1994
	300 UI/g	<i>Listeria monocytogenes</i> V7	
		<i>Staphylococcus aureus</i> 196 E	
		<i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	

UI: Unidades arbitrarias

3.5.2 Pediocina, regulación y su aplicación en los alimentos

La pediocina es otra bacteriocina que tiene un amplio campo de aplicación en la industria alimentaria principalmente por el control que ejerce en la inhibición de patógenos como *L. monocytogenes* (Jack *et al.*, 1995). La pediocina que pertenece a la clase II, no-lantibióticos de la clasificación de las bacteriocinas, es sintetizada vía ribosomal por bacterias lácticas del género *Pediococcus*, el cual está conformado por las siguientes especies: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. halophilus*, *P. dextrinicus* y *P. urinaeequi* (Naidu *et al.*, 2006).

La pediocina es un péptido con un peso molecular de 4.6 kDa, se encuentra conformada por 44 aminoácidos que no se modifican post-traduccionalmente. Es un péptido con carga neta positiva, anfifílico con altas regiones hidrofóbicas con la presencia de dos enlaces disulfuro. Presenta un punto isoeléctrico entre 8.6 y 10. Es estable en soluciones acuosas diluidas, principalmente a pH 4 y pH 6, siendo inactivada a pH 7 (Ennahar *et al.*, 2000). Tiene una amplia estabilidad térmica y durante periodos largos, se ha demostrado que presenta actividad inhibitoria después de un tratamiento a 80 °C durante 60 minutos (Rodríguez *et al.*, 2002); sin embargo, en tratamientos con mayor temperatura, 120°C, durante 15 minutos, es parcialmente inactivada, es decir, se desnaturaliza debido a la interacción con el medio y la oxidación de las moléculas de metionina a sulfóxido de metionina (Quintero, 2006).

La pediocina, junto con la nisina, han sido las bacteriocinas con mayor aplicación en la industria alimentaria; sin embargo, aunque ha demostrado alta efectividad antimicrobiana, la FDA aún no le otorga el estatus GRAS, lo que limita su uso en los alimentos (Chen y Hoover, 2003).

La pediocina presenta un gran potencial para ser utilizada como un excelente agente antimicrobiano en los alimentos, principalmente en los cárnicos (Cleveland *et al.*, 2001). Se han realizado varios estudios donde la pediocina es aplicada en salchichas, jugos de carne, lácteos (Cintas *et al.*, 2001) y vegetales, principalmente para el control de bacterias deteriorativas y patógenas (Naidu *et al.*, 2006).

La tabla 3.3, muestra las aplicaciones más relevantes de la pediocina en la industria alimentaria.

Tabla 3.3 Aplicación de la pediocina en la industria alimentaria

Alimento	Concentración	Microorganismo susceptible	Referencia
Salchicha	5 000 UI/ml	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i>	Nieto-Lozano et al., 2010
Carne bologna	7 500 UI/g	<i>Listeria monocytogenes</i> LM 101M	Maks et al., 2010
Filete de pescado	3 000 UI/ml	<i>Listeria monocytogenes</i> BCRC 14845	Ying et al., 2007
Carne de res	6 000 IU/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	Uhart et al., 2004
Queso	25 000 UI/ml	<i>Listeria monocytogenes</i> WSLC 1364	Loessner et al., 2003
Leche en polvo y carne de res	30 000 UI/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	Degnan et al., 1993

UI: Unidades arbitrarias.

CONCLUSIONES

El empleo de bacteriocinas como antimicrobianos naturales es de gran interés en la industria alimentaria, principalmente por su amplio espectro antimicrobiano. Como se ha presentado, las bacteriocinas son aplicadas en una amplia variedad de productos lo que diversifica su uso, con alto potencial para sustituir a los conservadores sintéticos por naturales, abriendo paso a nuevas tecnologías en la biopreservación alimentaria.

Es importante que los investigadores intensifiquen la búsqueda de nuevas bacteriocinas, así como su análisis en los alimentos, logrando que en un futuro sean aprobadas para su uso industrial.

REFERENCIAS

- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B. y Gálvez, A. (2011). «Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*». *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232.
- Alquicira, L. (2006). *Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133* (Tesis de maestría). México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Ananou, S., Garriga, M., Jofré, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. y Valdivia, E. (2010). «Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages». *Meat Science*, 84(4), 594-600.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. y Hugas, M. (2000). «Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products». *Journal of Food Protection*, 63, 721-726.
- Badr, S., Kareem, H.A., Hussein, H. y El-Hadedy, D. (2005). «Characterization of nisin produced by *Lactococcus lactis*». *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(3), 499-503.
- Benech, R.O., Kheadr, E.E., Laridi, E., Lacroix, D. y Fliss, I. (2002). «Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture». *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3683-3690.
- Beshkova, D. y Frengova, G. (2012). «Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry». *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 1-14.
- Cheigh, C-I. y Pyun, Y-R. (2005). «Nisin biosynthesis and its properties». *Bio-medical and Life Sciences*, 27(21), 1641-1648.
- Chen, H. y Hoover, D.G. (2003). «Bacteriocins and their food applications». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 82-100.
- Chung, H-J. y Yousef, A.E. (2005). «*Lactobacillus curvatus* produces a bacteriocin-like agent active against gram-negative pathogenic bacteria». *Food Science and Technology*, 25(614), 59-79.

- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. y Hernández, P.E. (2001). «Review: bacteriocins of lactic acid bacteria». *Food Science Technology International*, 7(4), 281-305.
- Cleveland, J., Monteville, T.J., Nes, I.F. y Chikindas, M.L. (2001). «Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation». *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.
- Cotter, P.D., Hill, C. y Roos, R.P. (2005). «Bacteriocins: developing innate immunity for food». *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
- Degnan, A.J., Buyong, N. y Luchansky, J.B. (1993). «Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes». *International Journal of Food Microbiology*, 18(2), 127-138.
- Delves-Broughton, J. (2005). «Nisin as a food preservative». *Food Australia*, 57(12), 525-527.
- De Vuyst, L. y Leroy, F. (2007). «Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications». *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
- Dimov, S.G., Ivanova, P.M., Harizanova, N.T. e Ivanova, I.V. (2005). «Bioactive peptides used by bacteria in the concurrence for the ecological niche: general classification and mode of action (overview)». *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, (2), 3-22.
- Du, L., Somkuti, J., Renye, J. y Huo, G. (2011). «Properties of durancin GI, a new antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus durans* 41D». *Journal of Food Safety*, 32, 74-83.
- Ekbal, M., Ibrahim, A. y Elbarbary, H.A. (2012). «Effect of bacteriocin extracted from *Lactobacillus acidophilus* on the shelf-life of pasteurized milk». *Journal of American Science*, 8(2), 620-626.
- Ennahar, E., Sashihara, T., Sonomoto, K. e Ishizaki, A. (2000). «Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity». *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 85-106.
- FDA. (2012). *Code of Federal Regulations (annual edition)*. Title 21-Food and Drugs. En línea. Obtenido desde: <http://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action;jsessionid=PjygQQ3hC6bGHVcCxp1Dt2dh9ZbVn9JW3lIj5qhnLXr7YpDhTw1R!-394132962!533076816?selectedYearFrom=2012&page.go=Go>, accesada 12/09/2012.

- Franchi, M., Tribst, A. y Cristianini, M. (2012). «The effect of antimicrobials and bacteriocins on beer spoilage microorganisms». *International Food Research Journal*, 19 (2), 783-786.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. y Hugas, M. (2002). «Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage». *Food Microbiology*, 19 (5), 509-518.
- Gautam, N. y Sharma, N. (2009). «Bacteriocin: safest approach to preserve food products». *Indian Journal Microbiology*, 49 (3), 204-211.
- Grande, M., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Nabil, B., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. (2006). «Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48». *International Journal of Food Microbiology*, 106, 185-194.
- Grande, M., Abriouel, H., López, R., Valdivia, E., Nabil, B., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A. (2007). «Efficacy of enterocin AS-48 against Bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees». *Journal of Food Protection*, 70, 2339-2345.
- Guder, A., Wiedemann, I. y Sahl, H.G. (2000). «Posttranslationally modifier bacteriocins-the lantibiotics». *Biopolymers*, 55 (1), 62-73.
- Hassan, M., Kjos, M., Diep, D.B. y Lotfipour, F. (2012). «Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance». *Journal of Applied Microbiology*, 1, 1-14.
- Hu, H., Moake, M. y Worobo, R. (2006). «Genetic characterization of antimicrobial peptides». En: K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto y R.E. Levin (Eds), *Food Biotechnology* (1349-1478). Segunda edición, Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. (1995). «Bacteriocins of gram-positive bacteria». *Microbiological Reviews*, 59 (2), 171-200.
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M. y Bawa, A.S. (2005). «Biological preservation of foods- bacteriocins of lactic acid bacteria». *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 446-454.
- Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R.E.W. (2006). «Peptide antimicrobial agents». *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (3), 491-511.
- Jin, T. (2010). «Inactivation of *Listeria monocytogenes* in skim milk and egg white by antimicrobial bottle coating with polylactic acid and nisin». *Journal of Food Science*, 75 (2), M83-M88.

- Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I., Axelsson, L., Rorvik, L. y Naterstad, K. (2002). «Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacina P and sakacin P- producing *Lactobacillus sakei*». *Journal Applied Microbiology*, 93(2), 191-196.
- Liang, Z., Mittal, G.S. y Griffiths, M.W. (2002). «Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field». *Journal of Food Protection*, 65(7), 1081-1087.
- Liu, W. y Hansen, N. (1990). «Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*». *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2551-2558.
- Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S. y Scherer, S. (2003). «A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium». *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1854-1857.
- Maks, N., Zhu, L., Juneja, V. y Ravishankar, S. (2010). «Sodium lactate, sodium diacetate and pediocin: effects and interactions on the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* on bologna». *Food Microbiology*, 27, 64-69.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. y Hill, C. (2001). «Antibiotics: structure, biosynthesis and mode of action». *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 285-308.
- Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. y Maqueda, M. (2011). «Are bacteriocins underexploited? novel applications for old antimicrobials». *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(8), 1205-1220.
- Morgan, S.M., Roos, R.P., Beresford, T. y Hill, C. (2000). «Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*». *Journal of Applied Microbiology*, 88, 414-420.
- Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C. y Lavoie, M.C. (2000). «MICs of mutacin B-Ny266, nisina A, vancomycin, and ozacillin against bacterial pathogens». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), 24-29.
- Naidu, A.S., Unal, R. y Tulpinski, J. (2006). «Bacteriocins: antimicrobial activity and applications». En: K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto y R.E. Levin (Eds), *Food Biotechnology* (1391-1437). Segunda edición, Boca Raton, Florida: CRC Press.

- Nes, I.F., Yoon, S-S. y Diep, D.B. (2007). «Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review». *Food Science Biotechnology*, 16 (5), 657-690.
- Nieto-Lozano, J., Reguera-Useros, J., Peláez-Martínez, M., Sacristán-Pérez-Minayo, G., Gutierrez-Fernández, A. y Hardisson de la Torre, A. (2010). «The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters». *Food Control*, 21 (5), 679-685.
- Oppergård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G. y Nissen-Meyer, J. (2007). «The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action». *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13 (4), 210-219.
- Pathanibul, P., Taylor, T., Davidson, P. y Harte, F. (2009). «Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin». *International Journal of Food Microbiology*, 129, 316-320.
- Pilet, M-F. y Leroi, F. (2011). «Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products». In *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. 1, 1-21.
- Quintero, B.S. (2006). *Incorporación de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 en películas y recubrimientos comestibles*. (Tesis doctoral). México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Riley, M.A. y Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117-137.
- Rodgers, S. (2001). «Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review». *Trends in Food Science and Technology*, 12 (8), 276-284.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I. y Kok, J. (2002). «Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (2), 91-121.
- Saldaña, G., Minor-Pérez, H., Raso, J. y Álvarez, I. (2011). «Combined effect of temperature, pH, and presence of nisin on inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields». *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (7), 797-802.

- Savadogo, A., Ouattara, A.T., Bassole, H.N. y Traore S.A. (2006). «Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview». *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678-683.
- Settanni, L. y Corsetti, A. (2008). «Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation». *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138.
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A. y Netrusov, A.I. (2012). «Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties». *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3), 229-243.
- Suárez, G.A. (1997). *Producción de anticuerpos frente a la nisina A: estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos*. (Tesis de doctorado). España: Universidad Complutense de Madrid.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš, A., Habjanič, K. y Matošić, S. (2010). «Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria». *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.
- Uhart, M., Ravishankar, S. y Marks, N.D. (2004). «Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4 degrees». *Journal of Food Protection*, 67(10), 2296-2301.
- Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P. y Coppola, S. (1993). «Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*». *The Journal of Applied Bacteriology*, 74, 380-387.
- Wu, C.W., Yin, L.J. y Jiang, S.T. (2004). «Purification and characterization of bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1146-1151.
- Ying, L-Y., Wu, C-W. y Jiang S-T. (2007). «Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerates seafood». *Japanese Society of Fisheries Science*, 73, 907-912.
- Zottola, E.A., Yezzi, T.L., Ajao, D.B. y Roberts R.F. (1994). «Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods». *International Journal of Food Microbiology*, (1-2), 227-238.
- Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I. y Hamida, J.B. (2010). «A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins». *Protein Journal*, 29(6), 432-43.



4

Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados

A. R. Juárez-Roldán y M. T. Jiménez-Munguía

Los probióticos son bacterias que aportan diversos beneficios al ser humano, como prevención de enfermedades gastrointestinales, disminución de la intolerancia a la lactosa, estimulación del sistema inmune, entre otros, siendo su sitio de acción, específicamente, el intestino. Estos beneficios son atribuidos a la producción de ácido, bacteriocinas, competencia con bacterias patógenas y mejoras en el sistema inmune (Krasaekoopt *et al.*, 2004). Para que ejerzan efectos benéficos en la salud, se requiere que estén presentes en el producto, en el momento de su consumo, en un nivel de al menos 10^7 UFC por gramo o mililitro de alimento (Özer *et al.*, 2008; Ding y Shah, 2007; Nejati *et al.*, 2011).

Las bacterias que tienen actividad probiótica reportada son las pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Krasaekoopt *et al.*, 2002), ya que cumplen con criterios de seguridad, estabilidad y funcionalidad. Estos géneros de bacterias presentan viabilidad en productos alimenticios debido a su resistencia ante la acidez (Gbassi y Vandamme, 2012).

La encapsulación de los probióticos a través de diversas técnicas como gelificación, secado por atomización o emulsión, pueden mejorar la supervivencia de dichas bacterias, ya que a través de esta técnica se protegen de condiciones adversas, tanto de producción y almacenamiento de productos alimenticios, como de relación con el paso a través del tracto gastrointestinal. Después del proceso de encapsulación, es importante comprobar la liberación y viabilidad de los probióticos en modelos experimentales que simulen las condiciones gas-

trointestinales, tanto en medios ácidos como en presencia de enzimas (Gbassi y Vandamme, 2012).

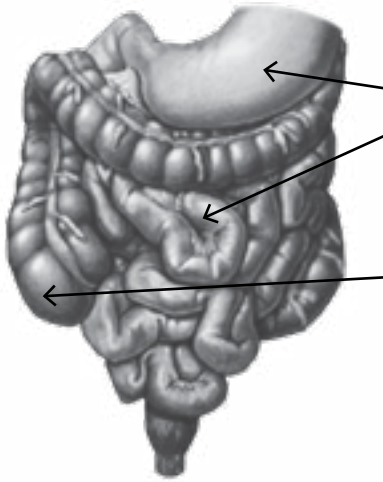
En este artículo se abordarán las condiciones gastrointestinales modelo, que simulan el tracto gastrointestinal, para evaluar la supervivencia de los probióticos encapsulados.

4.1 MODELOS GASTROINTESTINALES

El tracto gastrointestinal (TGI) está integrado por las siguientes partes: boca, faringe, esófago, estómago, intestinos delgado y grueso, recto y ano, las cuales se presentan en la figura 4.1. El intestino delgado está compuesto por el duodeno, yeyuno e íleon y el intestino grueso está formado por el colon ascendente, transverso y descendente (Mataix-Verdú, 2009; Prakash *et al.*, 2011).

Es importante mencionar la composición principal de las secreciones gástrica, intestinal, biliar y pancreática del TGI. La primera está constituida principalmente de HCl, pepsina (la cual se activa a un pH óptimo de 3) y electrolitos como K^+ , Na^+ , Mg^{++} , fosfato (PO_4^{-3}) y sulfato (SO_4^{-2}). La segunda está integrada por HCO_3^- y K^+ . La tercera secreción está constituida por Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- y bilis (la cual está integrada por ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol). Por último, la secreción pancreática está compuesta mayoritariamente por Na^+ y HCO_3^- , aunque también en una cantidad mínima por K^+ y Cl^- , además de enzimas como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, proelastasas y lipasas (Mataix-Verdú, 2009).

Para poder valorar la liberación, viabilidad y resistencia de los probióticos encapsulados se han propuesto modelos gastrointestinales que simulan las condiciones del TGI, los cuales se clasifican en modelo convencional y modelos dinámicos. Estos últimos, se diferencian del primero por ser continuos.



Partes del tracto gastrointestinal	pH	Contenido
Estómago	1-2	HCl, pepsina y moco
Intestino delgado	6-7	Enzima pancreática, sales biliares, moco y bicarbonato
Duodeno		
Yeyuno		
Íleon		
Intestino grueso	5-7	Bicarbonato y moco
Colon ascendente		
Colon transverso		
Colon descendente		

Fuente: Wood y Grusak, 2007.

Figura 4.1

Partes del tracto gastrointestinal, pH y contenido

Adaptado de Prakash *et al.*, 2011.

4.1.1 Modelo convencional

El modelo convencional simula las condiciones del estómago o intestino, de manera independiente y consiste de un sólo reactor o recipiente de vidrio con agitación y temperatura (37 °C) (Gbassi y Vandamme, 2012). Se le denomina convencional debido a que la gran mayoría de las investigaciones de resistencia de probióticos encapsulados lo utilizan e incluso es definido por la United States Pharmacopeial Convention (1989).

De manera más amplia, el modelo consiste en simular las condiciones de la digestión dividiéndola en tres fases: la gástrica, entérica y entérica final.

En la primera fase, el medio que más se utiliza es NaCl (2 a 5 g/L), para tener un medio isotónico y así mantener la integridad y viabilidad de los microorganismos. Además de mantener un pH del fluido gástrico de uno a tres intervalos de pH en el estómago de los seres hu-

manos (Gbassi y Vandamme, 2012); para el ajuste del pH se utiliza HCl 0.1 M. Con frecuencia, a este fluido se le adiciona pepsina (0.3 a 3 g/L) (Chávarri *et al.*, 2010; Nejati *et al.*, 2011; Ortakci *et al.*, 2012; Soodbakhsh *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012) y ocasionalmente se adiciona lipasa (0.9 mg/L) (Nejati *et al.*, 2011). Por último, el tiempo de exposición de los probióticos encapsulados en este medio es de hasta 120 minutos (Gbassi y Vandamme, 2012).

Para la fase entérica, el medio más utilizado contiene sales de sodio como Na_2HPO_4 (Gbassi y Vandamme, 2012). Otros autores, como Chávarri *et al.* (2010), sugieren utilizar una solución de NaCl (6.5 g/L), KCl (0.8 g/L), CaCl_2 (0.2 g/L) y NaHCO_3 (1.4 g/L), mientras que Krasaekoopt *et al.* (2004) sugieren una solución de KH_2PO_4 0.05 M y Zhao *et al.* (2012), una solución de glucosa (10 g/L) y extracto de levadura (5 g/L). El rango de pH utilizado para este fluido es de 6 a 8 y bilis (1 a 10 g/L) y algunos autores (Nejati *et al.*, 2011; Soodbakhsh *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012) sugieren adicionar enzimas pancreáticas (1 a 10 mg/L). Por otra parte, otros autores sugieren que la fase entérica se lleve a cabo en una solución de leche descremada (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), cisteína (0.05 g/L) y 1% de bilis (Picinin De Castro-Cislaghi *et al.*, 2012; Fritzen-Freire *et al.*, 2013). El tiempo de exposición utilizado para esta fase es de 120 minutos. Y en la fase entérica final, Nejati *et al.* (2011) y Soodbakhsh *et al.* (2012) proponen utilizar las mismas condiciones de la fase entérica pero ajustando el pH de 6.7 a 7.5 con un tiempo de exposición de 120 minutos. Sin embargo, Zhao *et al.* (2012) proponen utilizar pectina (4 g/L), glucosa (0.8 g/L), almidón (6 g/L), extracto de levadura (2 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L) y agua fecal esterilizada por filtración con un tamaño de poro de 0.22 μm y con un tiempo de exposición de 24 horas.

4.1.2 Modelos dinámicos

Existen dos modelos dinámicos, los cuales son simuladores del TGI humano y consisten de un reactor para cada parte del tubo digestivo (estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente) (Afkhami *et al.*, 2007), donde la temperatura (37°C)

es controlada al igual que el pH. El primer modelo consiste en tomar una alícuota de la fase gástrica y ésta se adiciona a la fase entérica o se modifica el pH del vaso que contiene el fluido gástrico (Zhao *et al.*, 2012). En el segundo modelo, los reactores se mantienen con agitación y temperatura constante y el flujo se genera a través de una bomba peristáltica (semiautomatizado) (Gbassi y Vandamme, 2012). Ejemplos de este modelo son: a) simulador del ecosistema microbiano del intestino humano denominado SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) (el cual se abordará con más detenimiento debido a que se ha utilizado para determinar la liberación y resistencia de los probióticos encapsulados) y b) modelo gastrointestinal TIM por sus siglas en holandés. El primero fue desarrollado por Molly, Van de Woestyne y Verstraete en el año 1993, en Bélgica, mientras que el segundo fue desarrollado por la Organización Holandesa de Investigación Científica Aplicada, TNO por sus siglas en holandés, en específico por los investigadores Havenaar y Minekus en el año 1996 en Holanda.

El SHIME se desarrolló para estudiar la interacción de la microbiota intestinal con el colon. En un principio contaba con cinco reactores que simulaban las condiciones del intestino delgado y grueso; posteriormente De Boever *et al.* (2001), le adicionaron un reactor más que simula el estómago. En la figura 4.2 se puede observar cómo se encuentra conformado este modelo.

La principal característica del SHIME es la simulación del paso del quimo (al que se le adicionan los probióticos encapsulados) por el TGI, mediante la adición controlada de enzimas gástricas, pancreáticas e intestinales, así como también de bilis, el control de pH, temperatura, composición del alimento, ambiente anaeróbico, tiempo de tránsito por el TGI y adición de microbiota humana (Yoo y Chen, 2006).

El primer reactor simula las condiciones del estómago y el segundo las del duodeno; ambos simulan las condiciones de digestión de alimentos. La función principal del primer reactor se basa en el llenado y drenaje de 300 mL de solución de leche en polvo (15 g/L), pectina (16 g/L), mucina (8 g/L), almidón (5 g/L), glucosa (1 g/L), y 10 mL de sobrenadante de una suspensión compuesta de una dieta occidental humana (20 g de una mezcla de comida normal en 80 mL de una so-

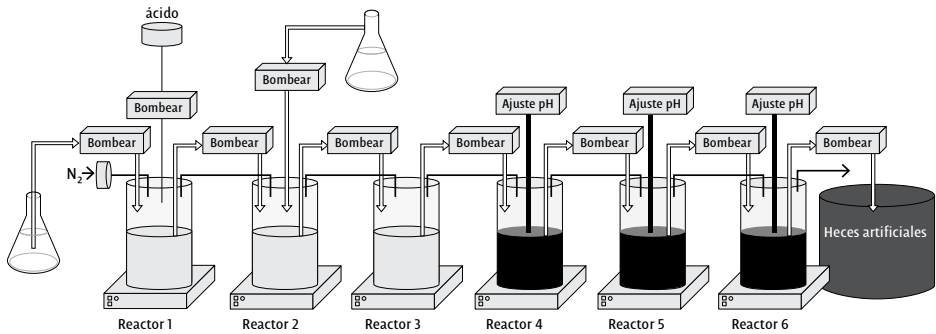


Figura 4.2

Diagrama de modelo dinámico denominado SHIME

Adaptado de Yoo y Chen, 2006.

lución fisiológica) a un pH de 2 (ajustado con HCl 1 M), con un tiempo de residencia de dos a tres horas y una agitación de 150 rpm con agitador magnético (De Boever *et al.*, 2001). El segundo reactor contiene la solución anterior y se le adiciona el jugo pancreático, con la finalidad de neutralizar la acidez de la solución contenida del primer reactor a un pH de 7.5, con un tiempo de residencia de cuatro horas. Este jugo contiene NaHCO_3 (12 g/L), pancreatina (0.9 g/ compuesta por enzimas pancreáticas como tripsina, amilasa y lipasa) además de bilis de buey (constituida por colesterol, lecitina, ácido tourocólico y ácido glicólico) y es adicionado a este reactor a una velocidad de 100 mL/h (Alander *et al.*, 1999; De Boever *et al.*, 2001). El tercer reactor simula las condiciones del yeyuno, contiene 300mL de la mezcla anterior a un pH de 6.5 a 7, con un tiempo de residencia de cuatro horas. Por último, los tres reactores restantes simulan la microbiota del colon, ya que se les inocula una mezcla con 50 mL de una suspensión fecal al 20% con un amortiguador de fosfato de sodio, se agita continuamente a 150 rpm por medio de agitadores magnéticos, en condiciones anaeróbicas mediante la inyección de N_2 en el espacio de cabeza de los reactores, dos veces al día durante quince minutos. Para controlar el pH se utilizan HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M y la temperatura a 37 °C es regulada por un termostato (Possemiers *et al.*, 2004). El cuarto reactor simula el colon

ascendente, contiene una mezcla de 1000 mL con un pH de 5.5 a 6.0; el tiempo de exposición es de veinte horas. El quinto reactor simula el colon transverso, con una mezcla de 1600 mL a un pH de 6.0 a 6.4, con un tiempo de residencia de 32 horas. Y el sexto reactor simula el colon descendente, con una mezcla de 1200 mL a un pH de 6.4 a 6.8, con un tiempo de estancia de 24 horas (Molly *et al.*, 1993; De Boever *et al.*, 2001; Van de Wiele *et al.*, 2004).

Existen algunos estudios (Martoni *et al.*, 2007; Urbanska *et al.*, 2007; Martoni *et al.*, 2008) en donde se reporta el uso de este modelo con modificaciones para las condiciones del estómago e intestino delgado. Para las condiciones del estómago simulado con un pH 2 (ajustado con HCl 1 M) y alimento en suspensión que contiene almidón (3 g/L), pectina (2 g/L), mucina (4 g/L), arabinogalactano (1 g/L), xilano (1 g/L), extracto de levadura (3 g/L), peptona (1 g/L), glucosa (0.4 g/L) y cisteína (0.5 g/L), con un tiempo de exposición de una hora; las condiciones del intestino delgado (duodeno y yeyuno) simulado son NaHCO₃ (2.4 g/L), pancreatina (0.18 g/L) y sales biliares (0.5 g/L), con un tiempo de exposición de diez horas.

La principal ventaja del modelo dinámico es que tiene mejor simulación del TGI del humano, ya que es continuo y las soluciones que se utilizan para este proceso contienen enzimas, además los tiempos de residencia de un reactor a otro son mucho mayores que los de un modelo convencional.

4.2 SUPERVIVENCIA DE PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS POR DIFERENTES TÉCNICAS A CONDICIONES GASTROINTESTINALES

La encapsulación es una técnica que permite mejorar la supervivencia de los probióticos durante su paso por el TGI. Por lo anterior, en este apartado se abordará la supervivencia de los probióticos encapsulados por los métodos de gelificación, atomización y emulsión ante condiciones gastrointestinales modelo.

4.2.1 Probióticos encapsulados por gelificación

La encapsulación por la técnica de gelificación consiste en preparar una mezcla hidrocoloide con probióticos, la cual se alimenta en un extrusor, que generalmente es una jeringa. La presión ejercida sobre el émbolo de la jeringa hace que caiga el contenido en una solución, la cual permite su gelificación. La forma y tamaño de las perlas son iguales y muy estables (Gbassi y Vandamme, 2012). Es el método de encapsulación más popular, ya que es fácil de aplicar, porque garantiza una alta viabilidad de las células y es de bajo costo (Krasaekoopt *et al.*, 2002).

El material más utilizado para la mezcla hidrocoloide es el alginato (Zomorodi *et al.*, 2011), que es un heteropolisacárido lineal de ácido D- manurónico y de ácido L- gularónico que es extraído de diversos tipos de algas. Las concentraciones de alginato que se utilizan varían de 0.6% a 2% y para la solución gelificante se utiliza CaCl_2 . El diámetro de las perlas es, aproximadamente, de 2-3 mm; la esfericidad y el tamaño de éstas depende de la viscosidad de la solución de alginato de sodio, la distancia entre la jeringa y la solución de CaCl_2 , así como también del diámetro del orificio de la jeringa (Krasaekoopt *et al.*, 2002).

Entre los probióticos encapsulados por gelificación cuya resistencia ha sido determinada ante condiciones gastrointestinales modelo, están el *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium bifidum*. Y los materiales que se utilizan son alginato y mezclas de éste con quitosano y poli-L- lisina (Krasaekoopt *et al.*, 2004; Urbanska *et al.*, 2007; Martoni *et al.*, 2007; Martoni *et al.*, 2008; Chávarri *et al.*, 2010; Ortakci *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012) (tabla 4.1).

Krasaekoopt *et al.* (2004), encapsularon *L. acidophilus* y *L. casei*, utilizaron alginato para encapsular y realizaron doble encapsulamiento adicionando para la segunda cápsula el mismo alginato, quitosano o poli-L- lisina-alginato; sometieron a las bacterias encapsuladas a un modelo gastrointestinal convencional, obteniendo la mejor supervivencia utilizando alginato con quitosano. Sin embargo, Urbanska *et al.* (2007), con un modelo dinámico, obtuvieron una mejor supervivencia que Krasaekoopt *et al.* (2004), ya que en la fase gástrica la reducción fue de 1.8 ciclos logarítmicos y en la entérica de 0.2 ciclos logarítmicos.

Tabla 4.1 Supervivencia a condiciones gastrointestinales modelo de probióticos encapsulados por diferentes técnicas

Método de encapsulación	Modelo gastrointestinal	Probiótico	Materiales	Carga inicial (lo g UFC/g)	Supervivencia (log UFC/g)	Referencia						
Ceflificación	Convencional	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato	9.20 ^a 8.90 ^b	5.93 ^a 5.48 ^b	Krasaekoopt et al., 2004						
			Alginato-quitosano	9.00 ^a 9.04 ^b	6.76 ^a 6.20 ^b							
			Alginato-alginato	8.77 ^a 9.15 ^b	5.30 ^a 4.11 ^b							
			Alginato-poli-L-lisina-alginato	9.40 ^a 9.08 ^b	5.32 ^a 4.00 ^b							
			Sin encapsular	9.80 ^a 9.30 ^b	3.36 ^a 2.50 ^b							
	Dinámico			Alginato	8.25 ^a 8.25 ^b	5.80 ^a 8.24 ^b	Ortakci et al., 2012					
				Sin encapsular	9.01 ^a 9.08 ^b	<2.00 ^a 8.99 ^b						
				Alginato-quitosano	9.00 ^a 7.20 ^b	7.20 ^a 7.00 ^b						
		<i>Lactobacillus casei</i>			Alginato	9.82 ^a 9.95 ^b	4.63 ^a 3.96 ^b	Krasaekoopt et al., 2004				
					Alginato-quitosano	9.89 ^a 9.92 ^b	6.62 ^a 6.2 ^b					
					Alginato-alginato	10.00 ^a 9.89 ^b	4.34 ^a 3.83 ^b					
					Alginato-poli-L-lisina-alginato	9.90 ^a 10.23 ^b	4.20 ^a 3.85 ^b					
					Sin encapsular	10.04 ^a 9.82 ^b	4.04 ^a 2.36 ^b					
					<i>Lactobacillus gasseri</i>				Alginato-quitosano	>7.00 ^a 7.03 ^b	7.00 ^a 6.95 ^b	Chávarri et al., 2010.
									Sin encapsular	9.00 ^a 7.58 ^b	<1 ^a <1 ^b	

^a Fase gástrica, ^b Fase entérica y ^c Fase colónica.

Tabla 4.1 (Continuación)

Método de encapsulación	Modelo gastrointestinal	Probiótico	Materiales	Carga inicial (log UFC/g)	Supervivencia (log UFC/g)	Referencia
Gelificación	Dinámico	<i>Bifido bacterium bifidum</i>	Alginato- quitosano	>7.00 ^a 7.01 ^b	7.00 ^a 6.78 ^b	Chávarri <i>et al.</i> , 2010.
			Sin encapsular	9.00 ^a	<1 ^a	
		<i>Lactobacillus reuteri</i> DPC16	Alginato	8.70 ^a 7.70 ^b	7.70 ^a 6.00 ^b	Zhao <i>et al.</i> , 2012
		<i>Lactobacillus reuteri</i> BSH	Sin encapsular Alginato-poli-L-lisina-alginato	9.00 ^a 9.71 ^a 8.12 ^b	<1.00 ^a 6.86 ^a 9.00 ^b	Martoni <i>et al.</i> , 2008
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	Alginato-poli-Llisina-alginato	9.40 ^a 8.01 ^b	8.01 ^a 8.86 ^b	Martoni <i>et al.</i> , 2007
Atomización	Convencional	<i>Bifidobacterium</i> BB-12	Suero de leche Sin encapsular Leche en polvo descremada Sin encapsular	8.20 ^a 11.00 ^b 9.00 ^a 9.50 ^b 10.57 ^a 10.57 ^b 11.20 ^a 11.20 ^b	7.47 ^a 6.87 ^b 7.49 ^a 9.20 ^b 8.7 ^a 8.5 ^b 7.2 ^a 8.2 ^b	Picnin De Castro-Cislaghi <i>et al.</i> , 2012 Fritzen-Freire <i>et al.</i> , 2013
Emulsión	Convencional	<i>L. acidophilus</i>	Alginato, almidón de maíz, aceite de soya y Tween 80 al 1% Sin encapsular	9.13 ^a 9.13 ^b 9.13 ^a 9.13 ^b	7.42 ^a 7.81 ^b 4.19 ^a 5.31 ^b	Sabikhi <i>et al.</i> , 2010
	Dinámico	<i>L. acidophilus</i>	Alginato, aceite vegetal y Tween 80 al 1%	10.75 ^a	7.43 ^a	Ding y Shah, 2007
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		10.49 ^a	7.11 ^a	
		<i>Bifidobacterium longum</i>		10.63 ^a	6.45 ^a	
		<i>Lactobacillus salivarius</i>		10.86 ^a	6.14 ^a	
		<i>L. plantarum</i>		10.45 ^a	6.64 ^a	

^a Fase gástrica, ^b Fase entérica y ^c Fase colónica.

Tabla 4.1 (Continuación)

Método de encapsulación	Modelo gastrointestinal	Probiótico	Materiales	Carga inicial (log UFC/g)	Supervivencia (log UFC/g)	Referencia
Emulsión	Dinámico	<i>Lactobacillus paracasei</i>		10.34 ^a	6.41 ^a	Ding y Shah, 2007
		<i>Bifidobacterium lactis</i> BI-04		10.46 ^a	6.27 ^a	
		<i>B. lactis</i> BI-07		10.88 ^a	6.93 ^a	
Emulsión	Dinámico	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Goma xantana, aceite vegetal y Tween 80 al 1%	10.46 ^a	7.22 ^a	Ding y Shah, 2009
				10.50 ^b	6.30 ^b	
		<i>Bifidobacterium longum</i>		10.58 ^a	6.44 ^a	
				10.50 ^b	6.30 ^b	
		<i>L. salivarius</i>		10.30 ^a	6.23 ^a	
				9.90 ^b	5.80 ^b	
		<i>L. plantarum</i>		10.42 ^a	6.93 ^a	
				10.50 ^b	6.50 ^b	
		<i>L. acidophilus</i>		10.45 ^a	7.32 ^a	
	10.30 ^b	5.90 ^b				
<i>L. paracasei</i>	10.55 ^a	6.44 ^a				
	9.90 ^b	6.10 ^b				
<i>B. lactis</i> BI-04	10.53 ^a	6.28 ^a				
	10.20 ^b	5.90 ^b				
<i>B. lactis</i> Bi-07	10.42 ^a	6.96 ^a				
	10.20 ^b	6.20 ^b				

^a Fase gástrica, ^b Fase entérica y ^c Fase colónica

Zhao *et al.* (2012) y Martoni *et al.* (2008), encapsularon *Lactobacillus reuteri*; ambos utilizaron un modelo gastrointestinal dinámico, pero el segundo un modelo semiautomatizado. En la fase gástrica, Zhao *et al.* (2012), obtuvieron una mejor supervivencia del probiótico, ya que sólo tienen una reducción de un ciclo logarítmico, en comparación a los que obtuvieron Martoni *et al.* (2008). Esto es debido a que las características de las cepas no son iguales; es importante señalar que la cepa que utilizaron Zhao *et al.* (2012), es más resistente a niveles de pH bajos y a la acción de la pepsina. Sin embargo, en la fase enté-

rica Martoni *et al.* (2008), obtuvieron un incremento de 0.88 ciclos logarítmicos; esto es debido a que el probiótico cuenta con una enzima que hidroliza las sales biliares, lo cual evita que dichas sales afecten al *Lactobacillus reuteri* BBS.

4.2.2 Probióticos encapsulados por atomización

Este método es eficaz en la protección de los probióticos, por lo que es muy utilizado en la industria alimentaria. Consiste en atomizar una suspensión acuosa que contenga células probióticas; este material se esparce en forma de gotas con aire en un medio a altas temperaturas, dando como resultado una rápida evaporación del agua. La desventaja de esta técnica es la alta temperatura del aire (temperatura de entrada 100-170°C; de salida 45-105 °C) (Rokka y Rantamäki, 2010; Gbassi y Vandamme, 2012).

En los estudios revisados (tabla 4.1), Picinin De Castro-Cislaghi *et al.* (2012), y Fritzen-Freire *et al.* (2013), encapsularon *Bifidobacterium* BB-12 por el método de atomización usando diferentes materiales: el primero con suero de leche y el segundo con leche en polvo descremada reconstituida. En ambos casos, la supervivencia fue evaluada en un modelo convencional y presentó un valor superior a 6.85 log UFC/g. Al comparar la reducción en ciclos logarítmicos, se observó que el suero de leche fue mejor encapsulante que la leche en polvo descremada reconstituida, ya que en la fase gástrica las bacterias encapsuladas con el primero presentaron una reducción de 0.73 ciclos logarítmicos, mientras que la reducción de las encapsuladas con la segunda fue de 1.87 ciclos logarítmicos; esto indica que la encapsulación con suero de leche ayuda con la supervivencia del probiótico, ya que esta bacteria es sensible a valores de pH bajos. Sin embargo, en la fase entérica la leche en polvo descremada reconstituida fue mejor encapsulante, ya que las bacterias presentaron una reducción de 2.07 ciclos logarítmicos, mientras que las encapsuladas con suero e leche tuvieron una reducción de 4.13 ciclos logarítmicos.

4.2.3 Probióticos encapsulados por emulsión

La encapsulación por emulsión está formada por dos fases: dispersa y continua. La primera generalmente es una suspensión que contiene un polímero (carragenina, goma de algarrobo, alginato, quitosano, gelatina, pectina o carboximetilcelulosa) con probióticos, y la segunda es un gran volumen de aceite vegetal que puede ser de soya, girasol, canola o maíz. Para estabilizar la emulsión se requiere adicionar un emulgente (por lo general Tween 80 al 0.2%), el cual reduce la tensión superficial entre las cápsulas. Para preparar la emulsión, la mezcla es homogenizada por medio de agitación continua; este paso es fundamental, ya que la velocidad de la agitación afecta la forma y el tamaño de las cápsulas (este último varía entre 25 μm y 2 mm). Las cápsulas obtenidas presentan formas y tamaños desiguales, pero son 100 veces más pequeñas que las perlas obtenidas por el método de gelificación (Krasaekoopt *et al.*, 2002; Soccol *et al.*, 2010; Gbassi y Vandamme, 2012).

Las desventajas de este método son la inestabilidad de la emulsión y la necesidad de agitación vigorosa, la cual puede resultar perjudicial para la supervivencia de los probióticos (Gbassi y Vandamme, 2012).

Entre los probióticos encapsulados por emulsificación cuya resistencia ha sido determinada ante condiciones gastrointestinales modelo, están *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *B. lactis* BI-04 y *B. lactis* BI-07 (Ding y Shah, 2007; Ding y Shah, 2009; Sabikhi *et al.*, 2010) (tabla 4.1).

Los modelos gastrointestinales usados para evaluar la resistencia de los probióticos encapsulados por este método fueron el convencional (Ding y Shah, 2007, 2009) y el dinámico (Sabikhi *et al.*, 2010). El probiótico encapsulado en los dos estudios referidos fue el *Lactobacillus acidophilus*. La mayor supervivencia en la fase gástrica se observó en el probiótico encapsulado con alginato y almidón de maíz. En la fase entérica, las condiciones utilizadas por Ding y Shah (2007, 2009) para evaluar la supervivencia fueron 3% de bilis con un tiempo de exposición de cuatro horas y obtuvieron una reducción de 4.4 ciclos logarítmicos. En cambio, Sabikhi *et al.* (2010), proponen la utilización de

1% de bilis durante tres horas; bajo estas condiciones se observa que el probiótico encapsulado con alginato y almidón de maíz tiene una mayor supervivencia con respecto a la obtenida por Ding y Shah (2007, 2009), ya que la reducción fue de 1.32 ciclos logarítmicos. Es importante destacar que la concentración de bilis que utilizaron Ding y Shah (2007, 2009) se aproxima a la que se requiere para la digestión en el sistema digestivo humano (2-3%) (Mataix-Verdú, 2009); sin embargo, Sabikhi *et al.* (2010) utilizaron un modelo dinámico y los resultados de supervivencia de los probióticos encapsulados son más representativos.

CONCLUSIONES

En este artículo se abordaron las condiciones gastrointestinales modelo, que simulan el tracto gastrointestinal, para evaluar la supervivencia de los probióticos encapsulados. La aplicación del modelo dinámico es mejor que el modelo convencional, ya que tiene mayor similitud con el tracto digestivo del humano obteniendo resultados válidos sin utilizar modelos *in vivo*, por tal motivo se recomienda su uso. Sin embargo, el modelo dinámico (SHIME) es difícil de aplicar debido a su complejidad con respecto a un modelo convencional.

REFERENCIAS

- Afkhami, F., Ouyang, W., Chen, H., Lawuyi, B., Lim, T. y Prakash, S. (2007). «Impact of orally administered microcapsules on gastrointestinal microbial flora: in-vitro investigation using computer controlled dynamic human gastrointestinal model». *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 35, 359-375.
- Alander, M., De Smet, I., Nollet, L., Verstraete, W., Von Wright, A. y Mattila-Sandholm, T. (1999). «The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)». *International Journal of Food Microbiology*, 46, 71-79.

- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R. e Ibáñez, C. (2010). «Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions». *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185-189.
- De Boever, P., Wouters, R., Vermeirssen, V., Boon, N. y Verstraete, W. (2001). «Development of a six-stage culture system for simulating the gastrointestinal microbiota of weaned infants». *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13, 111-123.
- Ding, W. y Shah, N. (2007). «Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria». *Journal of Food Science*, 72(9), M446-M450.
- Ding, W. y Shah, N. (2009). «Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria». *Journal of Food Science*, 74(2), M100-M107.
- Fritzen-Freire, C., Prudêncio, E., Pinto, S., Muñoz, I. y Amboni, R. (2013). «Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium BB-12* exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments». *LWT - Food Science and Technology*, 50, 39-44.
- Gbassi, G. y Vandamme, T. (2012). «Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut». *Pharmaceutics*, 4(1), 149-163.
- Havenaar, R. y Minekus, M. (1996). «Simulated Assimilation». *Dairy Industries International*, 6(9), 17-24.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2002). «Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt». Review. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
- 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». *International Dairy Journal*, 14, 737-743.
- Mataix-Verdú, J. (2009). *Tratado de Nutrición y Alimentación* (Vol. 1). Barcelona: OCEANO/ergon.
- Martoni, C., Bhatena, J., Jones, M., Urbanska, A., Chen, H. y Prakash, S. (2007). «Investigation of microencapsulated BSH active *Lactobacillus* in the simulated human GI tract». *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007(7), 1-9.

- Martoni, C., Bhatena, J., Urbanska, A. y Prakash, S. (2008). «Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract». *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 225-233.
- Molly, K., Van de Woestyne, M. y Verstraete, W. (1993). «Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem». *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 254-258
- Nejati, R., Gheisari, H. y Hosse, S. (2011). «Viability of encapsulated *Bifidobacterium lactis* (BB-12) in symbiotic of cheese and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions». *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 6(3/4), 197-204.
- Ortakci, F., Broadbent, J., McManus, W. y McMahon, J. (2012). «Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion». *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6274-6281.
- Özer, B., Uzun, Y. y Kirmaci, H. (2008). «Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during Kasar cheese ripening». *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 237-244.
- Picinin De Castro-Cislaghi, F., Dos Reis E. Silva, C., Beddin Fritzen-Freire, C., Goulart-Lorenz, J. y Sant'Anna, E. (2012). «*Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage». *Journal of Food Engineering*, 113, 186-193.
- Possemiers, S., Verthé, K., Uyttendaele, S. y Verstraete, W. (2004). «PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem». *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 495-507
- Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S. y Cantor, A. (2011). «The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells». Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, Article ID 981214, 1-12.
- Rokka, S. y Rantamäki, P. (2010). «Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications». *European Food Research and Technology*, 231, 1-12.

- Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D. y Kapila, S. (2010). «Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions». *Food and Bioprocess Technology*, 3, 586-593.
- Soccol, C., Vandenberghe, L., Spier, M., Medeiros, A., Yamaguishi, C., Lindner, J., Pandey, A. y Thomaz-Soccol, V. (2010). «The potential of probiotics: a review». *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Soodbakhsh, S., Gheisari, H., Aminlari, M. y Dehnavi, T. (2012). «Viability of encapsulated *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* in symbiotic frozen yogurt and their survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions». *International Journal of Probiotics*, 7 (3/4), 121-128.
- United States Pharmacopeial Convention. (1989). *U.S. pharmacopeia. by authority of the United States Pharmacopeial convention, Inc.* (22a. ed.) Washington: Committee of revision and published by the board of Trustees.
- Urbanska, A. M., Bhatena, J. y Prakash, S. (2007). «Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85, 884-893.
- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H. y Verstraete, W. (2004). «Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem». *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 143-153.
- Yoo, J. y Chen, X. (2006). «GIT physicochemical modeling a critical review». *International Journal of Food Engineering*, 2(4), 1-10.
- Zhao, Q., Mutukumira, A., Lee, S., Maddox, I. y Shu, Q. (2012). «Functional properties of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 during and after passage through a simulated gastrointestinal tract». *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 61-70.
- Zomorodi, S., Asl, A., Rohani, S. y Miraghaei, S. (2011). «Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration». *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 84-91.



Mecanismos de inestabilidad y métodos de estabilización de emulsiones múltiples

H. A. Peredo-Luna y M. T. Jiménez-Munguía

Las emulsiones múltiples pueden aplicarse dentro del área de los alimentos como una técnica de encapsulación para proteger compuestos sensibles, enmascarar sabores y olores, o como una estrategia para la formulación de productos reducidos en grasa.

Las emulsiones múltiples, o dobles, son sistemas coloidales en los que una emulsión simple se dispersa en una tercera fase para formar una nueva emulsión. Estos sistemas se componen de tres fases y, por esto, de dos tipos diferentes de interfaz, por lo que la inestabilidad termodinámica de estos sistemas es mayor, lo que causa que las fases tiendan a separarse con más facilidad, en comparación con las emulsiones simples. La pérdida de estabilidad provoca cambios en las características o propiedades de las emulsiones múltiples, lo que puede hacer que éstas dejen de cumplir con el propósito para el que fueron hechas. Por ejemplo, si el objetivo es proteger un compuesto sensible, la inestabilidad puede promover la migración del compuesto de la fase interna a la fase externa y en algunos casos causar su degradación. La aplicación y el éxito industrial y comercial de las emulsiones múltiples dependen, por tanto, de su estabilidad.

La inestabilidad de las emulsiones múltiples se da a través de diferentes mecanismos que ocurren simultáneamente, algunos análogos a los de las emulsiones simples, como la coalescencia. Estos mecanismos dependen de la composición y microestructura de las emulsiones múltiples y están relacionados fundamentalmente con fenómenos de transferencia de masa, gradientes en la presión osmótica y propiedades como la viscosidad y el pH. Por todo lo anterior, en esta revisión se

describirán estos mecanismos, sus causas y sus efectos; junto con los métodos y estrategias principales para contrarrestarlos.

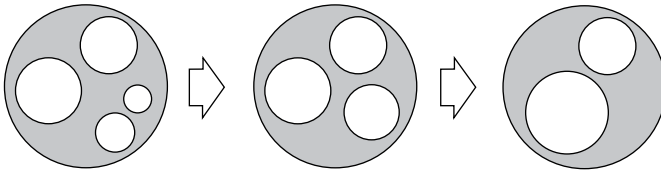
5.1 DEFINICIÓN DE EMULSIONES MÚLTIPLES

Las emulsiones múltiples, o dobles, son sistemas coloidales en los que una emulsión simple se dispersa en otra fase para formar una nueva emulsión. En general, se distinguen dos tipos de emulsiones múltiples: (a) agua en aceite, en agua (W/O/W, por sus siglas en inglés) y (b) aceite en agua, en aceite (O/W/O, por sus siglas en inglés). Explicado más detalladamente, una fase acuosa interna, W1, dispersa en una fase intermedia de aceite, O, forman lo que se conoce como emulsión primaria (W1/O); ésta es a su vez dispersada en una fase acuosa externa, W2, para formar así una emulsión múltiple W1/O/W2. Las emulsiones múltiples de tipo O1/W/O2 se forman de manera análoga. Estos sistemas se componen de tres fases y, por lo tanto, de dos tipos diferentes de interfaz; la de las gotas internas y la de las gotas externas, que al ser de naturaleza distinta requieren de un agente estabilizador o emulgente diferente. Debido a todo lo anterior, la inestabilidad termodinámica de estos sistemas es mayor, lo que causa que las fases tiendan a separarse con más facilidad, en comparación con las emulsiones simples (Dickinson, 2011).

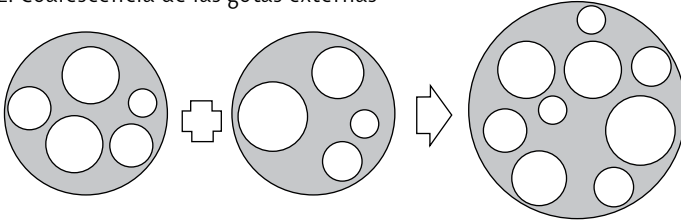
5.2 MECANISMOS DE INESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES MÚLTIPLES

En general se distinguen cuatro mecanismos predominantes de inestabilización: coalescencia de las gotas internas, coalescencia de las gotas externas, coalescencia de las gotas internas con la interfaz externa y migración de líquido entre las fases interna y externa. Estos se ilustran en la figura 5.1 y se describirán en las subsecciones siguientes. Du-

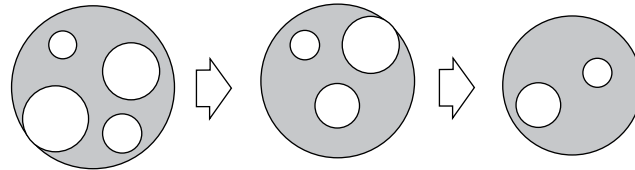
1. Coalescencia de las gotas internas



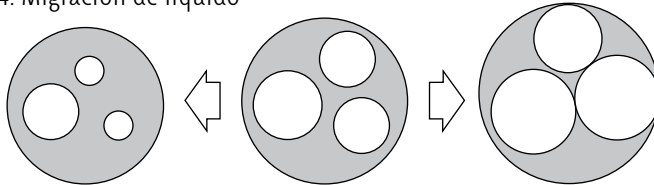
2. Coalescencia de las gotas externas



3. Coalescencia de las gotas internas / fase externa



4. Migración de líquido



Contracción

Hinchamiento

Figura 5.1

Principales mecanismos de inestabilidad de las emulsiones múltiples

Adaptado de Dickinson, 2011.

rante el desarrollo de los temas se tomará el caso de emulsiones múltiples del tipo W/O/W como ejemplo para ilustrar los mecanismos.

5.2.1 Coalescencia de las gotas internas

La coalescencia ocurre cuando dos gotas adjuntas se unen en una sola entidad más grande debido a la ruptura de la membrana o película de la interfaz que las separa. Durante el desarrollo de este mecanismo no hay cambio en la interfaz de las gotas externas (Appelqvist *et al.*, 2007; Dickinson, 2011).

El adelgazamiento de la película provoca su ruptura y depende de la hidrodinámica relativa dentro de la película y de factores como: las propiedades reológicas de la fase en la que están dispersas las gotas, la concentración de la fase dispersa y la estabilización efectiva de las gotas y su capacidad de mantener la distancia entre las gotas. La ruptura interfacial depende de las propiedades mecánicas de la película y está influenciada por el cizallamiento, las condiciones de esfuerzo cortante y la temperatura (Appelqvist *et al.*, 2007). Esto produce un crecimiento desigual de gotas internas, que podría derivar hacia otro mecanismo de inestabilidad, la coalescencia de las gotas internas con la interfaz externa (Chávez-Páez *et al.*, 2012). Un sistema W/O/W pierde estabilidad cuando se agregan cantidades considerables de agentes hidrófilos (Jiao y Burges, 2003; Schmidts *et al.*, 2010). Las investigaciones sugieren que tales concentraciones aceleran la coalescencia de las gotas internas (Pays *et al.*, 2001).

5.2.2 Coalescencia de las gotas externas

Este mecanismo es análogo a lo que ocurre en las emulsiones simples, las gotas externas se unen en un proceso irreversible que crea unidades de mayor tamaño. El efecto de la gravedad sobre estas gotas más grandes puede llevar a la separación de las fases de la emulsión múltiple; produciendo «cremosidad», lo que en inglés se denomina como «creaming», que es la formación de una capa cremosa en la superficie o sedimentación, en el caso contrario, en el que la capa separada se

asienta (Appelqvist *et al.*, 2007; Dickinson, 2011). Este fenómeno sucede cuando la repulsión entre las gotas es muy débil, la tensión interfacial y la viscosidad son bajas, y la película de la interfaz es poco elástica (Friberg y Yang, 1996; Bergenståhl y Claesson, 1997).

5.2.3 Coalescencia de las gotas internas con la interfaz externa

En este caso las gotas internas coalescen con la interfaz de las gotas externas, lo que conduce a la transferencia de materia de la fase interna hacia la fase continua externa. Esto puede ser causado por una inestabilidad en la interfaz debida a la migración de un exceso de surfactante hidrofílico hacia la fase interna, provocando la apertura y liberación repentina del contenido de la gota a la fase continua; también se puede observar este fenómeno cuando hay una cantidad grande de gotas internas en contacto con la interfaz externa (Chávez-Páez *et al.*, 2012); y cuando la diferencia de tamaño entre las gotas internas y las gotas externas es muy grande, de aproximadamente diez veces, a bajas concentraciones del emulgente hidrofílico en emulsiones W/O/W (Pays *et al.*, 2001). Durante este proceso puede presentarse también la ruptura de la interfaz de las gotas externas (Garti y Lutz, 2004; Dickinson, 2011).

5.2.4 Migración de líquido entre la fase interna y la fase externa

Este mecanismo se da como resultado de la transferencia de masa desde o hacia las gotas internas. Para explicarlo, se considera que la fase intermedia de una emulsión múltiple es una especie de membrana líquida que separa las fases interna y externa. Entonces, la migración de líquido es consecuencia del intercambio difusivo entre las fases a través de la membrana líquida, en la que la dirección depende del gradiente en la presión osmótica (Dickinson, 2011). Por lo que la gota interna puede sufrir contracción cuando la fase interna tiene una presión osmótica menor a la de la fase externa y el líquido fluye a través de la membrana hacia la fase externa; o hinchamiento cuando ocurre

lo contrario. Si el hinchamiento sucede más allá de un tamaño crítico se rompe la membrana líquida y hay coalescencia con la fase externa.

El gradiente en la presión osmótica puede ser impulsado por la existencia de diferentes moléculas en cada una de las fases, interna y externa, o por la diferencia de concentraciones entre ellas (Garti y Lutz, 2004).

5.3 MÉTODOS DE ESTABILIZACIÓN: MECANISMOS Y ESTRATEGIAS

Las emulsiones múltiples son estabilizadas por diferentes métodos y estrategias dependiendo de los objetivos de su aplicación.

5.3.1 Mecanismos

5.3.1.1 Estabilización electrostática

Este principio está relacionado con el efecto que las fuerzas electrostáticas repulsivas tienen en las gotas de la emulsión. En las emulsiones múltiples las gotas dispersas tienen un mayor tamaño, por lo que el efecto de estas fuerzas es menos pronunciado (Garti y Lutz, 2004).

Para que ocurra la coalescencia de las gotas en una emulsión, éstas deben estar en contacto unas con otras, lo cual se conoce como floculación y, para evitarlo, las gotas pueden mantenerse separadas por la repulsión entre sus superficies cargadas. Biopolímeros con actividad superficial como las proteínas, los polisacáridos y sus complejos pueden proveer estabilidad electrostática, sus interacciones electrostáticas dependen de su concentración, el pH (punto isoeléctrico) y la fuerza iónica de la solución (Dickinson y Stainsby, 1988; Dickinson, 1989; Dickinson, 1998).

Cuando dos superficies o partículas cargadas idénticamente se aproximan en un medio fluido, generan una interacción repulsiva que, dependiendo de su magnitud, la distancia entre las superficies o partículas, y las fuerzas de atracción que puedan generarse, las mantendrá separadas. Estas interacciones representan una barrera de ener-

gía que ayuda a reducir la coalescencia de las partículas (Myers, 1996; Bergenståhl y Claesson, 1997).

Por ejemplo, las proteínas a valores de pH lejanos a su punto isoelectrico están cargadas eléctricamente y, por lo tanto, hay una repulsión electrostática que previene que las partículas se aproximen estrechamente unas a otras (Dickonson y McClements, 1996). Este fenómeno de estabilización suele ser débil; pero contribuye a la estabilización de emulsiones tomando en cuenta que sucede simultáneamente con la estabilización estérica y/o con otros métodos (Myers, 1996; Bergenståhl y Claesson, 1997).

Un parámetro indicativo de la carga superficial y, por lo tanto, de las interacciones electrostáticas de las partículas, es el potencial zeta. De acuerdo a ciertas investigaciones (Aoki *et al.*, 2005; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009), valores altos del potencial zeta ($> |40|$) indica una alta estabilidad de las emulsiones debido a que las partículas se encuentran a mayor distancia entre ellas.

5.3.1.2 Estabilización estérica

La estabilización estérica, o el impedimento estérico, es un factor dominante cuando se trata con polímeros anfífilos que se usan como surfactantes macromoleculares, que se adsorben en la interfaz externa. Estos polímeros pueden mejorar la estabilidad de las emulsiones múltiples y retardar el transporte a través de las interfaces, ya que forman películas gruesas (Garti y Lutz, 2004).

Se distinguen diferentes mecanismos principales: (a) la estabilización por agotamiento por macromoléculas no adsorbentes que previenen la colisión entre gotas y proporcionan elasticidad al sistema; (b) la repulsión electrostática entre dos gotas que llevan la misma carga (por efecto de un volumen de exclusión) (Dickinson, 1998); y (c) la estabilización como resultado de las interacciones hidrofóbicas entre los polímeros adsorbidos (Garti y Lutz, 2004).

Los polímeros anfífilos son adsorbidos en la interfaz y forman películas gruesas semi-sólidas que promueven la estabilidad y retardan el transporte hacia la fase externa; esta estrategia es muy prometedora, ya que además requiere de cantidades menores de surfactante

y éstos pueden ser macromoléculas de origen natural. En general, los polímeros hidrofóbicos estabilizan las gotas internas, mientras que los hidrofílicos estabilizan a las interfaces externas (Garti y Lutz, 2004).

Para aplicaciones en alimentos se recurre al uso de biopolímeros como proteínas y polisacáridos. Las investigaciones han llegado a buenos resultados mediante el uso de suero de albúmina de bovino, aislado de proteína de suero, caseínas, gelatina, maltodextrina, pectina y complejos con hidrocoloide como goma xantana, goma guar, goma arábica o goma de algarrobo (Garti y Lutz, 2004; Dickinson, 2011).

La estabilización por agotamiento se basa en la adición de agentes que aumentan la viscosidad y agentes gelificantes en una de las fases para reducir la movilidad de los ingredientes atrapados. Estos agentes no se pueden considerar como emulgentes, pero sí como estabilizantes y le proporcionan características de semi-sólido o tipo gel a las emulsiones. Las gomas pueden cumplir con esta función. Algunas de las propiedades que se ven afectadas son el tamaño de gota, la consistencia, la eficiencia o rendimiento de encapsulación, entre otros. La capa interfacial gruesa y la fase acuosa viscosa o gelificada podrían tener ventajas cuando se requiere la protección de compuestos sensibles adicionados. La presencia de hidrocoloides poliméricos en la fase interna acuosa, puede mejorar la estabilidad a la coalescencia y la estabilidad química (Garti y Lutz, 2004).

5.3.1.3 Estabilización mecánica

La vida de anaquel de las emulsiones múltiples puede mejorarse incorporando pequeñas partículas sólidas de surfactantes a las formulaciones. La idea es crear una barrera mecánica mediante la incorporación de partículas sólidas pequeñas adsorbidas en las interfaces (Garti y Lutz, 2004).

La mayor aplicación de este método de estabilización es en el campo farmacéutico. Estudios con celulosa microcristalina, arcilla hidrofólicamente modificada y partículas de sílice, indican que la adición de partículas sólidas mejora la estabilidad de emulsiones múltiples debido a que la interfaz en la que se adsorben se vuelve rígida. Estudios con partículas de sílice indican que la concentración de partículas, y

su carácter hidrofóbico o hidrofílico, afecta el tamaño de las gotas en emulsiones múltiples (Garti y Lutz, 2004).

5.3.2 Estrategias

5.3.2.1 Estabilización de la interfaz interna

Las estrategias más usadas para la estabilización de la interfaz interna son: la reducción del tamaño de gota, la formación de microemulsiones o microesferas y el incremento de la viscosidad de la fase acuosa, principalmente (Garti y Aserin, 1996).

En investigaciones conducidas en años recientes, se ha estudiado la forma de controlar el tamaño de gota y las propiedades de emulsiones múltiples a través de la manipulación de la presión osmótica. Esto se logra por la diferencia en la concentración de electrolitos o solutos entre la gota interna y la fase externa o al poner en contacto la emulsión con una solución. Este método, usado generalmente en microencapsulación, puede usarse para reducir el tamaño de gota o para lograr su efecto contrario (Pistel y Kissel, 2000; Tu y Lee, 2012). Así pues, la incorporación de electrolitos, azúcares y polisacáridos para controlar el balance osmótico es una estrategia esencial para mantener la estabilidad termodinámica de las emulsiones W/O/W (Dickinson, 2011).

Dickinson (2011) hizo una revisión de los biopolímeros alimentarios que se han investigado en la estabilización de emulsiones primarias de sistemas W/O/W, en la que incluye albúmina de suero bovino, gelatina, caseína, proteína de suero, proteína de haba, goma arábiga, goma xantana y celulosa microcristalina. Este autor destaca la eficiencia del caseinato de sodio (0.5% p/p) en combinación con éster poliglicerol de ácido poliricinoleico, como emulgente lipofílico (2% p/p).

El uso del éster poliglicerol de ácido poliricinoleico está restringido para muchas aplicaciones en productos alimentarios. Una alternativa efectiva y legalmente aceptable es el uso de lecitina (Dickinson, 2011). En emulsiones W/O, concentraciones de 2.5% de lecitina han demostrado proporcionar una buena estabilidad, la cual se relaciona con la alta viscosidad que desarrollan tales emulsiones (Muschiolik *et al.*, 2006). El tamaño de gota en estas emulsiones puede ser reducido

cuando la fase acuosa contiene aislado de proteína de suero (1.5%) y goma xantana (0.2%) (Knoth *et al.*, 2005b). Matsumoto *et al.* (1978), encontraron que con lecitina (8 a 10%)-Span 80 en la fase oleosa y con éster de sacarosa-ácido graso (SE 160) en la fase acuosa (0.2 a 1.0%), emulsiones múltiples W/O/W tienen buena estabilidad.

Otra estrategia es convertir las gotas internas de una emulsión W/O/W, en una especie de partículas sólidas suaves. Para ello se adicionan biopolímeros que puedan formar geles con la aplicación de calor, como aislado de proteína de suero o gelatina, y se someten las emulsiones primarias W/O a tratamientos, relativamente cortos, con temperaturas de alrededor de 80 °C. También puede usarse almidón gelificado y en este caso se requiere provocar enfriamiento para completar la gelación (Dickinson, 2011).

Las interfaces internas de emulsiones múltiples de tipo O/W/O mejoran su estabilidad al agregar conjugados o complejos proteína-polisacárido.

5.3.2.2 Selección de la fase intermedia

La fase intermedia no sólo debe seleccionarse apropiadamente, también puede modificarse incrementando su viscosidad, agregando portadores de carga o agentes complejos (Garti y Aserin, 1996).

El tipo de fase oleosa usado es determinante en la preparación de emulsiones W/O/W, ya que es responsable, en gran medida, de las características del sistema e influye en el patrón de liberación de los compuestos y la estabilidad. Mientras más alta sea la polaridad de un aceite, menor será su tensión interfacial lo que favorece más la transferencia de masa entre las fases interna y externa. Las fases oleosas usadas más frecuentemente son los hidrocarburos, los triglicéridos y los ésteres. Aunque los hidrocarburos mejoran la estabilidad de un sistema, no son adecuados para su aplicación en el área de alimentos. Sin embargo, algunos aceites vegetales y triglicéridos, proporcionan una buena estabilidad y las mezclas de éstos pueden mejorarla (Knoth *et al.*, 2005a; Özer *et al.*, 2006).

5.3.2.3 Estabilización de la interfaz externa

Las interfaces externas suelen estabilizarse mediante el uso de emulgentes poliméricos o agregando partículas coloidales sólidas para formar películas más fuertes y rígidas (Garti y Aserin, 1996).

Las proteínas son agentes emulgentes y estabilizadores efectivos en interfaces de tipo O/W, ya que son insolubles en la fase oleosa, por lo que no tienden a migrar. También es común añadir polisacáridos en concentraciones bajas como agentes espesantes y gelificantes. En la estabilización de emulsiones múltiples se han empleado diferentes tipos de emulgentes proteicos como caseinato de sodio, gelatina, albúmina de suero bovino, aislado de proteína de suero y algunos hidrocoloides como la goma arábiga. Entre los diferentes tipos de polisacáridos que se han investigado están la pectina, la carragenina, el alginato, la goma xantana, la goma de algarrobo y la carboximetilcelulosa (Dickinson, 2011).

Se ha encontrado que el caseinato de sodio reduce el tamaño de gota y que puede maximizar la eficiencia de encapsulación. La goma arábiga (Acacia de Senegal), por sus propiedades únicas de actividad superficial y emulgentes, permite alcanzar una buena estabilidad a largo plazo a concentraciones de alrededor del 10% (p/p) y proporciona estabilidad coloidal en un intervalo amplio de pH (Dickinson, 2011).

Los conjugados o complejos proteína-polisacárido, formados con calor seco controlado, mejoran la solubilidad de la proteína y la estabilidad bajo condiciones de pH bajo y alta fuerza iónica. Esto es debido al incremento de su carácter hidrofílico y mayor capacidad de estabilización estérica. Conjugados de caseína-dextrano o caseína-maltodextrina producen gotas W/O/W más pequeñas a valores de pH neutros y mejoran la estabilidad contra la coalescencia en condiciones ácidas, junto con una mayor eficiencia de encapsulación. Las mezclas de proteína-polisacárido que han sido investigadas recientemente son las de aislado de proteína de suero con goma xantana, galactomananos (goma de algarrobo, goma guar y goma de fenogreco), carboximetilcelulosa o pectina modificada, y concentrado de proteína de suero con goma arábiga, pectina o goma de mezquite (Jiménez-Alvarado *et al.*,

2009). Algunos de estos complejos han tenido éxito en la encapsulación de electrolitos (Dickinson, 2011).

CONCLUSIONES

Los mecanismos de inestabilización de las emulsiones múltiples dependen, en gran medida, de la naturaleza de sus componentes, fase interna, fase intermedia, fase externa, agentes emulgentes y estabilizantes, así como de las propiedades de éstos. En cuanto a la aplicación de una u otra estrategia de estabilización es importante tomar en cuenta los objetivos y propósitos del uso de las emulsiones, ya que pueden existir algunas restricciones. Por ejemplo, en el área de alimentos no se deben utilizar compuestos que puedan ser tóxicos o no aptos para el consumo humano, como los aceites derivados de hidrocarburos. Por último, las investigaciones en el uso de biopolímeros, como proteínas y polisacáridos, han demostrado buenos resultados en su aplicación para contrarrestar la inestabilidad de emulsiones múltiples.

REFERENCIAS

- Aoki, T., Decker, E.A. y McClements, D.J. (2005). «Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique». *Food Hydrocolloids*, 19, 209-220.
- Appelqvist, I.A.M., Golding, M., Vreeker, R. y Zuidam, N. J. (2007). «Emulsions as delivery systems in foods. En: J. M. Lakis (Ed)». *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (41-81). Iowa: Blackwell Publishing.
- Bergenståhl, B. A. y Claesson, P.M. (1997). «Surface forces in emulsions. En: S. E. Friberg y K Larsson (Eds). *Food emulsions* (57-109)». Tercera edición. Nueva York: Marcel Dekker, Inc.

- Chávez-Páez, M., Quezada, C.M., Ibarra-Bracamontes, L., González-Ochoa, H. O. y Arauz-Lara, J. L. (2012). «Coalescence in double emulsions». *Langmuir*, 28, 5934-5939.
- Dickinson, E. (1989). «Food colloids - an overview». *Colloids and surfaces*, 42, 191-204.
- Dickinson, E. (1998). «Stability and rheological implications of electrostatic milk protein- polysaccharide interactions». *Trends in Food Science and Technology*, 9, 347-354.
- Dickinson, E. (2011). «Double emulsions stabilized by food biopolymers». *Food Biophysics*, 6, 1-11.
- Dickinson, E. y Stainsby, G. (1988). *Advances in Food Emulsions and Foams*. Gran Bretaña: Elsevier applied science.
- Dickinson, E. y McClements, D. J. (1996). *Advances in Food Colloids*. Gran Bretaña: Blackie Academic and Profesional.
- Friberg, S. E. y Yang, J. (1996). «Emulsion stability». En: J. Sjöblom (Ed). *Emulsions and emulsions stability*(pp. 1-40). Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Garti, N. y Aserin, A. (1996). «Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants». *Advances in colloid and interface science*, 65, 37-69.
- Garti, N. y Lutz R. (2004). «Recent progress in double emulsions». En: D. N. Petsev. *Emulsions: Structure stability and interactions*(557-605).
- Jiao, J. y Burgess, D. J. (2003). «Rheology and stability on water-oil-water emulsions containing Span 83 and Tween 80». *The AAPS Journal*, 5 (1), 62-73.
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A. y Vernon-Carter, E. J. (2009). «Ferrous bisglycinate and release in w1/o/w2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes». *Food Hidrocolloids*, 23, 2425-2433.
- Knoth, A., Scherze, I. y Muschiolik, G. (2005a). «Effect of lipid type on water-in-oil-emulsions stabilized by phosphatidylcholine-depleted lecithin and polyglycerol polyricinoleate». *European Journal of Lipid Science and Technologie*, 107, 857-863.
- Knoth, A., Scherze, I. y Muschiolik, G. (2005b). «Stability of water-in-oil-emulsions containing phosphatidylcholine-depleted lecithin». *Food Hydrocolloids*, 19, 635-640.

- Matsumoto, S., Ueda, Y., Kita, Y. y Yonezawa, D. (1978). «Preparation of water-in-olive oil in-water multiple emulsions in an eatable form». *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(4), 739-43.
- Muschiolik, G., Scherze, I., Preissler, P., Weiss, J., Knoth, A. y Fechner, A. (2006). Multiple emulsions – preparation and stability. IUFoST, doi: 10.1051/IUFoST:20060043
- Myers, D. (1996). *Surfaces, interfaces and colloids: principles and applications*. EE.UU.: VCH Publishers.
- Özer, Ö., Aydin, B. y Yazan, Y. (2006). «Effect of oil type on stability of W/O/W emulsions». *Cosmetic and Toiletries magazine*, 121(7), 57-64.
- Pays, K., Giermanska, J., Pouligny, J., Bibette, J. y Leal-Calderon, F. (2001). «Coalescence in surfactant-stabilized double emulsions». *Langmuir*, 17(25), 7758-7769.
- Pistel K. F. y Kissel T. (2000). «Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using a w/o/w double emulsion technique». *Journal of Microencapsulation*, 17(4), 467-483.
- Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, G.-A., Paulus, N. y Runkel, F. (2010). «Multiple w/o/w emulsions-using the required HBL for emulsifier evaluation». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 372, 48-54.
- Tu, F. y Lee, D. (2012). «Controlling the stability and size of double-emulsion-templated poly (lactic-co-glycolic) acid microcapsules». *Langmuir*, 28, 9944-66.

6



Líquidos iónicos: una alternativa «verde» para procesos de extracción en la industria de alimentos

A. Franco-Vega, E. Palou, N. Ramírez-Corona,

A. López-Malo

La ciencia y tecnología de alimentos cuentan con una amplia variedad de procesos y análisis que requieren el uso de disolventes, ya sea para la separación de un compuesto para su posterior análisis o con el fin de extraer un componente de la matriz del alimento, el cual presenta por sí solo una aplicación. Si bien existen disolventes que han sido utilizados durante años, la mayoría de ellos son compuestos orgánicos volátiles que han demostrado ser una de las principales fuentes de contaminación del ambiente, y a su vez, representan un riesgo para la salud de quienes los manejan. Por otra parte, los rendimientos obtenidos con el uso de estos compuestos son relativamente bajos, lo que hace necesario incrementar los volúmenes utilizados y la energía aplicada durante la extracción, para obtener mejores resultados durante el proceso.

Desde hace algunos años, la industria está enfocada en el desarrollo de técnicas más ecológicas en las cuales se reduzca el uso de productos tóxicos y emisiones al medio ambiente. En estos «procesos verdes» también se promueve el uso de métodos de preparación de muestras que sean ecológicamente sustentables y que involucren el uso de disolventes menos contaminantes. Debido a esta necesidad es que se han desarrollado nuevos compuestos más amigables con el medio ambiente como una opción para reemplazar los compuestos contaminantes y peligrosos.

Los líquidos iónicos (LI) son sales compuestas por iones que existen en estado líquido a temperatura ambiente (Messali *et al.*, 2013). Estos compuestos poseen propiedades físicas y químicas únicas, como

bajos puntos de fusión, presión de vapor tan baja que es considerada nula y una alta estabilidad térmica (Liu *et al.*, 2011). Debido a su capacidad para disolver tanto solutos polares, como no polares (Freemantle, 2010), así como al hecho de que pueden ser adaptados estructuralmente para aplicaciones específicas, actualmente se ha incrementado su uso como una atractiva alternativa «verde» a los solventes orgánicos convencionales en distintas áreas, como lo son aplicaciones analíticas, síntesis orgánica, catálisis y separación, entre otras (Martín-Calero *et al.*, 2011).

Sin embargo, no todos los LI pueden ser considerados como «amigables» con el medio ambiente, y se ha encontrado que algunos de ellos pueden llegar a ser tóxicos (Matsumoto *et al.*, 2004b). Aunado a lo anterior, la falta de información acerca de sus propiedades fisicoquímicas y la evidencia de su susceptibilidad ante la presencia de impurezas, representan algunas de las desventajas del uso de estos compuestos.

Si bien es muy poca la investigación que existe a la fecha sobre el uso de LI en la ciencia y tecnología de alimentos, se ha reportado ya su potencial como solventes en la extracción de varios metabolitos secundarios importantes presentes en semillas, plantas y frutas, demostrando que tienen la capacidad de mejorar la selectividad y eficiencia de extracción al aplicarse en diferentes técnicas de separación (Dandan y Kyung Ho, 2011; Cao *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2013). Esta es la razón por la que se ha incrementado el interés en el estudio de su viabilidad para ser usados como una alternativa a los solventes tradicionales. Este artículo se enfoca a describir a los LI, y presentar algunas de sus aplicaciones, ventajas, desventajas y retos de su uso en la industria alimentaria.

6.1 EL USO DE DISOLVENTES EN LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

La mayoría de los ingredientes que son usados para la formulación de alimentos incluyendo a los aceites, grasas y proteínas, entre otros, son obtenidos de distintas fuentes biológicas por medio de una extracción y del uso de disolventes; de igual manera, la preparación de muestras para análisis bromatológicos, toxicológicos y/o en busca de contaminantes, depende del uso de un disolvente adecuado. Tanto las técnicas de análisis, como las de extracción, están fundamentadas en interacciones químicas en las cuales se busca que por medio de diferentes condiciones como tiempo, temperatura, presión, naturaleza y cantidad de disolvente, entre otros, se favorezca la obtención del analito o componente de interés (Wakelyn y Wan, 2001; Isengard y Breithaupt, 2009).

La eficacia de estas técnicas depende de varias condiciones, siendo la más importante la ocurrencia de una colisión, ya que si las especies en cuestión no están en contacto no pueden interactuar entre sí. Para que se produzca el contacto, ambas deben de encontrarse en la misma fase y, por tanto, deben ser solubles en el mismo medio (Clayden *et al.*, 2012). En la industria de alimentos la mayor parte de los procesos se efectúan en fase líquida entre compuestos que pueden disolverse a la vez en un mismo disolvente. De lo anterior se deduce el papel fundamental que desempeña el disolvente. Si para que haya una interacción es preciso que ambos reactivos se encuentren en la misma disolución, el disolvente será tan importante como el principio de la colisión (Clayden *et al.*, 2012).

De manera general, un disolvente es una sustancia que puede competir con las fuerzas intermoleculares que mantienen unidas las moléculas de un sólido (Gilbert y Martin, 2010). El disolvente más usado es el agua, debido a que posee un alto grado de polaridad y una constante dieléctrica alta, lo que le permite disolver sustancias iónicas o polares (Morrison y Boyd, 1998). Además de esto, su asequibilidad, facilidad de manipulación y amplio intervalo de temperatura y presión en el que se encuentra en estado líquido, la hacen particularmente

atractiva frente a otros disolventes. Sin embargo, el agua no es el único disolvente que se usa en las operaciones de análisis y extracción en la industria alimentaria, ya que no todas las reacciones son viables en disolución acuosa, sobre todo cuando se habla del tratamiento de matrices tan complejas como lo son los alimentos (Martín-Calero *et al.*, 2011).

Para el caso de los compuestos que no son solubles en agua, existe una amplia variedad de disolventes no polares que debido a sus fuerzas eléctricas de atracción débil, favorecen la disolución de estos compuestos (Riaño, 2007). Después del agua, los disolventes más utilizados en la ciencia y tecnología de alimentos son los compuestos volátiles de origen orgánico (CVO) (alcoholes, ésteres, cetonas, éter, hexano), los cuales tienen la capacidad de lograr una mayor recuperación del analito que los métodos físicos por los cuales anteriormente se extraían algunos compuestos (Wakelyn y Wan, 2001).

Una de las desventajas del uso de los CVO es que se pueden dispersar de manera fácil en el ambiente y muchos de ellos presentan alta toxicidad (Albishri y El-Hady, 2014). Otra de sus desventajas es que, a pesar de tener la capacidad de disolver algunos de los compuestos de interés, la selectividad y rendimientos en los procesos de extracción, obtenidos por medio de su uso, en algunos casos suelen ser aún muy bajos, por lo cual es necesario usar grandes volúmenes; al 2011 se estimaba que los solventes representaban el 35% de todos los compuestos orgánicos volátiles liberados en la atmósfera (Reichardt y Welton, 2011).

En los últimos años, el impacto que tienen los disolventes y sus residuos en el medio ambiente es un área de interés para la comunidad científica. Debido a esto, a partir de 1990 se introdujo el concepto de «química verde», con lo que se busca la reducción o eliminación del uso o generación de sustancias peligrosas en el diseño, manufactura y aplicación de productos químicos (Lancaster, 2010). La reducción o eliminación en el uso de solventes CVO son algunas de las metas de la «química verde», sin embargo, esto no siempre es posible, por lo que es necesario seleccionar disolventes que generen el menor daño al ambiente. Recientemente y en respuesta a estas nuevas tendencias ecológicas, las diferentes industrias e investigadores se han enfocado al desarrollo y uso de disolventes que puedan ser una opción más eco-

lógica a los tradicionales. El dióxido de carbono supercrítico, derivados de la biomasa como alcoholes producidos durante la fermentación, y los LI, son parte de estos disolventes, y basan su estado de «disolvente verde» en diferentes conceptos como son su fuente de obtención, el impacto ambiental percibido o la presencia de propiedades físicas como una presión de vapor insignificante y alta estabilidad térmica.

6.2 LÍQUIDOS IÓNICOS

6.2.1 Generalidades

Los líquidos iónicos (LI) son un grupo de sales orgánicas con un intervalo de punto de fusión por debajo del punto de ebullición del agua, y cercano a la temperatura ambiente (Liu *et al.*, 2009). Normalmente, los LI están formados por cationes orgánicos que se encuentran unidos con un anión orgánico o inorgánico (Jiao *et al.*, 2013).

Los cationes más comunes son compuestos poco simétricos, que contienen nitrógenos sustituidos de manera asimétrica (ejemplo: imidazolio, piridinio, amonio cuaternario, y el grupo cuaternario fosfonio); tanto los aniones inorgánicos (ej. Cl^- , Br^- , BF_4^- , PF_6^-), como los orgánicos (ejemplo: trifluorometilsulfonato $[\text{CF}_3\text{SO}_3^-]$, bis[(trifluorometil)sulfonil]amida $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$, trifluoroetanoato $[\text{CF}_3\text{CO}_2^-]$) pueden ser usados como la contraparte aniónica; usualmente éstos cuentan con una carga negativa difusa o protegida. Se ha reportado (Messali *et al.*, 2013) que la modificación del anión y/o el catión con el grupo funcional adecuado, suele crear un cambio en las propiedades del LI, generándose así una amplia variedad de LI con diferente polaridad, hidrofobicidad y viscosidad, entre otras propiedades. Es por esta razón que son conocidos como «solventes de diseño».

Aunque el primer LI fue sintetizado desde el siglo XIX, fue hasta después de 100 años que los LI tienen la atención de los científicos, existiendo a la fecha más de 10^{18} combinaciones posibles de aniones con cationes (Tang *et al.*, 2012). En la tabla 6.1 se muestran las estructuras de algunos LI representativos.

Los LI algunas veces son clasificados basándose en la estructura de su catión, existiendo cinco grupos: (1) cationes heterocíclicos de cinco miembros, (2) cationes heterocíclicos de seis miembros y benzo-condensados, (3) cationes con base amonio, fosfonio y sulfonio, (4) cationes imidazolío funcionalizados y (5) cationes quirales (Clare *et al.*, 2009). Debido a la gran cantidad y a la facilidad con la que se pueden crear, aún no existe una clasificación oficial de los líquidos iónicos.

6.2.2 Síntesis

Existen diferentes estrategias de síntesis disponibles para preparar LI. A la fecha, la protonación de materiales iniciadores adecuados (generalmente aminas y fosfinas) sigue representando el método más simple para la formación de estos compuestos. A medida que el estudio de los LI ha crecido en los últimos años, los métodos sintéticos utilizados para su preparación se han vuelto más sofisticados y capaces de dirigirse hacia compuestos más complejos (Clare *et al.*, 2009).

La síntesis de LI se puede dividir de manera general en dos pasos: la formación del catión deseado y el intercambio de aniones. En algunos casos sólo el primer paso es necesario, o algunas veces el catión deseado se encuentra disponible comercialmente y sólo es necesario el intercambio de aniones. La formación del catión se puede llevar a cabo por medio de una protonación con un ácido libre, o por la cuaternización de una amina, fosfina o sulfuro, usando comúnmente un halo-alcano o diaquilsulfatos. Entre las técnicas más usadas actualmente para realizar este intercambio se encuentran la metátesis, la síntesis libre de halógeno y la síntesis para LI próticos (Gordon y Muldoon, 2008).

A través de la metátesis del anión se produce un amplio número de LI de buena calidad. Sin embargo, la producción de materiales de alta pureza es problemático, pues se presenta contaminación con haluros residuales, lo cual puede cambiar de manera drástica las propiedades físicas del compuesto. Debido a lo anterior, se han generado las síntesis libres de halógeno, las cuales se pueden categorizar en tres grupos: (1) síntesis a través de intermediarios de carbeno N-heterocí-

Tabla 6.1 Estructura y nombre de algunos líquidos iónicos representativos

Nombre	Estructura
1-octil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato	
1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato	
1-hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato	
Poli(VHIM-aurato)	
Metilimidazolio -ciano-4-hidrocinamato	
Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio	
N,N-dimetilepedrinio bis(trifluorometilsulfonil) amida	

Tan *et al.*, 2012.

clicos, (2) reacciones directas base fósforo con imidazoles y (3) reacciones directas base sulfuro con imidazoles (Clare *et al.*, 2009).

Para los LI no próticos, la síntesis requiere de manera general dos pasos: la alquilación de una amina terciaria por un haluro de alquilo, seguido por un cambio del anión haluro con el anión correspondiente para obtener el producto deseado. Por otra parte, los LI próticos se forman por una transferencia de protones entre un ácido y base Brønsted por medio de una reacción de neutralización ácido-base (Freemantle, 2010).

La presencia de la más mínima impureza puede promover un cambio radical en las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, por lo cual su purificación es siempre una parte importante de la síntesis. Las impurezas pueden ser los compuestos producidos de los materiales originales por medio de oxidación o degradación térmica, los materiales iniciales que no reaccionan, impurezas haluro, de ácidos y agua. Aunque a la fecha no existe un método que remueva totalmente la contaminación en LI, existen algunas opciones para minimizarlos como filtración, lavado con agua para LI hidrofóbicos, y para los hidrofílicos lavados con solventes no miscibles en agua, entre otros (Clare *et al.*, 2009).

6.2.3 Propiedades físicas y químicas

Los LI actualmente son de gran interés debido a que cuentan con propiedades físicas y químicas únicas, las cuales les han dado ventajas significativas sobre otros disolventes en diferentes aplicaciones. Entre las propiedades más importantes se encuentran una presión de vapor nula, alta conductividad, ausencia de inflamabilidad, alta polaridad, gran estabilidad química y térmica, y comportamiento de solvente miscible (Gendaszewska y Liwarska-Bizukojc, 2013).

De manera general, se ha observado que la mayoría de estas propiedades son el resultado de la naturaleza y forma de sus aniones y cationes, y de las interacciones que se presentan entre estos (Martin-Calero *et al.*, 2001). Lo anterior permite controlar las propiedades de los LI al seleccionar la combinación anión/catión o por la incorporación de algún grupo funcional en la molécula del LI, teniendo así la

capacidad de ser adaptados a aplicaciones específicas (Youngs *et al.*, 2008). Sin embargo, el estudio de los LI se encuentra aún en sus primeras etapas, por lo cual son pocas las propiedades que han sido ampliamente definidas.

El comportamiento térmico de los LI es complejo, siendo las temperaturas de fusión y descomposición algunas de las propiedades más importantes. Ambas temperaturas son especialmente relevantes para su aplicación como solventes alternativos, debido a que con ellas se determina el intervalo en el cual los fluidos se encuentran en estado líquido; en el caso de los LI este rango de temperaturas es muy amplio (entre los 200-300°C), a diferencia del que presentan los fluidos orgánicos comunes (Huang, 2011). El punto de fusión de los LI se eleva debido a un balance en la simetría de los cationes y aniones que lo constituyen, la flexibilidad en la cadena de los iones y la accesibilidad de la carga. Al aumentar la longitud de las cadenas alquil del catión se genera un descenso en el punto de fusión; de igual manera, al aumentar el tamaño del anión el punto de fusión desciende (Aparicio *et al.*, 2010).

La densidad es la propiedad física de medición más sencilla e inequívoca con la que también se caracterizan los LI, y es la menos sensible a las variaciones de temperatura. En condiciones de temperatura y presión ambiental, la densidad de la mayoría de los LI se encuentra en un rango de 1.05 a 1.35 g/cm³ (Mantz y Trulove, 2008).

La viscosidad, el coeficiente de auto-difusión, la conductividad térmica y la conductividad eléctrica son las propiedades de transporte de las que se cuenta con mayor información para estos disolventes. Una de las características importantes de algunos LI es su alta viscosidad, esto puede ser desfavorable para algunas aplicaciones industriales como el bombeo o mezclado; sin embargo, la viscosidad se puede ajustar por medio de una combinación adecuada de catión y anión que permita alcanzar la viscosidad deseada. A la fecha, los LI se han considerado fluidos newtonianos (Mantz y Trulove, 2008). Aunque las demás propiedades de transporte también son relevantes, la viscosidad es la más estudiada en estos compuestos debido a que, por los altos valores que presenta, las otras propiedades están acopladas a ella (Aparicio *et al.*, 2010). Por otra parte, los valores de conductividad

térmica y eléctrica de los LI presentan gran dependencia de la temperatura. La conductividad eléctrica está relacionada fuertemente a la movilidad iónica, así que al aumentar la cadena alquílica del catión desciende la movilidad iónica y desciende la conductividad eléctrica.

Por último, la ausencia de una presión de vapor medible es una característica que ha dado un estatus «verde» a los LI; esta característica se presenta debido a que no son compuestos volátiles como consecuencia de las interacciones electroestáticas que se presentan entre los componentes del compuesto (Yao *et al.*, 2012).

6.2.4 Ventajas y desventajas de su uso

6.2.4.1 Ventajas

Entre las ventajas con las que cuentan los LI, una de las mayores es su presión de vapor insignificante, lo cual los convierte en una alternativa a los nocivos vapores de los solventes orgánicos convencionales (Youngs *et al.*, 2008). Esta es comúnmente la propiedad que les confiere a estos disolventes su estatus «verde» y les ha dado el potencial de representar una opción más ecológica en diferentes operaciones. Otra de sus ventajas para ser usados en procesos de extracción y preparación de muestras es la capacidad que tienen para disolver celulosa. Al romperse la estructura de la celulosa presente en las paredes de las plantas, los metabolitos secundarios que se encuentran en ellas se desprenden más fácilmente favoreciendo los procesos de aislamiento y/o extracción (Jin *et al.*, 2011).

De igual manera, su capacidad de ser «solventes de diseño» representa una ventaja muy atractiva, ya que al variar el anión o el catión se pueden modificar sus propiedades físicas y químicas. Lo anterior permite que se creen un gran número de combinaciones de aniones y cationes con diferentes propiedades, de las cuales los LI pueden ser seleccionados para aplicaciones específicas (Fontanals *et al.*, 2012).

6.2.4.2 Desventajas

A la fecha, una de las desventajas del uso de LI es que las técnicas utilizadas para su síntesis aún no tienen la capacidad de crear compuestos cien por ciento libres de impurezas. Se ha demostrado que las impurezas presentes en los LI tienen la capacidad de alterar su comportamiento, representando problema en su uso, pues esto disminuye la selectividad del compuesto (Clare *et al.*, 2009).

Además, no todos los LI pueden ser clasificados como ambientalmente amigables, y algunos de ellos han sido señalados como tóxicos cuando se incorporan a un medio acuoso. La ecotoxicidad de los LI ha sido probada en diversas especies de organismos mostrando diferentes niveles. De manera general, se ha observado que las sales imidazolio con largas cadenas alquil son tóxicas, y que las cadenas cortas son poco biodegradables (Kunz *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Cornellas *et al.* (2011), acerca del efecto antimicrobiano de dos series de LI con bases imidazolio y piridinio, se encontró que los compuestos con sustituyentes alquil de cadena corta no presentaban actividad antimicrobiana contra bacterias y mohos, mientras los LI que contenían cadenas alquil de una longitud de 10 a 14 carbonos mostraban una actividad antimicrobiana significativa.

Por esta razón, existen algunas tendencias encaminadas a mejorar los LI uniendo grupos funcionales convenientes a sus estructuras para dar lugar a compuestos inertes y, por lo tanto, «verdes». El diseño de LI de fácil degradación y menos tóxicos, está basado en el uso de metabolitos naturales; siendo el catión colina uno de los más prometedores (Kunz *et al.*, 2011). Sin embargo, no se puede hablar de un disolvente «verde» de manera formal. Lo «verde» que un disolvente puede llegar a ser debe considerarse en el contexto del proceso en el cual va a ser usado (Reichardt y Welton, 2011). Por esto, el uso de LI es mejor al ser comparados con un disolvente tradicional, ya que los primeros, al contar con la capacidad de mejorar los rendimientos, selectividad y velocidad de extracción, tienen un estatus de disolvente «verde», pues reducen de gran manera los desperdicios y la energía usada.

6.3 APLICACIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Desde su aplicación inicial en 1970 como electrolitos en baterías (Tan *et al.*, 2012), los LI se han convertido en compuestos con gran potencial para ser usados en diferentes aplicaciones industriales y científicas como solventes, catalizadores y electrolitos. A la fecha, los LI han sido aplicados en casi todas las ramas de la química incluyendo química orgánica, inorgánica, bioquímica, fisicoquímica y química analítica; además de esto, su uso también se ha extendido a biocatálisis, biopolímeros, sensores, celdas solares, procesamiento de biomasa y como fluidos térmicos, entre otras aplicaciones (Cornellas *et al.*, 2011).

En el área de la ciencia y tecnología de alimentos su uso es escaso; sin embargo, en los últimos años se han logrado los primeros avances en el estudio de la viabilidad de su aplicación (Albishri y El-Hady, 2014). Debido a la naturaleza compleja de los alimentos, uno de los retos que se presenta en su análisis es la extracción de analitos de interés; es por esto que de manera general los LI se han estudiado como disolventes «verdes» en análisis de alimentos y extracción de metabolitos secundarios.

6.3.1 Análisis de alimentos

Los alimentos son una de las matrices más difíciles de manejar para su análisis debido a que están constituidos por una mezcla compleja de compuestos químicos. El pretratamiento de las muestras alimenticias es una de las fases más importantes de todo el proceso de análisis de alimentos. Esta etapa incluye la preconcentración del analito y la remoción de las interferencias que se encuentren en la matriz, con el fin de hacer al analito más apto para su separación y detección (Fontanals *et al.*, 2012).

Es por esto que la investigación en técnicas de preparación de muestras se enfoca en el desarrollo de materiales nuevos que puedan lograr mayor selectividad y una mayor eficiencia de la técnica a utilizar. Los materiales basados en LI han sido aplicados ampliamente debido

a sus propiedades únicas, como polaridad y baja volatilidad, ambas asociadas a interacciones iónicas y no polares, así como su comportamiento cromatográfico diferente, atribuido a los diferentes grupos funcionales que se encuentran en su superficie. Estos materiales interaccionan con los analitos por medio de cambio de aniones, enlaces hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, entre otros (Tang *et al.*, 2012).

El uso de los LI en diferentes técnicas de preparación de muestras está siendo cada día más estudiado, reportándose avances en la separación de contaminantes, toxinas, compuestos tóxicos y metabolitos secundarios en alimentos (Matsumoto *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2010; Fontanals *et al.*, 2012). Sin embargo, la detección de metales pesados es el análisis en el que más se ha estudiado la aplicación de los LI (Martín-Calero *et al.*, 2011), demostrando que estos disolventes tienen la capacidad de favorecer la separación y preconcentración de este tipo de contaminantes.

6.3.1.1 Determinación de metales

Para la determinación de metales en alimentos, tanto en matrices sólidas, como líquidas, sólo tres líquidos iónicos han sido utilizados: tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio ($C_6\text{mim-BF}_4$), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ($C_4\text{mim-PF}_6$), y hexafluorofosfato de 1-hexilpiridinio ($C_6\text{Py-PF}_6$) (Martín-Calero *et al.*, 2012).

El procedimiento tradicional para la extracción de metales en muestras alimenticias involucra el uso de reactivos complejos, los cuales deben ser insolubles en agua, y además contar con una alta hidrofobicidad y viscosidad (Majidi y Shemirani, 2012). LI como $C_4\text{mim-PF}_6$ y $C_6\text{Py-PF}_6$ cumplen estos requisitos y han sustituido exitosamente a algunos solventes orgánicos como acetonitrilo, ácido nítrico y dietilditiocarbamato de sodio (Vaezzadeh *et al.*, 2010). También se ha estudiado la combinación de agentes quelantes con diferentes LI para la determinación de metales, encontrándose que los LI pueden actuar con cualquiera de ellos, sin necesidad de usar un quelante específico, demostrando que la única modificación que se realiza en el método de extracción es la sustitución del solvente orgánico por el LI.

Por último, los LI tiene la capacidad de actuar como solvente y quelante a la vez, con la sola inclusión de un grupo funcional adecuado a su molécula, lo cual les da una ventaja adicional al reducir el número de reactivos usados en la extracción.

6.3.1.2 Análisis de alimentos líquidos

Muy pocos alimentos líquidos han sido analizados usando LI en la detección de metales pesados, existiendo sólo reportes acerca del uso de C6P y-PF6 para la detección de Zn y Al en muestras de leche descremada y varios jugos de frutas.

Los procesos de microextracción y microextracción líquido-líquido dispersiva (MLLD) son los más usados en combinación con LI. MLLD con LI es una técnica de extracción exitosa debido a la gran superficie de contacto que existe entre las gotas del solvente (LI) y el analito, que incrementa la velocidad del proceso de transferencia de masa del analito de la fase acuosa a la fase extractante del LI. Después de una centrifugación, la gota de LI que contiene al metal de interés es muestreada con una jeringa y posteriormente sometida a la determinación analítica. Los LI también han sido utilizados en el proceso de separación posterior a la extracción de metales en muestras líquidas, existiendo reporte de su uso en cromatografía de líquidos y de gases, donde son usados como parte de la fase estacionaria y actúan como fase de baja polaridad para la separación de compuestos no polares, o de manera contraria para grupos donadores de protones. Para esto, los LI son inmovilizados en materiales de sílice o fijados en diferentes polímeros (Vidal *et al.*, 2012).

El desempeño de estas técnicas con el uso de LI ha sido comparado con sus modalidades tradicionales, y en todos los casos los métodos basados en el uso de LI han presentado límites de detección menores, una precisión comparable o incluso mejor que con los solventes convencionales, así como un consumo de muestra similar o menor.

6.3.1.3 Análisis de alimentos sólidos

La determinación de metales en muestras sólidas con el uso de LI se ha realizado tanto en muestras con grasa (productos lácteos, riñones e hígado fresco), como en muestras bajas en grasas (harinas de arroz y trigo, té y leche en polvo). En estas determinaciones se han utilizado LI que tienen la capacidad de ser solventes y quelantes al mismo tiempo, para determinar Cd, mostrando buenos resultados, además de capacidad de ser reusados.

Para la determinación de elementos traza en muestras sólidas alimentarias es necesaria una descomposición previa, digestión, ya sea de acidificación húmeda o seca. Antes de utilizar extracciones empleando LI la digestión también es necesaria. La fase del proceso de extracción es donde los LI están involucrados, es decir, posterior a la digestión. La microextracción es la técnica que se usa para todas las determinaciones en muestras sólidas.

En la microextracción los LI han sido utilizados en extracción líquido-líquido dispersiva (MLLD), líquido-líquido homogénea (MLLH) y de gota simple (MGS). De manera general, todas estas aplicaciones se caracterizan por requerir pequeñas cantidades de muestra y de LI en la fase de extracción. Estos métodos han sido usados para comparar LI y disolventes tradicionales para la extracción y detección de metales pesados, obteniendo en la mayoría de los casos recuperaciones mayores al 96% al utilizar los LI.

6.3.2 Extracción

Los LI han emergido como una nueva opción de disolventes benignos al ambiente y rentables a largo plazo en diferentes técnicas de extracción de metabolitos secundarios obtenidos de plantas, frutos y semillas. Estos compuestos cuentan con la capacidad de disolver varios tipos de biomacromoléculas como la celulosa, quitina, almidón y proteínas, entre otras. Teóricamente, la disolución de este tipo de macromoléculas por medio de los LI se atribuye al rompimiento de un gran número de enlaces hidrógeno inter e intra moleculares, y a la formación de nue-

vos enlaces entre los OH⁺ de los carbohidratos y los aniones de los LI (Jiao *et al.*, 2013).

De manera general, se considera que las propiedades únicas de solvatación que poseen los LI son debidas a la capacidad que tienen de asociarse tanto con compuestos polares como no polares, por medio de varias interacciones soluto-solvente (iónicas, dipolo, puentes hidrógeno, van der Waals y aromáticas) (Freemantle, 2010; Martín-Ca- lero *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2012).

Por esto es que, actualmente, los LI están siendo usados como me- dio de extracción en tecnologías emergentes como lo son la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción asistida por ultrasonido (UAE). Estas dos técnicas, además de ser usadas como nuevas tecnolo- gías de extracción que favorecen rendimientos y dañan menos el am- biente, han sido también favorecidas por la adición del uso de LI como solventes, con lo cual se han convertido en opciones «verdes» para la extracción de metabolitos secundarios. En la tabla 6.2 se muestran al- gunos compuestos extraídos de plantas por medio de MAE-LI y UAE-LI.

6.3.2.1 Extracción asistida por microondas con líquidos iónicos como solventes (MAE-LI)

Comparados con los solventes orgánicos tradicionales, los LI presentan una mayor capacidad de absorber y transferir la energía de microon- das. Debido a esto, las extracciones realizadas por medio de MAE-LI han mostrado una mayor eficiencia de extracción en menores tiem- pos que el uso de MAE utilizando agua como solvente o solventes orgá- nicos tradicionales (hexano y etanol) (Xu *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2013).

Los mayores avances que se han realizado en el estudio de esta tecnología de extracción han sido en la obtención de metabolitos se- cundarios de diferentes partes de plantas, siendo la obtención de acei- tes esenciales una de las aplicaciones más estudiadas recientemente. La extracción de estos compuestos se ve favorecida no sólo por la ca- pacidad de la transmisión de las microondas a través del LI, sino tam- bién porque estos disolventes pueden actuar como surfactantes, for- mando emulsiones entre el aceite y el agua, convirtiendo a los LI en

Tabla 6.2 Compuestos extraídos de plantas por medio de EAU-LI y EAM-LI

LI utilizado	Método	Compuestos	Fuente	Referencia
(Bmim)(BF ₄) Tetrafluoroborato de 1-butil-3-m etilimidazolio	EAU-LI	Compuestos fenólicos	<i>Lonicera Japónica</i> (madre selva)	Tang <i>et al.</i> , 2012
	EAU-LI	Piperina	<i>Capsicum chinese</i> (chile blanco)	
	MAE-LI	Alcaloides fenólicos	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn (rosa del Nilo)	
(C ₂ mim) O ac Acetato de 1-etil-3- metilimidazolio	MAE-LI	Aceite esencial	Semilla de <i>Fructus forsythiae</i> (campana de oro)	Jiao <i>et al.</i> , 2013
(Bmim) (MS) Metil- sulfato de 1-butil- 3-metilimidazolio	EAU-LI	Luteolina	<i>Apium graveolens</i> (apio)	Dandan y Kyung Ho, 2011
(C ₃ mim) Br Bromuro de 1-octil- 3-metilimidazolio	MAE-LI	Ácido camósico Ácido rosamarínico Aceite esencial	<i>Rosmarinus officinalis</i> (romero) <i>Bauhinia championii</i>	Liu <i>et al.</i> , 2011
	MAE-LI	Flavonoides	<i>Benth.</i> (negro de la vid) Corteza de <i>Larix</i>	Xu <i>et al.</i> , 2012
(Bmim) Br Bromuro de 1-butil- 3-metilimidazolio	MAE-LI	Proantocianidinas	<i>Gmelini</i> (corteza de pino)	Yang <i>et al.</i> , 2013
	MAE-LI	Proantocianidinas Aceite esencial	<i>Cortex cinnamomi</i> (árbol cinnamomi)	Liu <i>et al.</i> , 2012
(C ₂ mim) O ac Acetato de 1-etil-3- metilimidazolio	MAE-LI	Aceite esencial	<i>Dryopteris fragrans</i> (helecho aromático)	Jiao <i>et al.</i> , 2013

LI. Líquido iónico; EAU-LI-Extracción asistida por ultrasonido con líquido iónico como solvente; MAE-LI.Extracción asistida por microondas con líquido iónico como solvente.

disolventes ideales para la separación y extracción de aceites esenciales (Liu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2012).

Debido al gran interés que se ha despertado por el uso de MAE-LI para la extracción de compuestos de plantas, existe un amplio estudio acerca de los factores que afectan la efectividad de esta técnica; siendo la viscosidad, la relación sólido-líquido, el tiempo e intensidad

del tratamiento, y el tipo de LI utilizado, los más relevantes. Entre los diferentes estudios realizados sobre MAE-LI se ha investigado la aplicación de la extracción y destilación simultánea (Liu *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2012), el uso de más de un ciclo de extracción antes de la destilación (Jin *et al.*, 2011) y la división del proceso en dos fases de extracción (la primera extrayendo de la mezcla planta-LI, y una posterior donde sólo se extrae del LI impregnado con residuos de la planta) (Jiao *et al.*, 2012); en todos los casos se han obtenido rendimientos mayores al compararse con técnicas tradicionales como hidrodestilación, extracción Soxhlet o el uso de la extracción asistida por microondas pero sin LI.

6.3.2.2 Extracción asistida por ultrasonido con líquido iónico como solvente (UAE-LI)

En los últimos años se ha reportado mucho acerca de la aplicación del ultrasonido como una técnica de extracción de materiales derivados de las plantas. Ésta es una técnica de extracción prometedora debido a que puede lograr una gran reproducibilidad, tiene un manejo sencillo y reduce el uso de solvente y la temperatura usada (Zu *et al.*, 2012).

Si bien esta técnica se encuentra como un método establecido y la mejora en rendimientos ha sido probada con el uso de diferentes solventes, ha surgido el interés en el desarrollo de una extracción asistida por ultrasonido con líquido iónico como solvente (UAE-LI). Lo anterior debido a que el estrés causado por la cavitación sobre las paredes celulares favorece su rompimiento y, de esta manera, la liberación de los metabolitos secundarios (Vilkhu *et al.*, 2008), lo cual, al combinarse con la capacidad que presentan los LI de desintegrar macromoléculas, aumentaría aún más la capacidad de extracción de la técnica.

A diferencia de MAE-LI, los compuestos que se han extraído por medio de UAE-LI en la mayoría de los casos no son aceites esenciales, sino otro tipo de compuestos como taninos y flavonoides (Sun *et al.*, 2013), ácidos orgánicos (Zu *et al.*, 2012) y alcaloides (Cao *et al.*, 2009). Entre los estudios realizados acerca de la factibilidad del uso de UAE-LI, se ha examinado el efecto de algunos parámetros sobre la eficiencia de extracción, como son la concentración de LI, intensidad y tiempo de

tratamiento con ultrasonido. Al comparar UAE-LI con UAE e hidrodes-tilación, se han obtenido tiempos de extracción más cortos y eficiencias de extracción más altas, con lo cual se ha demostrado la capacidad que tiene la aplicación de los LI en este tipo de extracción emergente.

6.4 RETOS DEL USO DE LI A ESCALA INDUSTRIAL

Debido a lo expuesto en las secciones anteriores de esta revisión, el uso de LI en el área de análisis y técnicas de extracción a escala industrial, tanto en la industria de alimentos, como en otras, presenta un panorama prometedor. Sin embargo, como sucede con cualquier compuesto nuevo, existen propiedades y comportamientos pre y post proceso que aún faltan por entender.

Una de las mayores barreras que presenta el uso de los LI es la ausencia del conocimiento profundo de sus propiedades físicas, químicas y térmicas; el conocimiento de estas propiedades es necesario para decidir cuándo el uso de estos solventes se puede extender del laboratorio a aplicaciones industriales. Para el diseño de un proceso con LI que sea rentable y seguro, al menos es necesario entender sus propiedades físicas y termofísicas más relevantes como densidad, viscosidad y capacidad calorífica (Aparicio *et al.*, 2010). Si bien, en los últimos años el número de estudios acerca de las diferentes propiedades de los LI ha aumentado notablemente (Martin-Calero *et al.*, 2001; Mantz y Trulove, 2008; Huang, 2011; Yau *et al.*, 2013), las propiedades estudiadas suelen ser las mismas por los diferentes grupos de investigadores, y los rangos de presión-temperatura a los cuales se obtienen estas propiedades son limitados y ni siquiera se encuentran cerca de las condiciones de operación que realmente se utilizan en la industria. Además, la gran cantidad de aniones y cationes que existen ocasiona que se dé una diferencia enorme entre las propiedades de distintos LI, siendo relevante el estudio de la relación que se presenta entre su estructura y sus propiedades.

En cuanto a su estatus de solventes seguros, es necesario contar con información exacta acerca de la toxicidad e impacto ambiental de los LI, ya que es de importancia crítica para su aplicación a gran escala. A pesar de que los LI han sido considerados solventes «verdes», es necesario tomar en cuenta que, debido a que son altamente hidrofílicos, la forma de introducirse al ambiente es por medio del agua, por lo cual ha incrementado la preocupación acerca de la toxicidad real de estos compuestos. Debido a esto, se ha probado el efecto tóxico sobre algunas especies de peces y microorganismos (Matsumoto *et al.*, 2004a; Matsumoto *et al.*, 2004b; Cornellas *et al.*, 2011) encontrando que su DL_{50} (dosis letal 50) es mayor a 2000 mg/kg. Sin embargo, aún es necesaria más investigación acerca del tratamiento que se le debe dar a los residuos de estos compuestos.

Por último, antes de usar los LI a escala industrial es necesario tomar en cuenta que pueden ser alterados de manera dramática por la presencia de impurezas. Éstas pueden cambiar la naturaleza de estos compuestos, lo cual limita su aplicación en situaciones en las cuales una contaminación no puede ser fácilmente controlada. Muchas veces las impurezas que se presentan en los LI se encuentran por debajo del límite de detección, razón por la cual es necesario el uso de técnicas como la cromatografía de columna para poder detectarlas (Liu *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

El uso de los LI representa una de las opciones más novedosas para reemplazar a los disolventes tradicionales usados en las diferentes técnicas analíticas y de extracción en la ciencia y tecnología de alimentos. A pesar de que su aplicación aún se encuentra en etapa experimental, los pocos resultados de su uso en métodos tradicionales y emergentes presentan un panorama promisorio acerca de su capacidad de crear nuevas técnicas con mayor selectividad, mayor rendimiento, y menor tiempo de proceso que las técnicas tradicionales.

La aplicación de los LI en técnicas de extracción emergentes (asistidas por microondas y ultrasonido) es muy prometedora, por lo cual se espera que el estudio, aplicaciones y alcances de estas técnicas se extiendan cada vez más y den pauta al desarrollo de industrias alimentarias más «verdes».

Como sucede en las primeras etapas del uso de cualquier compuesto nuevo, el comportamiento y aplicación de LI aún presentan algunas incógnitas como la obtención de sus propiedades y cómo éstas son afectadas por factores extrínsecos e intrínsecos, el efecto de la presencia de impurezas sobre su capacidad de reacción y la forma en la que deben ser tratados después de su uso, entre otras. Lo anterior hace evidente la gran ventana de oportunidad que estos compuestos representan, ya que para vencer estos retos es necesario el desarrollo de más investigación acerca de los líquidos iónicos y sus aplicaciones.

REFERENCIAS

- Acton, A. (2013). *Triterpenes-advances in research and application*. Atlanta: Scholarly editions.
- Albishri, H. y El- Hady, D. (2014). «Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples». *Talanta*, 118, 129-136.
- Aparicio, S., Athilan, M. y Karadas, F. (2010). «Thermophysical properties of pure ionic liquids: Review of present situation». *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 9580-9595.
- Cao, X., Ye, W., Lu, Y., Yu, Y. y Mo, W. (2009). «Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper». *Analytica chimica acta*, 640(1-2), 47-51.
- Clare, B., Sirwardana, A. y MacFarlane, D. (2009). «Synthesis, purification and characterization of ionic liquids». En B. Kirchner (Ed.). *Topics in current chemistry: ionic liquids* (pp. 1-39). Alemania: Springer.
- Clayden, J., Greeves, N. y Warren, S. (2012). *Organic chemistry* (2da Ed.). Nueva York: Oxford University Press.

- Cornellas, A., Perez, L., Comelles, F., Ribosa, I., Manresa, A. y Garcia, M. (2011). «Sel-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution». *Journal of Colloid and Interface Science*, 355, 164-171.
- Dandan, H. y Kyung Ho, R. (2011). «Determination of luteolin and apigenin in celery using ultrasonic assisted extraction based on aqueous solution of ionic liquid coupled with HPLC quantification». *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 15, 2888-2892.
- Fontanals, N. Borrull, F. y Marcé, R. (2012). «Ionic liquids in solid-phase extraction». *Trends in Analytical Chemistry*, 41, 15-26.
- Freemantle, M. (2010). *An introduction to ionic liquids*. Cambridge: The royal society of chemistry.
- Gendazewska, D.M. y Liwarska-Bizukojc, E. (2013). «Comparison of imidazolium ionic liquids and traditional organic solvents: effect on activated sludge processes». *Water Science and Technology*, 68 (12), 2654-2660.
- Gilbert, J. y Martin, S. (2010). *Experimental organic chemistry: A miniscale and microscale approach* (5ta Ed). Boston: Brooks/Cole CENGAGE Learning.
- Gordon, C. y Muldoon, M. (2008). «Synthesis of ionic liquids». En P. Wasserscheis y T. Welton (Eds.). *Ionic liquids in synthesis* (7-20). Alemania: John Wiley & Sons.
- Huang, M. (2011). *Dielectric properties of ionic liquids*. (Tesis doctoral no publicada). Alemania: Faculty of chemistry and biochemistry, Ruhr University.
- Isengard, H. y Breithaupt, D. (2009). Food analysis. En G. Campbell-Plat (Ed.). *Food science and technology*(pp. 200-220). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Jiao, J., Gai, Q., Fu, Y., Zu, Y., Luo, M. y Zhao, C. (2013). «Microwave-assisted ionic liquids treatment followed by hydro-distillation for the efficient isolation of essential oil from *Fructus forsythiae* seed». *Separation and Purification Technology*, 107, 228-237.
- Jin, R., Fan, L. y An, X. (2011). «Microwave assisted ionic liquid pretreatment of medicinal plants for fast solvent extraction of active ingredients». *Separation and Purification Technology*, 83, 45-49.
- Kunz, W., Maurer, E., Klein, R., Tourad, D., Rengstl, D., Harrar, A., Dengler, S. y Zech, O. (2011). «Low toxic liquids, liquid cationics, and ionic li-

- quid microemulsions». *Journal of Dispersion Science and Technology*, 32, 1694-1699.
- Lancaster, M. (2010). *Green chemistry: An introductory text* (2ª Ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Li, Z., Pei, Y., Wang, H., Fan, J. y Wang, J. (2010). «Ionic liquid-based aqueous two-phase systems and their applications in green separation processes». *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1336-1346.
- Liu, S., Yang, F., Zhang, C., Ji, H., Hong, P. y Deng, C. (2009). «Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil by response surface methodology». *The Journal of Supercritical Fluids*, 48, 9-14.
- Liu, T., Sui, X., Zhang, R. y Yang, T. (2011). «Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*». *Journal of Chromatography*, 1218 (47), 8480-8489.
- Liu, Y., Yang, L., Zu, Y., Zhao, C., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, Z. y Wang, W. (2012). «Development of an ionic liquid-based microwave-assisted method for simultaneous extraction and distillation for determination of proanthocyanidins and essential oil in *Cortex cinnamomi*». *Food Chemistry*, 135, 2514-2521.
- Majidi, B. y Shemirani, F. (2012). «Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction of palladium in environmental samples and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry». *Talanta*, 93, 245-251.
- Mantz, R. y Trulove, P. (2008). «Viscosity and density of ionic liquids». En P. Wasserscheid y T. Welton (Eds.). *Ionic liquids in synthesis*. Alemania: Wiley-VCH.
- Martín-Calero, A., Pino, V. y Afonso, A. (2011). «Ionic liquids as a tool for determination of metals and organic compounds in food analysis». *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (10), 1598-1619.
- Matsumoto, M., Mochiduki, K. y Kondo, K. (2004b). «Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria». *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98 (5), 344-347.
- Matsumoto, M., Mochiduki, K., Fukunishi, K. y Kondo, K. (2004a). «Extraction of organic using imidazolium-based ionic liquids and their toxicity to *Lactobacillus rhamnosus*». *Separation and Purification Technology*, 40, 97-101.

- Messali, M., Moussa, Z., Alzahrani, A., El-Naggar, M., ElDouhaibi, A., Judeh, Z. y Hammuti, B. (2013). «Synthesis, characterization and the antimicrobial activity of new eco-friendly ionic liquids». *Chemosphere*, 97, 1627-1634.
- Morrison, R. y Boyd, R. (1998). *Química orgánica* (5ª Ed.). Boston: Pearson.
- Reichardt, C. y Welton, T. (2011). *Solvents and solvent effects in organic chemistry* (4ta Ed.). Alemania: Wiley-VCH.
- Riaño, N. (2007). *Fundamentos de química analítica básica* (2ª Ed.). Colombia: Universidad de Caldas.
- Sun, X., Jin, Z., Yang, L., Hao, J., Zu, Y., Wang, W. y Liu, W. (2013). «Ultrasonic-assisted extraction of procyanidins using ionic liquid solution from *Larix gmelinii* Bark». *Journal of Chemistry*. (ID 541037), 1-9. En línea. Obtenido desde: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/541037>
- Tan, Z., Liu, J. y Pang, L. (2012). «Advances in analytical chemistry using the unique properties of ionic liquids». *Trends in Analytical Chemistry*, 39, 218-227.
- Tang, B., Bi, W., Tian, M. y Row, K. (2012). «Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants». *Journal of Chromatography B*, 904, 1-21.
- Vaezzadeh, M. Shemirani, F. y Majidi, B. (2010). «Microextraction technique based on ionic liquid for preconcentration and determination of palladium in food additive, sea water, tea and biológica samples». *Food and Chemical Toxicology*, 48 (6), 1455-1460.
- Vidal, L., Riekkola, M. y Canals, A. (2012). «Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review». *Analytica Chimica Acta*, 715, 19-41.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. y Bates, D. (2008). «Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry- A review». *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9 (2), 161-169.
- Wakelyn, P. y Wan, P. (2001). «Food industry-solvents for extracting vegetable oils». En G. Wypych (Ed.). *Handbook of solvents*. Toronto: ChemTec Publishing.
- Xu, W., Chu, K., Li, H., Zhang, Y., Zheng, H. y Chen, R. (2012). «Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of flavonoids from *Bauhinia championii* (benth.) Benth». *Molecules*, 17, 14323-14335.

- Yang, L., Sun, X., Yang, F., Zhao, C., Zhang, L. y Zu, Y. (2013). «Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of proanthocyanidins from *Larix gmelini* Bark». *International journal of molecular sciences*, 13, 5163-5178.
- Yao, H., Du, X., Yang, L., Wang, W., Yang, F., Zhao, C., Meng, X., Zhang, L. y Zu, Y. (2012). «Microwave-assisted method for simultaneous extraction and hydrolysis for determination of flavonol glycosides in *Ginkgo* foliage using Brønsted acidic ionic-liquid $[\text{HO}_3\text{S}(\text{CH}_2)_4\text{mim}]\text{HSO}_4$ aqueous solutions». *International Journal of Molecular Science*, 13 (7), 8775-8788.
- Yau, H., Keaveney, S., Butler, B., Tanner, E., Guerry, M., George, S., Dunn, M., Croft, A. y Harper, J. (2013). «Towards solvent-controlled reactivity in ionic liquids». *Pure and Applied Chemistry*, 85 (10), 1979-1990.
- Youngs, T., Hardacre, C. y Mullan, C. (2008). «Experimental and theoretical structure of ionic liquids». En M. Koel (Ed.). *Ionic liquids in chemical analysis* (73-80). Boca Ratón: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Zu, G., Zhang, R., Yang, L., Ma, C., Wang, W. y Zhao, C. (2012). «Ultrasound-assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*». *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (9), 11027-11043.

Parte II

**Revisión de la transformación,
conservación y calidad de
algunos alimentos**



La tuna: una perspectiva de su producción, propiedades y métodos de conservación

C. E. Ochoa-Velasco y J. A. Guerrero-Beltrán

La tuna es una fruta perteneciente a la familia de las cactáceas y ha sido hasta ahora la más explotada y comercializada; junto con el nopal provee de alimentación a seres humanos y animales en algunas regiones de México. Sus demandas climáticas la hacen un cultivo muy apto para aquellas zonas donde no pueden desarrollarse otro tipo de plantas. México es el país con mayor producción y variedad de tuna a nivel mundial (Sagarpa, 2006).

Recientes estudios han demostrado que la tuna contiene altos niveles de agentes antioxidantes tales como ácido ascórbico, compuestos fenólicos y pigmentos betalaínicos; así como altas concentraciones de compuestos como calcio, magnesio, prolina y taurina, que le proporcionan la característica de un alimento funcional (Galati *et al.*, 2003). Sin embargo, la tuna al igual que otras frutas en México, requiere de una investigación básica integral que permita sentar las bases para mejorar las técnicas de producción, manejo y conservación.

Para la distribución y comercialización se necesita una fruta de buena presentación y calidad; lo cual no se logra de manera satisfactoria, debido a la corta temporada de producción, así como a que el tiempo de vida útil de la tuna en condiciones de almacenamiento normales es muy reducido. Por lo tanto, es una realidad la necesidad de buscar y probar tecnologías de procesamiento para obtener productos derivados, así como tecnologías poscosecha, empaque y embalaje tal como el almacenamiento bajo atmósferas modificadas y/o controladas que permitan un mejor aprovechamiento de la tuna.

El objetivo de esta revisión es dar a conocer datos sobre la producción mundial, nacional y estatal de la tuna, así como difundir información sobre la importancia nutricional y funcional que tiene la tuna en la alimentación y las posibilidades de conservación y almacenamiento para prolongar su vida útil.

7.1 TUNA

La tuna, al igual que otras cactáceas, tiene la peculiaridad de bajas necesidades de agua y, por lo tanto, una alta eficiencia en el aprovechamiento de ésta, lo que le permite vivir en condiciones áridas y semiáridas (Gurrieri *et al.*, 2000; Esquivel, 2004). Esta característica de eficiencia del agua se la da su metabolismo ácido de las crasuláceas, donde los estomas se abren de noche y capturan el dióxido de carbono cuando la transpiración es baja (Mizrahi *et al.*, 2002).

La tuna es una fruta carnosa (67 a 216 gramos de peso total) que varía en forma, tamaño y color, dependiendo de la variedad, y tiene la característica de poseer una gran cantidad de semillas, un alto contenido de carbohidratos y una baja acidez, lo que le proporciona un sabor dulce y agradable (Piga, 2004; Cantwell, 1995). Existe una gran variabilidad en la constitución de la tuna que depende del tipo de cultivo, prácticas culturales, periodos de luz, clima y temporada de cosecha. Sin embargo, de manera general, está constituida por una cáscara gruesa y una pulpa jugosa. La cáscara, pulpa y semillas constituyen alrededor del 33 al 50%, 45 al 67% y del 2 al 10% del peso total del fruto, respectivamente. Durante el desarrollo de la tuna el contenido de pulpa se va incrementando, mientras que la cáscara se va haciendo más delgada restándole protección, pero ayudando al manejo poscosecha del fruto (Piga, 2004; Duru y Turker, 2005; Cantwell, 1995; Tesoriere *et al.*, 2005b). Dependiendo de la variedad se pueden encontrar tunas de colores tales como blancas, verdes, amarillas, naranjas, rosadas, rojas y púrpuras; así como tunas con y sin gloquideos, que consisten en espinas formadas por celulosa cristalina pura (Stintzing *et al.*, 2001; Carrillo *et al.*, 2002).

7.1.1 Producción de tuna

Se conocen aproximadamente 200 especies de tuna en el mundo. México se destaca como el mayor productor mundial, sin embargo, Chile, Argentina, Bolivia, Perú, Colombia, Marruecos, EE.UU., Sudáfrica, Italia, Grecia, Túnez, Egipto, Israel y Portugal, entre otros, se han dedicado al cultivo de este fruto (Gurrieri *et al.*, 2000; Esquivel, 2004; Inglese *et al.*, 2002; Piga, 2004; Duru y Turker, 2005; Flores y Corrales, 2003). Todos estos países basan su producción de tuna en una sola variedad, mientras que México tiene una riqueza varietal (tabla 7.1) que permite ofrecer al mercado una gran diversidad de tonalidades (blancas, amarillas, anaranjadas y rojas) y con un amplio periodo de cosecha que va desde mayo hasta noviembre, concentrándose la tuna de mayor calidad en los meses de julio y agosto.

La producción mundial de tuna en el año 2000 fue de 973,400 toneladas; aportando siete países el 88% de la producción. México fue el principal productor aportando el 36% del total, seguido de Túnez con 12.8 % y Argentina 7.7%.

La producción de tuna en México ha tenido un aumento gradual (tabla 7.2) en cuanto a rendimiento se refiere (ton/Ha). El Estado de México y Zacatecas se han convertido en los principales estados productores de tuna, seguidos de Hidalgo y Puebla. Zacatecas y Guanajuato fueron los estados con mayor crecimiento durante el periodo de 2000-2006 con 45 mil y 6.6 mil toneladas, respectivamente (Sagarpa, 2006).

En el año 2006, la producción nacional fue de 378,698 toneladas. En donde el Estado de México y Zacatecas representan el 72% de la producción nacional (64% de la superficie sembrada). En el año 2008, los estados con mayor superficie sembrada fueron Zacatecas y el Estado de México con 19,428.81 Ha y 16,255 Ha, respectivamente. Sin embargo, el estado de Puebla ocupa el primer lugar nacional en rendimiento (toneladas/hectárea), seguido de Durango, Estado de México y Guanajuato con un rendimiento de 18.43, 14.00, 10.30 y 9.76, respectivamente (Sagarpa-SIAP, 2008). Entre los principales destinos de la producción nacional de tuna se tiene a Estados Unidos, Bélgica, España, Alemania y Holanda (SIAP, 2001). Sin embargo, México no es el

principal país exportador, ya que Italia domina el mercado Europeo, debido a la calidad y al precio; este país dispone de mejores instalaciones para el empaque y mejores redes de distribución que incluso llegan a exportar a países como Estados Unidos y Canadá, que deberían estar cubiertos por México.

Tabla 7.1 Principales variedades de tuna cultivadas en México

Variedad	Estados de producción	Especie
Villanueva	Puebla	--
Alfajayucan	Estado de México, Hidalgo	<i>O. amyclaea T</i>
Roja pirámides	Estado de México	<i>O. amyclaea T</i>
Burrona	Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí	<i>O. amyclaea T</i>
Cristalina	Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí, Aguascalientes	<i>O. amyclaea T</i>
Reyna	Guanajuato, Zacatecas	<i>O. amyclaea T</i>
Gavia	San Luis Potosí	<i>O. amyclaea T</i>
Esmeralda	Guanajuato, Querétaro	<i>O. amyclaea T</i>
Rojo pelón	Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí, Guanajuato	<i>O. amyclaea T</i>
Rubi reyna	Zacatecas, San Luis Potosí	<i>O. amyclaea T</i>
Torroja	Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí, Guanajuato	<i>O. amyclaea T</i>
Morada	Aguascalientes	<i>O. amyclaea T</i>
Amarilla montesa	Zacatecas, Jalisco	<i>O. amyclaea T</i>
Miquihuana	Tamaulipas, San Luis Potosí	<i>O. amyclaea T</i>
Amarillo huesona	Zacatecas, Jalisco	<i>O. amyclaea T</i>
Picochulo	Zacatecas, Jalisco, Aguascalientes	<i>O. amyclaea T</i>
Cardón	San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro	<i>O. streptacantha</i>

Flores y Gallegos, 1993.

Tabla 7.2 Producción de tuna en México

Año	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/Ha)	Precio medio rural (\$/t)
2005	50,146.41	43,167.91	366,383.75	8.49	2,125.11
2006	50,762.91	43,118.91	378,697.94	8.78	1,830.03
2007	53,211.56	43,999.56	325,663.33	7.40	2,532.62
2008	54,294.61	45,974.61	393,506.49	8.56	2,657.92

SIAP-Sagarpa, 2008.

Europa Oriental y los países árabes, representan oportunidades de mercados altamente factibles para exportación. Sin embargo, los principales problemas que limitan la competitividad de México en estas regiones del mundo, son el alto costo del transporte y que no se utilizan técnicas de conservación adecuadas (Flores *et al.*, 1995).

7.1.2 Características de la tuna

En años recientes ha existido una tendencia global al consumo de frutas y hortalizas debido a las continuas evidencias de que sus componentes tienen un efecto protector contra el daño por oxidación en componentes celulares, así como en mantener la condición redox necesaria para controlar la función celular. Aparte del contenido de vitaminas y minerales, las frutas y hortalizas tienen otros componentes que han sido reconocidos como factores potenciales en beneficiar la salud humana (Tesoriere *et al.*, 2008; Chae Lee *et al.*, 2002; Butera *et al.*, 2002).

La tuna ha sido reconocida en México por sus numerosas virtudes nutritivas, químicas, industriales, ecológicas, medicinales y simbólicas, entre otras. Pero últimamente ha llamado la atención debido a sus propiedades nutricionales y funcionales (Castellanos y Yahia, 2008).

7.1.2.1 Composición de la tuna

La parte comestible de la tuna está compuesta principalmente por agua (84-90%) y carbohidratos (10-15%) (Piga, 2004; Cantwell, 1995). Los sólidos solubles de la tuna se encuentran en un rango de 10-17%, con glucosa y fructosa como los azúcares predominantes (Piga, 2004; Sawaya *et al.*, 1983; Sáenz, 1996). Presenta un alto valor de pH (5.3-7.1) y una baja acidez (0.05-0.18%) expresada como ácido cítrico, lo que influye fuertemente en las operaciones de procesado (Piga, 2004; Moßhammer *et al.*, 2006). Entre los ácidos reportados en la tuna se encuentra el ácido cítrico (62 mg/100g), el ácido málico (23.3 mg/100g), el ácido quínico (19.1 mg/100g) y el ácido shikímico (2.8 mg/100g); mientras que los ácidos isocítrico, fumárico, glicolítico y succínico sólo se encuentran en trazas (Stintzing *et al.*, 2001).

7.1.2.2 Características nutricionales

El contenido nutrimental de la tuna (tabla 7.3) es similar al de otras frutas (Stintzing *et al.*, 2001), con un aporte calórico de 47-67 kcal/100g. Sin embargo, el alto contenido de calcio, fósforo y magnesio, así como aminoácidos libres y fibra, hace a la tuna una fruta con características nutricionales especiales (Sáenz, 1996; Stintzing *et al.*, 2001).

Tabla 7.3 Composición química de la pulpa de tuna

Nutrientes	Valores por cada 100 g de pulpa	Nutrientes	Valores por cada 100 g de pulpa
Humedad (g)	84-89	Riboflavina (mg)	0.060
Energía (kcal/kj)	47-67/196-280	Niacina (mg)	0.460
Proteína (g)	0.73	Vitamina B-6 (mg)	0.060
Lípidos totales (g)	0.51	β- Caroteno (mg)	25
Cenizas (g)	1.64	β- Cryptoxantina (mg)	3
Carbohidratos (g)	10-15	Vitamina A, (IU)	43
Fibra total (g)	3.6	Aminoácidos	
Minerales		Prolina (mg/L)	1768.7
Calcio (mg)	59	Glutamina(mg/L)	574.6
Hierro (mg)	0.30	Taurina (mg/L)	572.1
Magnesio (mg)	98.4	Serina (mg/L)	217.5
Fósforo (mg)	24	Alanina (mg/L)	96.6
Potasio (mg)	220	Ácido glutámico (mg/L)	83.0
Sodio(mg)	5	Metionina (mg/L)	76.9
Zinc (mg)	0.12	Lisina (mg/L)	53.3
Cobre (mg)	0.080	Lípidos	
Selenio (mcg)	0.6	Ácidos grasos (Saturados) (g)	0.067
Vitaminas		Ácidos grasos (monoinsaturados) (g)	0.075
Ácido ascórbico (mg)	18.23	Ácidos grasos (Poliinsaturados) (g)	0.213
Tiamina (mg)	0.014		

USDA, 2009; Piga, 2004; Stintzing *et al.*, 2001; Askar y El-Samahy, 1981.

La tuna posee cantidades significativas de ácido ascórbico (18-23 mg/100g) (Piga, 2004; Stintzing *et al.*, 2001). Esta cantidad de ácido ascórbico es mayor a la que se encuentra en frutas como manzana, pera, uva y plátano; en cambio de vitaminas tales como vitamina A, tiamina, riboflavina y niacina, sólo se encuentran trazas (Sawaya *et al.*, 1983). Estudios recientes demuestran que la tuna es una buena fuente de calcio y magnesio con valores de 59 mg/100g y 98.4 mg/100g, respectivamente, mientras que en sodio, potasio, hierro y fósforo se encuentra en los mismos niveles de las otras frutas (Askar y El-Samahy, 1981; Stintzing *et al.*, 2001).

Adicionalmente, la tuna contiene altos niveles de prolina y taurina, lo cual es muy peculiar, ya que este último aminoácido no es común en el reino vegetal (Tesoriere *et al.*, 2005b). La pulpa de tuna puede ser utilizada como fortificante natural de alimentos, debido a sus niveles de aminoácidos; por ejemplo, en bebidas energéticas (El-Samahy *et al.*, 2007).

7.1.2.3 Características funcionales

Actualmente los consumidores son más exigentes y educados acerca del valor nutrimental de los alimentos, lo que ha provocado un cambio en sus hábitos alimenticios; ellos demandan alimentos funcionales que sean ricos en componentes bioactivos, fibra dietética, colorantes naturales, vitaminas y minerales, bajos en grasas, libres de aditivos sintéticos y más prácticos (El-Samahy *et al.*, 2007; Lund, 2002).

En los últimos años la comunidad científica ha mostrado mayor interés con respecto a los beneficios que proporciona la tuna a la salud. Diferentes investigaciones han demostrado la mejora de la función plaquetaria, la reducción de lípidos y triglicéridos en la sangre y el colesterol total y la reducción de las concentraciones de isoprotanos en la sangre, lo cual indica un menor daño oxidativo. Sin embargo, son escasos los trabajos realizados y aún se desconocen los mecanismos de acción. La tuna ha sido muy utilizada en tratamientos contra la gastritis, hiperglucemia, arteroesclerosis y diabetes (Galati *et al.*, 2003; Butera *et al.*, 2002; Stintzing *et al.*, 2005; Gurrieri *et al.*, 2000; Tesoriere *et al.*, 2005a).

Se presume que los beneficios del consumo de tuna se deben a que es una fuente importante de componentes funcionales y nutracéuticos, tales como el ácido ascórbico, compuestos fenólicos, flavonoides, α -tocoferoles y betalainas en tunas rojas y amarillas (El-Samahy *et al.*, 2006). Estudios en la tuna han demostrado que la actividad antioxidante de plantas bioactivas basan su acción de manera directa como secuestrante de radicales libres y de manera indirecta en la relación que tiene con la quelación de los elementos de transición (Chae Lee *et al.*, 2002). No obstante, estas concentraciones de antioxidantes en general, parecen ser muy variables, ya que no sólo existe una gran variabilidad de estos compuestos en las plantas, sino que además existen muchas variedades de tuna, así como una gran diversidad de opiniones en los métodos adecuados para evaluar estos antioxidantes en los tejidos vegetales (El-Samahy *et al.*, 2007; El-Samahy *et al.*, 2006; Gurrieri *et al.*, 2000).

En un estudio realizado por Butera *et al.* (2002), se evaluó la actividad antioxidante de tres variedades de tuna amarilla, roja y blanca. Encontraron que la tuna amarilla muestra la mayor cantidad de betalainas, siendo el pigmento principal la indicaxantina (89%). La betanina parece ser la de mayor concentración en tuna roja (66%), de los pigmentos betalainicos. Finalmente, la tuna blanca muestra la menor cantidad de betalainas y contiene exclusivamente indicaxantina. Algunos estudios demuestran que la indicaxantina es más biodisponible que la betanina (Kanner *et al.*, 2001; Tesoriere *et al.*, 2008). Este mismo estudio demostró que el contenido de ácido ascórbico es muy similar y no se encontró diferencia significativa entre variedades, proporcionando aproximadamente del 30 al 40% de la capacidad antioxidante total. Butera *et al.* (2002), reportan que la capacidad antioxidante (ABTS) es mayor en la tuna amarilla que en las tunas roja y blanca. Sin embargo, pruebas realizadas en glóbulos rojos expuestos a hidroperóxidos orgánicos utilizando α -tocoferol como referencia, muestran que la tuna blanca es más efectiva en la inhibición de la oxidación de lípidos, así como en el aumento de la resistencia a la oxidación.

Todo parece indicar que los pigmentos betalainicos contribuyen a la actividad antioxidante de las tunas. Aunque deben ser evaluados

en función del efecto real de estos pigmentos para su uso en la dieta, su biodisponibilidad, bioactividad y su eventual digestión (Tesoriere *et al.*, 2008).

7.2 ALMACENAMIENTO, CONSERVACIÓN Y PRODUCTOS DE TUNA

Los cambios socioculturales en los últimos años han creado la demanda de alimentos de consumo fácil y rápido; dirigiéndose a alimentos seguros, sanos, libres de aditivos y conservadores y en muchas ocasiones con un valor agregado. Estos alimentos tienen que ser frescos o con características muy similares a los frescos, lo cual ha provocado la demanda de frutas y hortalizas procesadas en fresco. Por lo tanto, ya no basta con prolongar la vida útil del fruto durante un periodo de tiempo más largo, sino que además llegue al consumidor final en condiciones sensoriales y de calidad óptimas (Zapata y Segura, 1996).

Una de las líneas de investigación que se ha centrado en el procesamiento de frutas y hortalizas es llamada procesamiento mínimo. Wiley (1997) describió el término de frutas y hortalizas mínimamente procesadas como todas aquellas que mantienen tejidos vivos, así como aquellas que han sufrido ligeras modificaciones en sus características de frescura, incluyendo como métodos de conservación la refrigeración, así como la modificación y control de la atmósfera de envasado. Esta definición incluye al procesamiento mínimo dentro de las tecnologías poscosecha, que de manera general se refiere a la organización global del proceso de tratamiento, conjunto de métodos de conservación, empaquetado y transporte del producto, desde su recolección hasta el consumo. Teniendo como objetivos primordiales conservar el producto durante un período más amplio, manteniendo al máximo su calidad y características sensoriales, nutritivas y sanitarias al tiempo que se reducen pérdidas y se minimiza el costo del proceso (Zapata y Segura, 1996).

7.2.1 Manejo poscosecha

Se estima que cerca del 25-80% de la producción hortofrutícola se pierde en poscosecha (Zapata y Segura, 1996) debido a un mal manejo y manipulación defectuosa. Al igual que otras frutas, la tuna presenta un elevado carácter perecedero, mostrando manchas y podredumbres a escasos nueve días tras su recolección y a veinte días después de su cosecha se ha perdido del 70 al 80% de la producción (Cantwell, 1995; Corrales *et al.*, 1997). Lo anterior es debido, principalmente, a los daños mecánicos, la deshidratación de la piel y el ataque de patógenos causantes de pudriciones entre los que se destacan *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Chlamydomyces spp.*, y *Penicillium spp.* (Cantwell, 1995). Adicionalmente se presenta el problema debido a la estacionalidad de la producción, afectándose con ello la rentabilidad de los sistemas de producción (Flores y Gallegos, 1993).

A continuación se presentan, de manera resumida, las etapas del manejo poscosecha de la tuna.

7.2.1.1 Recolección

La recolección de la tuna se realiza generalmente de dos maneras manuales. La primera es comúnmente llamada a torzón donde la tuna se gira y se trocea, mientras que la segunda forma es con cuchillo tratando de cortar una parte del nopal para evitar el daño a la tuna.

7.2.1.2 Transporte y recepción

Una vez cortados los frutos, éstos son depositados en cajas de plástico o madera, para ser transportados hasta la empacadora en donde continuará el acondicionamiento de los frutos.

7.2.1.3 Desespinado

La tuna no se puede comercializar de forma normal sin antes haber pasado por el desespinado, en donde se eliminan los ahuates o gloqui-deos de las tunas. Actualmente el desespinado se hace de dos formas, la primera es de forma mecánica, en donde las tunas se hacen pasar por unas bandas transportadoras que contienen rodillos con cerdas de

plástico, que eliminan el ahuate; la segunda forma es por medio de escobas en donde las personas limpian (barrido) las tunas, eliminando el ahuate.

7.2.1.4 Selección

La tuna se selecciona por calidad y tamaño. Posterior a la limpieza, las tunas caen a una banda transportadora, la cual está provista de una serie de subdivisiones que se utilizan para separar los frutos seleccionados con base en su tamaño. Dependiendo de la zona geográfica son los tamaños que se manejan. De manera general se manejan cinco tamaños: extra, primera, segunda, tercera y armada. La selección la deben realizar personas debidamente capacitadas para reconocer y separar frutos en buen estado de aquellos con daños mecánicos, podridos o malformados.

7.2.1.5 Empaque

La finalidad de empaquetar la tuna es proporcionar al producto las condiciones adecuadas para que durante el transporte al centro de comercialización no se dañe, facilitar su manipulación y darle una presentación atractiva que motive su compra y consumo (Barrios *et al.*, 2003).

La tuna se empaqueta en cajas de madera para el mercado nacional y en cajas de cartón para el mercado de exportación. El envase de cartón presenta ciertas ventajas, ya que el peso de tuna por caja es menor, lo que provoca que no existan daños al producto, además sirve para imprimir el sello o marca comercial del producto.

7.2.1.6 Comercialización

La comercialización para el mercado nacional se da en las centrales de abasto de los principales centros de consumo, de ahí se distribuye a los mercados municipales haciéndolas disponibles para el consumidor final. El transporte se realiza en camiones o tráilers dependiendo del volumen demandado.

Todo el manejo poscosecha de la tuna se lleva a cabo sin una cadena de frío y modificaciones a la atmósfera que rodea al producto, por lo que el tiempo de vida útil es muy corto.

7.2.2 Almacenamiento en refrigeración

El almacenamiento a bajas temperaturas es el método de conservación más utilizado para productos en fresco. Ayuda a mantener una adecuada calidad visual, reducir la respiración, frenar el ablandamiento y reducir el crecimiento microbiano (Artés *et al.*, 2002; Brackett, 1987; Jacxsens *et al.*, 2002). La temperatura de un producto debe disminuirse a un nivel justo por encima del punto de congelación del tejido o por encima de la temperatura umbral, ya que de lo contrario en productos sensibles a bajas temperaturas se produce el llamado daño por frío (Aguayo, 2003). Los efectos del daño por frío generalmente no son visibles a temperaturas de refrigeración, sino que se manifiestan a temperatura ambiente (Saltveit y Cabrera, 1987). Sin embargo, puede desarrollarse progresivamente durante la conservación a bajas temperaturas (Hong y Gross, 2001; Morris, 1982).

Existen pocos estudios reportados acerca del almacenamiento de tuna en refrigeración. En la mayoría de las investigaciones la variedad de tuna, así como la temperatura a la cual se almacena, son los factores determinantes. Variaciones de 1 a 2 °C afectan de manera significativa las características de la tuna. De manera general, los efectos de la refrigeración se ven reflejados en pérdida de peso durante el almacenamiento, llegando a perder el 10% en peso, en variedades como la Torreoja almacenada a 9 °C durante un mes más cuatro días a temperatura ambiente (Corrales *et al.*, 1997). Por su parte, la variedad Burrón pierde tan sólo 5% en peso después de 45 días de almacenamiento a 16-17 °C y una humedad relativa de 60% (Barrios *et al.*, 2003). Piga *et al.* (1996), estudiaron el efecto del almacenamiento en refrigeración de tuna variedad Gialla, bajo condiciones de 6 °C y humedad relativa de 95%, observando que después de seis semanas la tuna había perdido aproximadamente el 5% de su peso original. La pérdida de peso también tiene efecto de manera directa y proporcional sobre la turgencia, así como en el aumento en la distancia de penetración de la cáscara (Corrales *et al.*, 1997; Mercado *et al.*, 2007).

El cambio de color es uno de los efectos importantes que tiene la refrigeración en el almacenamiento de la tuna. En la mayoría de las

investigaciones se reportan cambios en la coloración, pasando de los colores verdes, naranjas y rojos o púrpuras a un color amarillento, se cree que esto es debido a una disminución en la concentración de los pigmentos en cada variedad de tuna (Barrios *et al.*, 2003; Corrales *et al.*, 1997; Mercado *et al.*, 2007). Otras características como el pH y los sólidos solubles tienden a disminuir, mientras que la acidez titulable tiende a aumentar con el tiempo de almacenamiento (Corrales *et al.*, 1997; Piga *et al.*, 1996; Mercado *et al.*, 2007).

La temperatura de almacenamiento repercute de manera directa en una tuna mínimamente procesada. En un estudio realizado por Ávila (2007) se almacenaron tunas por más de 10 días a una temperatura de 10 °C y se presentaron daños por microorganismos y pudriciones en aproximadamente 30-40% de las tunas, mientras que a 4 °C este mismo efecto se presentó sólo después de 25 días de almacenamiento.

De manera general se recomienda un almacenamiento de la tuna a una temperatura de 5-8 °C con 90-95% de humedad relativa y la adecuada ventilación para evitar los daños por frío y evitar la pérdida o deterioro de la tuna por aproximadamente 30 días (Kader, 2007).

7.2.3 Almacenamiento bajo atmósferas modificadas

Tras la cosecha de los productos hortofrutícolas los procesos de respiración siguen activos, dando como resultado que los carbohidratos se conviertan en CO₂, agua, energía y otros compuestos menores, usando el oxígeno necesario del aire circundante. El agua formada en el proceso de respiración se torna parte del producto y el CO₂ y el calor se difunden a la atmósfera. Cuando no existe suficiente oxígeno disponible, se forman otros subproductos como alcoholes, aldehídos y cetonas que imparten mal sabor a los alimentos, pudiendo dañar los tejidos celulares. Como consecuencia de estas reacciones, el producto vegetal se debilita y se vuelve susceptible al ataque de microorganismos. Por lo tanto, es de suma importancia que los productos hortofrutícolas sean envasados de manera adecuada para mantener la calidad durante su transporte, almacenamiento y comercialización (Zapata y Segura, 1996; Rodríguez *et al.*, 2005).

La conservación de frutas y hortalizas bajo atmósferas modificadas consiste en empaclar el producto en películas plásticas con una permeabilidad definida. Su fundamento se basa en el cambio de las condiciones gaseosas iniciales del entorno inmediato del producto como consecuencia de su metabolismo y la barrera que dé la película plástica. Existen muchas definiciones de atmósfera modificada, pero una de las más acertadas es la que la define como aquella que se crea por alterar la composición gaseosa normal del aire (78% N_2 , 21% O_2 , 0.03% CO_2 y trazas de gases nobles), para proporcionar una atmósfera óptima que permita prolongar la conservación, así como la calidad del producto (Zapata y Segura, 1996; Rodríguez *et al.*, 2005).

Existen muy pocos trabajos presentados sobre el almacenamiento de tuna bajo atmósferas modificadas y/o controladas. Estos trabajos se pueden dividir en dos categorías, en los primeros la tuna es almacenada entera (con cáscara), mientras que en la segunda categoría las tunas son tratadas mínimamente y empacadas bajo atmósferas modificadas.

El almacenamiento de tuna con cáscara bajo atmósferas modificadas y/o controladas da lugar a un aumento en la vida útil, evitando el daño por frío y la pérdida de peso en tunas almacenadas bajo atmósfera modificada pasiva a 6 °C con 95% de humedad relativa, durante tres semanas. Se ha reportado que la pérdida de peso fue de 3.7% y 1.5%, para tunas almacenadas sin empaque y con empaque (polietileno), respectivamente. Mientras que, con las mismas condiciones de almacenamiento, las pérdidas de peso fueron de alrededor del 7% para tunas sin empaque y 1.9% en tuna empacada con polietileno, durante un periodo de seis semanas (Piga *et al.*, 1996). Este mismo fenómeno fue observado en un estudio realizado por Morales (1995), observándose que la pérdida de peso es mayor en frutas almacenadas a temperatura ambiente (20 °C) en un 31%, mientras que en refrigeración (8 °C) es de 17.6% y en atmósferas controladas (10% CO_2 y 5% O_2) a 8°C se da una pérdida de peso de 1-1.4%, debido a la reducción de la respiración y del calor producido. Piga *et al.* (1996) y Morales (1995) reportaron que los efectos del daño por frío (oscurecimiento de cáscara) se reducían en tunas almacenadas bajo atmósferas modificadas y controladas, respectivamente. Piga *et al.* (1996) reportaron que en

tunas almacenadas sin empaque a 6 °C durante tres semanas, el daño por frío era de 35%; mientras que en tunas almacenadas en las mismas condiciones con empaque de polietileno el daño por frío era de 15%. Morales (1995) concluyó que las tunas no presentaban daño por frío después de 30 días de almacenamiento cuando las condiciones fueron de 10% de CO₂ y 5% de O₂.

El efecto del almacenamiento bajo atmósferas modificadas y/o controladas sobre el crecimiento de microorganismos todavía no está del todo claro, ya que no se encontraron diferencias significativas sobre el crecimiento de mohos en tunas empacadas y almacenadas en atmósferas modificadas y/o controladas comparadas con tunas almacenadas sólo en refrigeración, por lo tanto se cree que el efecto inhibitorio es únicamente por la temperatura de almacenamiento (Piga *et al.*, 1996; Morales, 1995).

La acidez titulable, pH, y sólidos solubles totales no se ven afectados por el empaquetado bajo atmósferas modificadas y/o controladas (Piga *et al.*, 1996).

El almacenamiento bajo atmósferas modificadas en tuna (10% CO₂+5% O₂) evita la degradación de la clorofila, manteniendo el color verde limón durante un período de almacenamiento de 30 días a 8 °C. Sin embargo, la textura no presenta diferencia significativa en tuna almacenada con y sin atmósferas modificadas (Morales, 1995).

7.2.4 Tuna mínimamente procesada

Ayala y Franco (1998) almacenaron tunas mínimamente procesadas; las tunas fueron peladas y empacadas en dos diferentes tipos de películas plásticas (polipropileno y polietileno de baja densidad) y almacenadas a dos temperaturas de refrigeración (1.5 y 5.5 °C). Los resultados muestran que el polipropileno y la temperatura de 1.5 °C son las condiciones que mejor conservan las cualidades de la tuna, manteniendo el color verde por diez días, una pérdida de peso de 0.6%, así como un incremento en la acidez y el contenido de azúcares reductores a los 20 días de almacenamiento. Sin embargo, se reportó una desviación de la ruta respiratoria y el establecimiento de un metabo-

lismo fermentativo. Ávila en 2007 reportó que tunas mínimamente procesadas empacadas y almacenadas a 10 °C durante diez días, tuvieron una pérdida de peso de 0.81% y 1.42%, en frutos tratados con preenfriamiento (aire forzado a 4 °C durante dos horas) y sin preenfriamiento, respectivamente; mientras que las tunas partidas en mitades presentaron una pérdida de peso de 0.39%, y las tunas partidas en cuatro partes presentaron una pérdida de peso del 1.83%, esto debido al mayor rompimiento de los tejidos celulares. Las tunas mínimamente procesadas (enteras y sin cáscara) y empacadas en bolsas de polipropileno, tienen una vida útil prolongada, por un período de almacenamiento de 20 días a 4 °C.

7.2.5 Productos procesados de tuna

Los pocos estudios realizados en la tuna explican la carencia de productos procesados, más que aquellos productos naturistas.

La pulpa de tuna es la porción de la fruta más valiosa y, como ya se mencionó anteriormente, tiene un pH elevado; por lo que se considera un producto de baja acidez, lo cual puede propiciar el crecimiento de microorganismos, especialmente de levaduras y bacterias mesófilas. La gran cantidad de semillas también es un obstáculo para su procesamiento y para obtener un producto atractivo al consumidor (Moßhammer *et al.*, 2006).

Diferentes investigadores han realizado estudios acerca de la estabilidad y viabilidad de productos procesados de tuna. A continuación se listan algunos productos obtenidos a partir de la tuna:

- Jugo y concentrado de tuna, con una baja actividad de agua y 63-67 °Brix que harían del concentrado un producto sumamente estable (Almendares *et al.*, 1994)
- Queso de tuna (Sáenz, 1995)
- Mermeladas de tuna (Sawaya *et al.*, 1983)
- Productos enlatados (Joubert, 1993)
- Frutas mínimamente procesadas y congelados (Moßhammer *et al.*, 2006)

- Bebidas refrescantes en polvo (Rodríguez *et al.*, 2005)
- Bebidas alcohólicas (Bustos, 1981).
- Tuna deshidratada, útil en cereales, sopas, barras energéticas, etc. (Moßhammer *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

La investigación demuestra que ya no sólo es una realidad, sino una necesidad el hecho de regresar al consumo de productos hortofrutícolas que proveen de una alimentación sana y segura, debido a la tendencia a enfermedades coronarias, oxidativas y de estrés. Productos del campo como la tuna no sólo son capaces de alimentar, sino que además proveen de esos componentes bioactivos que ayudarían al tratamiento de las enfermedades crónico-degenerativas.

Dadas sus características, la tuna es un fruto que se prefiere consumir en fresco, por lo tanto, se deben realizar mayores estudios para evaluar el efecto que tienen la temperatura, composición de gases y tipo de empaque sobre los componentes bioactivos, enzimas, microorganismos, parámetros fisicoquímicos y fisiológicos de la tuna durante el almacenamiento.

En México aún falta mucho por investigar y hacer en el trabajo de campo, para proveer de información científica y tecnológica que pueda apoyar y, por supuesto, ayudar en la aplicación de procesos y técnicas de conservación y tecnología poscosecha, tales como las atmósferas modificadas y/o controladas, así como las de procesamiento mínimo que actualmente están teniendo mucho auge por los múltiples beneficios que tienen en frutas y hortalizas como la tuna, ya que todo parece indicar que mantienen sus cualidades intactas.

REFERENCIAS

- Aguayo, E. (2003). *Innovaciones tecnológicas en la conservación de melón y tomate procesado en fresco*. (Tesis de doctorado). España: Universidad Politécnica de Cartagena.
- Almendares, L., Sáenz, C. y Berger, H. (1994). *Elaboración y concentración de jugo de tuna (*Opuntia ficus indica* (L) Mill), obtenido a partir de fruta fresca y con almacenaje refrigerado*. X National congress of food science and technology. Pucón, Chile.
- Artés, F., Gómez, P.A. y Artés, F. (2002). «Alteraciones físicas, fisiológicas y microbianas de frutas y hortalizas procesadas en fresco». *Alimentaria*, 335: 69-74.
- Askar, A. y El-Samahy, S. K. (1981). «Chemical composition of prickly pear fruit». *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 77(8), 279-281.
- Avila, J. (2007). *Respuesta a diferentes condiciones de frigoconservación y películas plásticas de tuna (*Opuntia amyclaea*) mínimamente procesada*. (Tesis de licenciatura). Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Ayala, G. y Franco, A. (1998). *Efecto de películas plásticas en tuna (*Opuntia Amyclaea*) mínimamente procesada*. (Tesis de licenciatura). Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Barrios, R. G., Hernández, A. B. y Corrales, G. J. (2003). Avances sobre las respuestas de tuna (*Opuntia* spp.) variedad burrona, apacerada comercialmente. Datos no publicados.
- Brackett, R. E. (1987). «Microbiological consequences of minimally processed fruits and vegetables». *Journal of Food Quality*, 10: 195-206.
- Bustos, O. E. (1981). «Alcoholic beverage from Chilean» (*Opuntia ficus-indica*). *American Journal of Enology and Viticulture*, 32: 228-229.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Kohen, R. y Livrea, M. A. (2002). «Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6895-6901.
- Cantwell, M. (1995). «Postharvest management of fruits and vegetables stems». En G. Barbera, P. Inglese, E. Pimienta, (Eds). *Agro-ecology*

- cultivation and uses of cactus pear* (120-141). FAO. Plant Production and Protection Paper No. 132. Italia.
- Carrillo, A., Cruz, A., Cárabez, A., Guevara, F. y Paredes, O. (2002). «Hydrolytic activity and ultrastructural changes in fruit skins from two prickly pear (*Opuntia* spp.) varieties during storage». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1681-1685.
- Castellanos, E. y Yahia, E. M. (2008). «Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5758-5764.
- Chae Lee, J., Ryul Kim, H., Kim, J. y Suk Jang, Y. (2002). «Antioxidant property of an ethanol. Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6490-6496.
- Corrales, J., Andrade, J. y Bernabe, E. (1997). «Response of six cultivars of tuna fruits to cold storage». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 2, 160-168. En línea. Obtenido desde: <http://www.jpacd.org>, accesada 20/01/2010
- Duru, B. y Turker, N. (2005). «Changes in physical properties and chemical composition of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) during maturation». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 7: 22-33. En línea. Obtenido desde: <http://www.jpacd.org>, accesada 21/01/2010
- El-Samahy, S. K., El-Hady A. A., Habiba, A. y Moussa, T. E. (2006). «Chemical and rheological characteristics of orange-yellow cactus-pear pulp from Egypt». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 8, 39-51. En línea. Obtenido desde: <http://www.jpacd.org>, accesada 21/01/2010
- El-Samahy, S.K., Abd El-Hady, E.A., Habiba, R.A. y Moussa, T.E. (2007). «Cactus pear sheet and pasteurized and sterilized cactus pear juices». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 9, 136-148. En línea. Obtenido desde: <http://www.jpacd.org>, accesada 21/01/2010
- Esquivel, P. (2004). «Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima». *Agronomía Mesoamericana*. 15(2), 215-219.
- Flores, C. A., de Luna, J. M. y Ramírez, P. P. (1995). *Mercado Mundial de la Tuna*. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas

de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo.

- Flores, C. A. y Corrales, J. J. (2003). *Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización*. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Flores, C. A. y Gallegos, C. (1993). *Situación y perspectivas de la producción de tuna en la región Centro-Norte de México*. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Estado de México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Galati, E. M., Mondello, M. R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S. y Taviano, M. F. (2003). «Chemical characterization and biological effects of sicilian (*Opuntia ficus indica*) (L.) Mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4903-4908.
- Gurrieri, S., Miceli, L., Lanza, C.M., Tomaselli, F., Bonomo, R.P. y E. Rizzarelli (2000). «Chemical characterization of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectives for the storage of its juice». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5424-5431.
- Hong, J.H. y Gross, K.C. (2001). «Maintaining quality of fresh-cut tomato slices through modified atmosphere packaging and low temperatures storage». *Journal of Food Science*, 66, 960-965.
- Inglese, P., Basile, F. y Schirra, M. (2002). Cactus pear fruit production. En: S. Park y Nobel, (Eds). *Cacti: Biology and Uses*. California: University of California Press.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2002). «Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce». *Postharvest Biology and Technology*, 26, 59-73.
- Joubert, E. (1993). «Processing of the fruit of five prickly pear cultivars grown in South Africa». *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 377-387.
- Kader, A. A. (2007). *Tuna. Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha*. Postharvest technology. Research and information center.

- En línea. Obtenido desde: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/tuna.shtml>, accesada: 01/02/2010
- Kanner, J., Harel, S. y Granit, R. (2001). «Betalains. A new class of dietary antioxidants». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5178-5185.
- Lund, D. B. (2002). Food Engineering for the 21st Century. En: J. Welti, G. Barbosa y J.M. Aguilera (Eds). *Enginnering and food for the 21st century* (pp 3-12). Boca Ratón, Florida: Food preservation technology series. Crc press.
- Mercado, J., López, M., Martínez, G., Sarahí, J. y Arévalo, S. (2007). *Estudio de las propiedades fisicoquímicas de las variedades de tuna rojo pelón (Opuntia ficus indica), morada, reina (Opuntia amyclaea) y Xocconostle (Opuntia matudae scheinvar) bajo almacenamiento refrigerado*. IX Congreso de ciencia de los alimentos y V foro de ciencia y tecnología de alimentos. Guanajuato, Gto. Mayo 31.
- Mizrahi, Y., Nerd, A. y Sitrit, Y. (2002). New fruits for arid climates. En: J. Janick, A. Whipkey (Eds.). *Trends in new crops and new uses* (378-384). Alexandria, VA: ASHS Press.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. y Carle, R. (2006). «Cactus pear fruits (*Opuntia* spp.): a review of processing technologies and current uses». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 8, 1-25. En línea. Obtenido desde: <http://www.jpacd.org>, accesada 20/01/2010.
- Morales, M. (1995). *Efecto del ethrel en el desahuatado de tuna (Opuntia spp) y almacenamiento en atmósfera controlada*. (Tesis de licenciatura). Estado de México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Morris, L.L. (1982). Chilling injury of horticultural crops: an overview. *American Society for Horticultural Science*, 17, 161-162.
- Piga, A., D'Aquino, S., Agabbio, M. y Schirra, M. (1996). «Storage life and quality attributes of cactus pears cv "Gialla" as affected by packaging». *Agricoltura Mediterranea*, 126, 423-427.
- Piga, A. (2004). «Cactus pear: A fruit of nutraceutical and functional importance». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 6, 9-22. En línea. Obtenido desde: <http://www.jpacd.org>, accesada 25/01/2010
- Rodríguez, F., Rivera, A. y González G. A. (2005). Uso de atmósferas modificadas y controladas. En: G. A. González, A. Gardea y F. Cuamea (Eds).

Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados (447-474). México: Ed. Logiprint Digital.

- Sáenz, C. (1995). «Food manufacture and by-products». En G. Barbera, P. Inglese y E. Pimienta (Eds). *Agro-ecology cultivation and uses of cactus pear (137-143)*. FAO. Plant Production and Protection Paper No. 132. Rome, Italy.
- Sáenz, C. (1996). «Foods products from cactus pear». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 1, 89-97. En línea. Obtenido desde: <http://www.jpacd.org>, accesada 20/01/2010.
- Sagarpa, (2006). «Retos y perspectivas para los pequeños productores mexicanos ante la apertura comercial». En línea. Obtenido el 16 de febrero de 2010 desde: www.sagarpa.gob.mx
- Sagarpa-SIAP, (2008). «Anuario estadístico de la producción agrícola tuna». En línea. Obtenido el 16 de febrero de 2010 desde: www.sagarpa.gob.mx
- Saltveit, M.E. y Cabrera, R.M. (1987). «Tomato fruit temperature before chilling influences ripening after chilling». *American Society for Horticultural Science*, 22(3), 452-454.
- Sawaya, W.N., Khatchadourian, H.A., Safi, W.M. y Al-Muhammad, H.M. (1983). «Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus-indica*, and the manufacturing of prickly pear jam». *Journal of Food Technology*, 18, 183-193.
- SIAP. (2001). «Análisis agropecuario de la tuna. México». En línea. Obtenido desde: <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/tuna.html>, accesada: 25/03/2010
- Stintzing, F. C., Schieber, A. y Carle, R. (2001). «Phytochemical and nutritional significance of cactus pear». *European Food Research and Technology*, 212, 396-407.
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. y Felker, P. (2005). «Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442- 451.
- Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari M. y Livrea, M. A. (2005a). «Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1266-1270.

- Tesoriere, L., Fazzari M., Allegra, M. y Livrea, M. A. (2005b). «Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7851-7855.
- Tesoriere, L., Fazzari, M., Angileri, F., Gentile, C. y Livrea, M. A. (2008). «In Vitro Digestion of Betalainic Foods. Stability and Bioaccessibility of Betaxanthins and Betacyanins and Antioxidative Potential of Food Digesta». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10487-10492.
- USDA (2009). Chemical composition of prickly pear pulp. National Nutrient Database for Standard Reference. En línea. Obtenido el 12 de febrero de 2010 desde: <http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm>
- Wiley, R.C. (1997). Introducción a las frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. En: R.C. Wiley y J. Salguero (Eds). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas* (1-14). Primera edición. Zaragoza, España: Acribia.
- Zapata, N., y Segura, P. (1996). *Nuevas tecnologías de conservación de frutas y hortalizas: atmósferas modificadas*. Cuadernos VALUE. Madrid: Ediciones Mundi-prensa.



El agave y sus productos

A. S. Castro-Díaz y J. A. Guerrero-Beltrán

México es un lugar que, por sus características climáticas, cuenta con una gran variedad de agaves, particularmente en la Meseta Central, y muchas de ellas son endémicas. Hay 26 estados de la República Mexicana en los que actualmente se cultiva agave, el cual se utiliza, principalmente, para la producción de tequila (*A. tequilana* Weber variedad azul), mezcal (*Agave salmiana*), pulque (principalmente de *Salmi-nae*), y para la obtención de larvas (conocidas como gusanos de maguey); estas últimas son muy apreciadas en gastronomía.

El pulque es una bebida que se obtiene por fermentación del aguamiel del maguey, que tuvo auge comercial durante las épocas prehispánica y colonial de México, por ser un producto rentable. Sin embargo, es muy poco conocido por las actuales generaciones. Hoy en día, para hacer al pulque más agradable, debido a que tiene un sabor y olor *sui generis*, se mezcla con frutas o vegetales, regulando su dulzor.

El objetivo de este artículo es mostrar la importancia del agave, así como la de los productos que de él se obtienen, algunos de los cuales son reconocidos internacionalmente.

8.1 EL AGAVE

El agave, mejor conocido como maguey (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008), es originario de México; se encuentra desde 34° latitud norte, hasta 60° latitud sur (García-Herrera *et al.*, 2010). Esto hace que en México se encuentre el 75% de las especies de agave que crecen en el continente

americano, un 55% de las cuales son endémicas (García-Herrera *et al.*, 2010). Gentry (1982) hace un resumen de taxones del agave, en el cual se encuentran dos géneros *Litsea* y *Agave*, el primero con 54 especies y el segundo con 82. A su vez, al subgénero agave lo integran 12 secciones, 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades, dando un total de 197 taxones.

El maguey es una planta monocárpica, ya que florece sólo una vez en su vida y, posteriormente, muere. La forma que adquiere con sus hojas (pencas) es como una roseta; sus pencas son verdes, gruesas y carnosas, y terminan con una punta afilada. Debido a su estructura e interacción con el medio, esta planta puede adaptarse a condiciones muy adversas como cerros pedregosos y laderas o montañas de gran altitud (García-Herrera *et al.*, 2010), así como también a llanos y lugares planos. Los climas que más le favorecen son el árido y el semiárido; es característico encontrar agaves en estas zonas. Debido a que los agaves están expuestos a cambios ambientales adversos, han desarrollado mecanismos bioquímicos y biofísicos a nivel celular y estructural para poder sobrevivir.

En los agaves, la membrana cuticular es el mecanismo de protección más importante por funcionar como una interface con el exterior (Bernardino-Nicanor *et al.*, 2012). También estas plantas poseen mecanismos que les permiten adaptarse al frío o la sequía; en este último caso hay una mayor eficiencia en la utilización del agua para las funciones vitales. En cuanto al suelo, se encuentra en condiciones de pH neutro a ligeramente alcalino (García-Herrera *et al.*, 2010). Estas condiciones parecen dar al agave las características idóneas para sus funciones vitales. La reproducción de los agaves cultivados es principalmente asexual (García-Herrera *et al.*, 2010), por medio de hijos del rizoma de la planta, y sexual en el caso de los que crecen de manera silvestre, ya que sus flores son polinizadas por los insectos; este tipo de reproducción da mayor resistencia genética a la planta.

La domesticación de las especies de agave ha contribuido a la evolución de estas plantas, dándoles variaciones fisiológicas y morfológicas a nivel local, nacional e internacional. Prueba de esto se puede observar en la sección Salmianae del género *Agave* (Mora-López *et al.*,

2011) que es una de las que más cambios ha registrado, ya que ha desarrollado mayor tamaño en la roseta y ha reducido sus estructuras de protección mecánica. La especie con mayor grado de domesticación fue la encontrada en linderos de cultivos agrícolas, el *A. mapisaga*, con dientes pequeños y rosetas grandes. La menos domesticada, como el *A. macroculmis*, se caracteriza por tener plantas pequeñas con espigas y dientes grandes.

Los estados de la República Mexicana en los que se cultiva el agave son: Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (SIAP, 2013). El total de hectáreas sembradas de agave en México en el año 2012 fue de 137,625.27, las cuales muestran una reducción gradual del 24.21% con respecto al año 2008, en el cual hubo 181,575.15 hectáreas. También cabe destacar que para el año 2012 hubo más hectáreas cosechadas de agave (19,876.09) que en 2008 (19,032.14), pero con una reducción del 6.06% de toneladas en la producción en ese año (tabla 8.1).

8.2 PRODUCTOS DEL AGAVE

8.2.1 Tequila

El tequila es una bebida alcohólica regional, obtenida por destilación de mostos de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Los mostos pueden ser enriquecidos con otros azúcares en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales. Se debe procesar en las instalaciones de la fábrica de un productor autorizado, la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en La Declaración General de Protección a la Denominación de Origen «Tequila» (DOT). El proceso se rige por la Norma Oficial Mexicana 006 SCFI-2012 Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones.

Tabla 8.1. Superficie sembrada, producción y precio de agave

Año	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)	Precio medio rural (\$/t)
2008	181,575.15	19,032.14	1,795,078.20	94.32	1,476.05
2009	165,475.10	15,321.47	1,197,943.03	78.19	1,086.32
2010	162,388.89	15,880.20	1,246,790.13	78.51	1,013.21
2011	165,310.38	19,731.10	1,703,852.61	86.35	1,132.30
2012	137,625.27	19,876.07	1,686,337.41	84.84	1,258.54

Fuente: SIAP, 2013.

El 13 de abril de 1978 se otorgó el certificado de origen del tequila, en el *Registre International des appellations d'origine* de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual en Génova, Suiza. La Denominación de Origen «Tequila» (DOT) comprende 181 municipios de cinco estados de la República Mexicana los cuales son: Jalisco con sus 125 municipios, Nayarit con 8, Guanajuato con 7, Tamaulipas con 11 y Michoacán con 30 (Consejo Regulador del Tequila, 2013). Solamente en estos 181 municipios se puede utilizar como materia prima el *Agave tequilana* Weber variedad azul, para producir tequila (Mellado-Mójica y López-Pérez, 2013).

Según el SIAP (2013), el estado de Jalisco es el que ha tenido más hectáreas sembradas de *A. tequilana* (tabla 8.2), lo cual representa un promedio de 72.51% del total nacional en los últimos cinco años, muy por arriba de los cuatro estados restantes. En 2012, Guanajuato le siguió a Jalisco con tan sólo 11.66%, que representó la mayor producción de agave para este estado. Cabe señalar que en el año 2008, Guanajuato era el estado con menor número de hectáreas sembradas de *A. tequilana* (sólo el 4.18% del total).

México tiene el uso exclusivo de la palabra «tequila», la cual se utiliza para nombrar a las bebidas alcohólicas que se producen con *A. tequilana* Weber variedad azul, creciendo exclusivamente en la demarcación que se rige bajo la normatividad vigente. Esta especie de agave, es de hojas de forma lanceolada, largas y fibrosas, de color azul debido a la cantidad de ceras que contiene (Academia Mexicana del Tequila, 2000).

Tabla 8.2 Superficie sembrada (ha) de *Agave tequilana* Weber variedad azul en México

Año	2008	2009	2010	2011	2012
Jalisco	121,146.25	107,700.12	100,316.30	94,086.09	82,775.95
Nayarit	9,745.03	9,215.03	7,840.03	12,401.56	7,549.13
Guanajuato	6,506.99	7,633.99	15,419.99	14,324.99	13,784.00
Tamaulipas	9,934.43	9,921.42	9,872.42	12,586.16	9,057.31
Michoacán	8,363.11	7,083.37	7,277.01	6,298.13	5,028.20

Fuente: SIAP, 2013.

La piña del agave tequilero es la materia prima para la elaboración de tequila. Cada piña tiene un peso de entre 30 y 70 kg, pero se pueden encontrar hasta de 150 kg. La concentración de azúcares de la piña se encuentra entre el 16% y el 28%, a diferencia de las hojas que está entre el 3.3% y 16.1% en peso fresco, dependiendo de la edad de la planta y el tamaño de la hoja (Montañez-Soto *et al.*, 2011). Las piñas y las hojas del *A. tequilana* Weber variedad azul, tienen carbohidratos de reserva que de no ser extraídos, son utilizados por la planta para la salida del escape floral. Las piñas de esta variedad de agave tienen un alto contenido de fructanos, los cuales son estructuras complejas que se sintetizan a partir de sacarosa y se clasifican en inulinas y levanas, también conocidas como agavinas (Montañez-Soto *et al.*, 2011).

El tequila se obtiene utilizando una planta de agave madura de diez años, edad a la cual tiene el mayor porcentaje de azúcares. Para el Consejo Regulador del Tequila, las operaciones unitarias para la producción de esta bebida son las siguientes: la planta se jima eliminando todas las pencas de la piña; se cuece en autoclaves durante doce horas y si es en horno de mampostería, el cocimiento puede durar hasta 48 horas, para convertir la inulina en azúcares como fructosa y sacarosa, que son fácilmente fermentables. Posteriormente, la piña ya cocida se muele y para extraer la mayor cantidad de azúcares de la fibra, se aplica agua a presión. En la fermentación las mieles de agave deben estar en un mínimo de 51% y dependiendo del tipo de tequila, se podrán adicionar hasta el 49% de mieles de azúcar estándar, piloncillo, melaza, glucosa o fructosa. La fermentación se realiza a temperatura ambiente (en invierno puede durar 24 horas) hasta que el mosto ya no tiene movimiento. Posteriormente se destila, obteniéndose el tequila

y vinazas (desecho). La destilación se realiza en dos etapas, una llamada destrozamiento y la otra rectificación; en esta última se obtiene un producto de mayor pureza (Consejo Regulador del Tequila, 2013)

De acuerdo al porcentaje de azúcares que se adicionaron para la fermentación, el tequila se puede clasificar en dos categorías: 100% de agave, que es producto del proceso de fermentación y destilación de mieles de *A. tequilana* Weber variedad azul, producido y embotellado por un productor autorizado dentro de la demarcación de origen; y tequila producto de la fermentación y destilado de mieles de *A. tequilana* Weber variedad azul, al que en el mosto previo a la fermentación se adicionó otro tipo de azúcares en una proporción no mayor al 49% (NOM-006-SCFI-2012).

El tequila también se clasifica dependiendo de las características adquiridas en la destilación y el tiempo de maduración (tabla 8.3). Cabe señalar que el sabor del tequila puede ser suavizado (abocado), agregando un porcentaje no mayor al 1% de uno o más de los siguientes ingredientes: color caramelo, extracto de roble o encino natural, glicerina y jarabe a base de azúcar, exceptuando el tequila blanco plata. La NOM-006-SCFI-2012 también establece que no se permiten las mezclas en frío y para ajustar al contenido alcohólico comercial, se debe utilizar agua de dilución, la cual puede ser potable, destilada o desmineralizada (NOM-006-SCFI-2012).

Tabla 8.3 Categoría, clase y maduración del tequila

Categoría	Porcentaje	Clase para cada categoría	Maduración
Tequila 100% de agave*	100% de azúcares de <i>A. tequilana</i> Weber variedad azul	Blanco plata	Menor a dos meses
		Joven u oro	Al menos dos meses
Tequila	51% de azúcares de <i>A. tequilana</i> y hasta 49% de otros azúcares reductores	Reposado añejo	Mayor a tres meses
		Extra añejo	Mayor a tres años

* También conocido como: «100% de agave», «100% puro de agave», «100% agave», o «100% puro agave»

8.2.2 Mezcal

El mezcal es una bebida tradicional de México, alcohólica, de origen mexicano, producto de la fermentación de los azúcares extraídos de la piña cocinada de diferentes agaves como el *A. salmiana* (Verdugo *et al.*, 2011) y *A. angustifolia*, *A. esperrima*, *A. weberii* y *A. potatorum*, entre otros (Molina-Guerrero *et al.*, 2007). La planta, para poder ser utilizada en la producción de mezcal, debe tener una madurez fisiológica de entre siete y doce años (García-Herrera *et al.*, 2010).

El proceso para la elaboración del mezcal es artesanal y muy similar al del tequila, con la diferencia de que no es tecnificado y se pueden utilizar varias especies de agave para su elaboración. Las operaciones unitarias se resumen en: recolección de la materia prima, cocimiento de la piña, molienda de la piña cocida, doble fermentación, destilación en alambiques de cobre, y maduración en algunos casos. El cocimiento de las piñas del agave tiene la función de hidrolizar a los fructanos, obteniendo azúcares simples como fructosa. Estos azúcares son fermentados de manera natural, en periodos que van de uno a dos días. Las levaduras que fermentan los azúcares son de diferentes géneros. Verdugo *et al.* (2011) encontraron en el *Agave salmiana* 192 colonias de levaduras, de las que identificaron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Clavispora lusitaniae*, *Saccharomyces exiguus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia kluyveri* y *Candida ethanolica*, entre otras. Estas levaduras convierten los azúcares a etanol en una proporción de 0.39 g/g en la primera fermentación y un valor similar en la segunda. Para Molina-Guerrero *et al.* (2007), la destilación se realiza cuando el mosto contiene de 3 a 6% (v/v) de etanol, obteniendo mezcal blanco o joven.

Cabe señalar que una característica de esta bebida es que su sabor y olor los adquiere en el cocinado de la piña, la fermentación de azúcares y el destilado, considerando que algunos otros sabores y olores los tiene de manera natural el agave. Molina-Guerrero *et al.* (2007), encontraron 85 componentes que se agruparon por su naturaleza química en acetales, ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, fenoles y terpenos, siendo los más abundantes los alcoholes,

ésteres y ácidos. Vera *et al.* (2012), encontraron, en la elaboración de mezcal a partir de *A. angustifolia* Haw, compuestos volátiles como acetato de etilo, etanol, metanol, 3- metil-1-butanol, propanol, 2-metil-1-propanol y ácido acético, con diferencias de una estación a otra. Con respecto a la adición de sulfato de amonio para reducir el tiempo de fermentación, se afecta la producción de etanol, propanol y butanol, pero disminuye la cantidad de metanol, acetato de etilo y la producción de ácido acético, por lo que es más recomendable adicionar sulfato de amonio en otoño que en primavera (Vera *et al.*, 2012).

8.2.3 Pulque

El pulque es una bebida ancestral, blanca, lechosa y viscosa, con sabor y olor fuerte a maguey, de baja graduación alcohólica, menor al 6% (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008), que se obtiene por lotes, la cual tuvo gran auge y control por los aztecas en el siglo XIII (Chellapandian *et al.*, 1998). Los aztecas distinguían diferentes tipos de pulque: «metoctli» o vino de agave, «iztacoctli» o vino blanco, y «teoctli» o ceremonial o vino dios. Para Lappe-Oliveras *et al.* (2008), la palabra «pulque» se deriva de la palabra «poliuhquiocli», con la cual se designaba al pulque descompuesto de sabor y olor desagradable. Los españoles utilizaban la palabra «pulque» para designar a esta bebida recién elaborada. Con la caída del imperio azteca el pulque perdió su importancia religiosa, pero se siguió consumiendo por su importancia nutricional, inclusive como sustituto de agua.

Actualmente se consume, escasamente, pero se hacen esfuerzos por revivir si no su auge, sí su consumo. De su venta en pulquerías que eran antihigiénicas y malolientes, pasó a ser consumido en restaurantes, donde es considerado una bebida gourmet. Inclusive desde 2009, la empresa «Productos Naturales de Agave, S.A. de C.V.», en Nancamilpa, Tlaxcala, exporta pulque natural y de sabores en latas a Estados Unidos y Alemania (Servín, 2009).

8.2.3.1 Agave pulquero

Según el SIAP (2013), los estados de México que cultivan agave pulquero son: Coahuila, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz. Jalisco no sólo produce agave para la elaboración de tequila, también produce agave pulquero. Michoacán también es un estado que produce agave para pulque, ya que de sus 112 municipios, sólo 30 pertenecen al DOT.

La savia (aguamiel) que se obtiene de varias especies de agave, se utiliza para la elaboración de pulque. Para Mora-López *et al.* (2011), los siguientes taxones de la sección Salmianae son utilizados principalmente para producir aguamiel: *Agave macroculmis*, *A. mapisaga*, *A. mapisaga var. lisa*, *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. ferox*, *A. salmiana* subsp. *crassispina* y *A. tecta*. Ramírez-Higuera (2010) incluye otras variedades para la producción de aguamiel como: *A. atrovirens* Karw., *A. hookeri*, *A. americana*. Así como también para el Estado de México incluye: *A. teometl* Zucc., *A. weberi* Cels., *A. altissima* Jacobi., *A. compliala* Trel., *A. gracillispina* Englem., *A. malliflua* Trel. y *A. mapisaga* Trel.

Cabe resaltar que el *Agave salmiana* var. *salmiana* le da un sabor fuerte al pulque obtenido, lo cual agrada a los consumidores (Mora-López *et al.*, 2011).

8.2.3.2 Preparación del agave

El proceso para la obtención del aguamiel comienza con la preparación del agave, el cual debe ser un maguey adulto (8 a 10 años). Al agave se le realiza el «capado o capazón», que consiste en cortar todas las pencas tiernas del centro (cogollo), para evitar la floración y que el escapo floral aproveche los azúcares de la planta. De dos a tres meses después (añejado del agave) se realiza la «picazón», que consiste en formar un cajete en la base de la piña y, finalmente, en las dos semanas subsecuentes el cajete se raspa (ruptura de vasos capilares) nuevamente, hasta formar un cuenco más profundo para que se acumule por exudación la savia del maguey. El cambio de coloración de rojo a amarillo oscuro de las bases de las pencas del agave indica que la producción de aguamiel se ha iniciado. En el proceso de maduración

el contenido de azúcares en la savia (aguamiel) aumenta de 7 a 14% (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

8.2.3.3 «Tlachicado»

El aguamiel (savia) obtenido del agave, es un líquido translúcido, amarillento (o turbio), ácido, ligeramente espeso con olor a hierba (fresco). Está constituido principalmente por agua y azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), proteínas, gomas y sales minerales (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). La normatividad mexicana (NMX-V-022-1972 SECOFI-1972) distingue dos tipos de aguamiel. El tipo I corresponde al de mejor calidad por estar más claro y con un contenido de azúcares más alto y el tipo II que incluye a los demás tipos de aguamiel.

«Tlachicar» es el proceso mediante el cual se recoge el aguamiel por succión con un «acocote», el cual es un calabazo alargado que se utiliza para extraer el aguamiel del agave. También se utiliza un instrumento que tiene la misma función o una taza cafetera, dependiendo de qué tan alto o pequeño sea el agave. El volumen de aguamiel en el cajete aumenta paulatinamente con respecto al tiempo. Ortiz-Basurto *et al.* (2008), encontraron que se puede recoger al inicio de la producción de aguamiel desde 0.4 litros por planta por día y aumentar a cuatro o seis litros por planta por día los primeros dos meses y luego va disminuyendo hasta obtener 0.4 litros por planta por día hacia el final de la producción, la cual puede durar de cuatro a seis meses. La recolección de aguamiel se realiza dos veces al día, tapando el cajete con las mismas hojas del maguey. Cada agave tiene una producción total de 500 a 1000 litros. Gentry (1982) y Tovar *et al.* (2008) reportan para el *A. atrovirens* y el *A. salmiana*, hasta 1500 litros durante su periodo de producción. El aguamiel se almacena en recipientes como castañas de madera u odres, los cuales se transportan hasta los tinacales de fermentación.

Debido a que el aguamiel utilizado para la obtención del pulque es rico en factores de crecimiento en un medio acuoso, representa un sustrato favorable para diferentes microorganismos que pueden proceder del agave, del acocote, de insectos y del polvo, ya que el agave se encuentra a la intemperie. Esta población heterogénea de microor-

ganismos es la que da inicio a una serie de fermentaciones consecutivas que son: láctica, alcohólica y acética (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

8.2.3.4 Obtención del pulque

El pulque resulta de la fermentación del aguamiel con microorganismos autóctonos, de los cuales se han identificado más de 50 géneros dependiendo del tipo de agave utilizado (Cervantes-Contreras y Pedrosa-Rodríguez, 2007). Para la producción del pulque, la fermentación de aguamiel se inicia en el maguey, continuando su proceso natural en los tinacales (tinajas de fermentación).

Debido a la transformación bioquímica por la acción microbiana que sufre la savia, ésta se vuelve un medio propicio para el crecimiento de diferentes microorganismos como bacterias productoras de ácido láctico (*Leuconostoc*, especies de *Lactobacillus* homo y heterofermentativas), levaduras (*Saccharomyces* y otras) y *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*, que convierten los azúcares en alcohol y otros productos. La savia también contiene bacterias productoras de dextranos (*Leuconostoc* subsp.), bacterias productoras de ácido acético (*Acetobacter* subsp.) y microorganismos corruptores.

Para una fermentación más rápida del aguamiel, se puede acelerar el proceso adicionando una cantidad variable de pulque ya fermentado (semilla), que corresponde al pulque tipo I, al igual que las primeras fermentaciones, ya que aquí se establece un equilibrio bioquímico entre sustrato fermentable y microorganismos básicos.

El tiempo de fermentación para obtener pulque es variable, ya que se puede producir dulce o fuerte, dependiendo del tiempo de fermentación, el cual puede ser de 12 a 48 horas a 25 °C (Cervantes-Contreras y Pedrosa-Rodríguez, 2007) o a temperatura ambiente, que es como se produce en el medio rural. Este proceso es muy delicado, ya que de no tener cuidado con la inocuidad en las diferentes fases, se puede inhibir a los microorganismos mesófilos.

El pulque después de adquirir sus características (grado alcohólico, viscosidad ideal, sabor y olor), debe ser comercializado, ya que es un producto perecedero con vida de anaquel de 1 a 3 días (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). También se puede resaltar su sabor agregando

frutas o vegetales y envasarlo en lata, que es como se comercializa a otros países. En la figura 8.1 se presenta un diagrama sobre el proceso de elaboración del pulque curado.

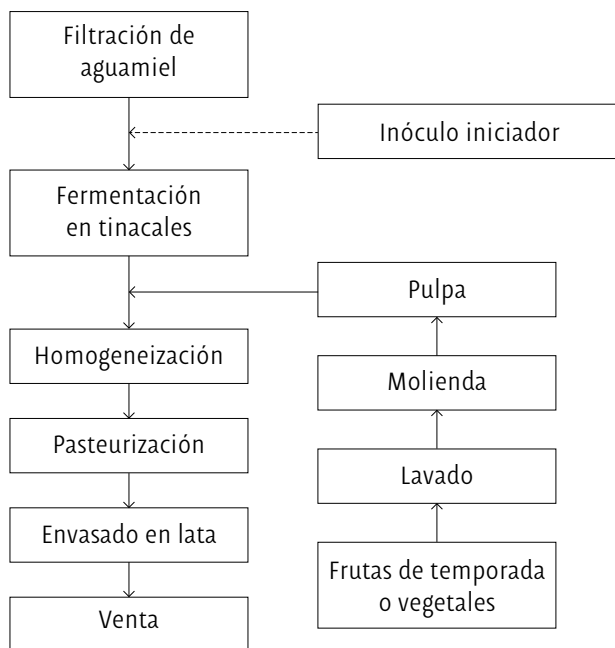


Figura 8.1

Diagrama de bloques del proceso de producción de pulque curado

8.3 OTROS PRODUCTOS DEL AGAVE

8.3.1 Gusano rojo (*Hypopta agavis B*)

El *Agave salmiana* está relacionado al gusano rojo, llamado «chini-cuil», «tecol» o simplemente gusano rojo de maguey, el cual es una plaga de éste, ya que se alimenta de los tejidos de las diferentes partes del maguey. Este gusano es larva de la palomilla *Comadia redtenba-*

cheri Hammerschmidt (Lepidoptera: cossidae) y vive como huésped en el maguey, hasta completar su ciclo de vida que es de ocho meses a un año (Llanderal-Cázares *et al.*, 2010) o de cinco meses si el agave está en invernadero. Sus siete estadios larvales los pasa en el cuello o raíz de la piña del maguey, la cual puede contener de 15 a 30 larvas (García-Herrera *et al.*, 2010). La colecta de los gusanos se realiza a mano, principalmente en el mes de septiembre. Cabe resaltar que los adultos permanecen con vida solamente de tres a cinco días, por tener un aparato bucal no evolucionado que no les permite alimentarse fuera de la planta.

Las larvas del agave se han comido siempre, pero últimamente han adquirido auge en la gastronomía mexicana. El gusano rojo contiene siete aminoácidos esenciales y un valor energético de 607.9 kcal/100 g (Llanderal-Cázares *et al.*, 2010), el cual es uno de los más elevados para insectos comestibles. El «chinicuil» se encuentra y comercializa en los estados de la Mesa Central, Oaxaca, San Luis Potosí y Chiapas.

8.3.2 Gusano blanco (*Acentrocneme hesperiaris*)

El gusano blanco de maguey es un insecto con un alto valor alimenticio que se encuentra en las pencas, las cuales al contenerlo tienden a marchitarse. En México, como en Estados Unidos de América y Europa, es muy apreciado. Los estados en los cuales se encuentra y comercializa son Durango, Zacatecas, Aguascalientes y los de la Mesa Central de México (García-Herrera *et al.*, 2010). Su recolección es en los meses de mayo a junio. Se pueden conservar en refrigeración por varios meses.

8.3.3 Mixiote

El mixiote es un platillo de origen prehispánico que, para su elaboración, utiliza la membrana cuticular de la hoja del agave, la cual es el medio de protección y defensa más importante para la planta. Cabe mencionar que los agaves producen en las hojas tres formas de cristales de oxalato de calcio (drusas, estiloides y rafidios), los cuales se detectan principalmente en las primeras etapas del desarrollo de las

plantas jóvenes (sexto año), ya que posteriormente sólo se encuentran las drusas en la membrana cuticular. Los cristales de oxalato de calcio actúan como mecanismos de protección contra insectos y animales forrajeros (Bernardino-Nicanor *et al.*, 2012); en el ser humano causan dermatitis. La función biológica de los cristales en la planta es dar alta turgencia y ser una forma de almacenamiento de calcio y ácido oxálico.

Es importante considerar que el retiro de la cutícula del agave es destructivo para la planta, ya que le ocasiona la muerte por deshidratación y pérdida de superficie para realizar procesos fotosintéticos (José y García, 2000). El estado de Hidalgo es el único reportado por el SIAP (2013) como productor de mixiote (23 Ha sembradas). La actividad debe ser realizada en cultivos controlados ya que de no ser así, se propiciaría la extinción del magüey.

8.3.4 Jarabe de agave

Según la Norma Mexicana NMX-FF-110-SCFI-2008, el jarabe de agave es la sustancia dulce proveniente de la hidrólisis de los oligosacáridos del agave, a la cual se le puede añadir color y sabor, pero no almidones, melazas, glucosa, dextrosa, fructosa u otros azúcares de origen diferente al agave. La normatividad describe tres tipos de jarabe que son: jarabe de agave, jarabe de agave 100% (o jarabe 100% de agave), el cual no debe tener mezclas de diferentes tipos de agaves, y el jarabe «orgánico», que debe cumplir con los requisitos establecidos en la Ley de Productos Orgánicos (2006), en la cual se establece que sólo los productos que cumplan con esta ley podrán ser identificados con el término «orgánico», prohibiendo la utilización de productos de síntesis química.

Mellado-Mójica y López Pérez (2013) observaron que el jarabe de *A. tequilana* Weber variedad azul presenta una gran gama de tonalidades (0.017-0.961 a 560 nm), por lo que la tonalidad no es una variable adecuada para identificarlo. Los jarabes de *A. tequilana* contienen abundancia de fructosa (mayor a 500 mg/g) y ausencia de sacarosa. Algunos, dependiendo de la región de procedencia, contienen trazas

de fructooligosacáridos (cetosas y nistosas) formados en la hidrólisis de los fructanos al elaborar el jarabe.

CONCLUSIONES

El agave es una planta nativa de México que ha brindado innumerables beneficios al hombre como ninguna otra planta. Muchos productos que a partir de ella se obtienen, están posicionados a nivel mundial como el tequila, cuyo proceso de elaboración ha adquirido Denominación de Origen Tequila (DOT) reconociendo la identidad y calidad de este producto mexicano. El mezcal y el pulque son bebidas ancestrales que se siguen elaborando de manera tradicional, este último tratando de recuperar el auge de otro tiempo. Esta planta también sirve de hospedero para larvas que son muy apreciadas tanto en la gastronomía nacional como en la internacional. Por lo tanto, el agave es una planta de gran importancia socioeconómica para México.

REFERENCIAS

- Academia Mexicana del Tequila A. C. (2000). En línea. Obtenido el 9 de noviembre de 2013 desde: <http://www.acamextequila.com.mx/amt3/elagave.html>
- Bernardino-Nicanor, A., Mora-Escobedo, R., Montañéz-Soto, J., Filardo-Kerstupp, S. y González-Cruz, L. (2012). «Microstructural differences in *Agave atrovirens* karw leaves and pine by age effect». *African Journal of Agricultural Research*, 7(24), 3550-3559.
- Cervantes-Contreras M. y Pedrosa-Rodríguez A. M. (2007). «El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopía raman». *Nova Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 5, 101-212.
- Chellapandian, M., Larios C., Sánchez-González, M. y López-Munguía, A. (1998). «Production and properties of a dextran sucrose from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PG isolated from pulque a tradicional

- Aztec alcoholic beverage». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 51-56.
- Consejo Regulador del Tequila. (2013). En línea. Obtenido el 10 de noviembre de 2013 desde: <http://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- García-Herrera, E., Méndez-Gallegos, S. y Talavera-Magaña, D. (2010). «El género *Agave* spp. En México principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica». *RESPYN*. Edición especial. 5, 109-127
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of continental North America*. Arizona: The University of Arizona press.
- José, R. y García E. (2000). «Remoción cuticular (“mixiote”) y desarrollo foliar en los agaves pulqueros (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*)». *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 66, 73-79.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrison-Gabiño, J. y Herrera-Suárez, T. (2008). «Yeasts associated with the production of mexican alcoholic non distilled and distilled agave beverages». *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1035-52.
- Ley de productos orgánicos. (2006). En línea. Obtenido el 9 de noviembre de 2012 desde: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LPO.pdf>
- Llenderal-Cazares, C., De los Santos-Posadas, H. M., Almanza-Valenzuela I., Nieto-Hernández, R. y Castillejos-Cruz, C. (2010). «Establecimiento del gusano rojo en plantas de magüey en invernadero». *Acta Zoológica Mexicana*, 26(1), 25-31.
- Mellado-Mójica, E. y López-Pérez, M. (2013). «Análisis comparativo entre jarabe de agave azul (*Agave tequilana* Weber bar. Azul) y otros jarbes naturales». *Agrociencia*, 47, 233-244.
- Molina-Guerrero, J., Botello-Álvarez, J., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J., Jiménez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M. y Rico-Martínez, R. (2007). «Compuestos volátiles en el mezcal». *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41-50.
- Montañez-Soto, J. Venegas-González, J. y Vivar-Vera, M. (2011). «Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la ca-beza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul». *Bioagro*, 23(3), 199-206.
- Mora-López, J., Reyes-Aguirre A., Flores-Flores, J., Peña-Valdivia, B. y Aguirre-Rivera, R. (2011). «Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género *Agave*». *Agrociencia*, 45, 465-477.

- Norma Mexicana NMX-V-022-1972 «aguamiel», «hidromiel». En línea. Obtenido el 10 de noviembre de 2013 desde: <http://www.colpos.mx/bancodennormas/nmexicanas/NMX-V-022-1972.PDF>
- Norma Mexicana NMX-FF-110-SCFI-2008 Alimentos jarabe de agave 100%-especificaciones y métodos de prueba. En línea. Obtenido el 10 de noviembre de 2013 desde: <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2007/proy-nmx-ff-110-scfi-2008.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. Bebidas alcohólicas tequila-especificaciones. Diario Oficial. En línea. Obtenido el 10 de noviembre de 2013 desde: http://www.diario-o.com/dof/2012/12/13/seeco_13dic12.pdf
- Ortiz-Basurto, R., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M. y Pierre Belleville, M-P. (2008). «Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period». *Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3682-3687.
- Ramírez-Higuera, A. (2010). *Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (Agave salmiana) en Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. (Tesis de maestría no publicada). México: Instituto Politécnico Nacional.
- Servín, J. (2009). «Puro corazón de maguey». *El Universal*. En línea. Obtenido el 10 de noviembre de 2013 desde: <http://www.eluniversal.com.mx/articulos/56568.html>
- SIAP. (2013). *Anuario estadístico de la producción agrícola*. En línea. Obtenido el 16 de octubre de 2013 desde http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350
- Tovar, R., Olivos, M. y Gutierrez M. (2008). «Pulque and alcoholic drink from rural Mexico contains Phytase. It's in vitro effects on corn tortilla». *Plant Foods Human Nutrition*, 63(4), 189-192.
- Vera, A., López, M. y Chávez-Servía, J. (2012). «Chemical composition and volatile compounds in the artisanal fermentation of mezcal in Oaxaca, México». *Biotechnology*, 11(78), 14344-14353.
- Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, A. González, A., Coria, R. y Gschaedler, A. (2011). «Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentation from *Agave salmiana*». *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 497-506.



El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento

Z. N. Juárez, M. E. Bárcenas-Pozos y L. R. Hernández

Los cereales se han considerado históricamente como el eje de la agricultura y la fuente más productiva de alimentos. La mayor parte de la energía que consume el hombre proviene de los cereales, tales como trigo, arroz y maíz; de todos éstos, se considera que el trigo es el más abundante y productivo (Serna-Saldívar, 2009).

En los cereales, lo más destacado es que sus frutos maduros son no perecederos y pueden ser almacenados para consumirse gradualmente o mantenidos como semilla para futuras plantaciones (Serna-Saldívar, 2009). Sin embargo, durante el almacenamiento, los granos pueden ser atacados por insectos (principalmente gorgojos y polillas), microorganismos (hongos y bacterias), roedores y pájaros (Webley, 1994). Los microorganismos que generan mayor preocupación son los hongos, ya que no sólo causan enfermedades en humanos y animales (Reddy *et al.*, 2010), sino que también afectan a la calidad del grano y su harina. Se ha reportado el aislamiento e identificación de varias especies de hongos en granos de trigo recién cosechados, algunas de las cuales son productoras de micotoxinas (Embaby *et al.*, 2012).

Para proteger los granos almacenados del ataque de plagas, comúnmente éstos son tratados para su almacenamiento con pesticidas sintéticos tales como compuestos organoclorados, organofosforados y piretroides; sin embargo, esto ha tenido graves repercusiones en la salud, como por ejemplo, enfermedades crónicas neurológicas, alteraciones hormonales, cáncer, malformaciones o defectos congénitos en hijos de madres expuestas a estos pesticidas e incluso la muerte. Hay evidencia de que los fungicidas sintéticos prevalecen en los cereales y sus derivados en un 20.1% de las muestras (Vicente *et al.*, 2004).

Este artículo tiene el objetivo de analizar el estado actual del conocimiento en estos temas, realizando una revisión de la bibliografía más reciente, partiendo de las generalidades y características del grano de trigo hasta los principales problemas que se presentan durante su almacenamiento, así como las formas usadas para contrarrestarlos, haciendo hincapié en los hongos comúnmente encontrados durante su almacenamiento y en los pesticidas utilizados en la actualidad para preservar los granos.

9.1 GENERALIDADES DEL GRANO DE TRIGO

9.1.1 Historia y producción

En la antigüedad, la diosa griega Deméter, que significa señora, era considerada la diosa de la alimentación, en particular del pan y la agricultura. En la mitología romana, su equivalente es Ceres, derivando de ésta el nombre cereal (Serna-Saldívar, 2009).

El trigo es uno de los cereales que más aparecen en la literatura occidental, incluso en la Biblia es citado hasta 40 veces y, en la parábola del sembrador, se hace alusión a la bondad. Su origen se remonta a la antigua Mesopotamia; las evidencias más antiguas provienen de Siria, Iraq, Turquía y Jordania. Existen hallazgos de restos de grano de trigo que datan del año 6700 a.C. Fue introducido en México por los españoles en el año 1520 y luego llevado a sus demás colonias (Gómez-Pallarés *et al.*, 2007).

Los cereales constituyen un conjunto de plantas de gran importancia para el hombre debido a su aporte energético y de nutrientes. Entre los cereales de mayor producción mundial se encuentran el maíz, el arroz y el trigo, que abastecen el 80% de la producción total de alimentos, este último es el cereal más consumido por el hombre occidental y es cultivado en 115 países siendo los principales productores China, Estados Unidos e India; una gran extensión de cultivo se encuentra en Rusia, Europa, Canadá, Australia y Argentina (Serna-Saldívar, 2009).

La palabra trigo proviene del latín *Triticum* cuyo significado es quebrado, triturado o trillado y hace referencia al proceso que se sigue para separar la semilla de su cascarilla. El grano de trigo es fácil de transportar y almacenar, utilizándose para obtener una gran variedad de productos, tales como harina, harina integral, sémola y malta, los cuales constituyen la materia prima para la elaboración de otra gran variedad de productos alimenticios. Además, en Europa fue importante también para la fabricación de papel y cartón (Gómez- Pallarés *et al.*, 2007; Serna-Saldivar, 2009).

En México, se produce trigo en Chihuahua y la región del Bajío, aunque también en Sonora y norte de Sinaloa. A pesar de que sólo el 10% de la región destinada al cultivo de cereales es utilizada para producir trigo, a éste le corresponde el 20% de la producción nacional de cereales debido a su alto rendimiento, cercano a las cuatro toneladas por hectárea. La temperatura óptima para su crecimiento está entre 10 y 25 °C, pero puede llegar a crecer a temperaturas entre 3 y 33 °C. En cuanto a la humedad, es deseable que ésta sea alta durante el espigado, mientras que durante la maduración se espera que sea baja para facilitar el secado del grano, evitar su germinación y el crecimiento de microorganismos (Dupont y Altenbach, 2003; Serna-Saldivar, 2009).

Con respecto a la producción y comercialización, son muy importantes el rendimiento y el porcentaje de proteínas, los cuales dependen de las condiciones del medio ambiente y el clima (Dupont y Altenbach, 2003). Las heladas y la falta de humedad pueden incrementar el contenido proteico relativo, modificando sus propiedades funcionales, resultando de este grano una harina más grisácea (Dupont y Altenbach, 2003; Takayama *et al.*, 2006). Otro factor que afecta de manera importante la formación y porcentaje de nutrientes en el grano es el momento en el que se aplican los fertilizantes. La deficiencia de azufre limita su producción, ya que provoca la reducción del tamaño del grano y su calidad, disminuyendo la proporción de proteínas, lo cual se traduce en modificaciones reológicas de las masas (Zhao *et al.*, 1999; Kamal *et al.*, 2009).

El trigo se clasifica de acuerdo a la estación de cultivo, color, dureza, textura del endospermo y contenido proteico (Gómez- Pallarés

et al., 2007). Los trigos que se siembran en otoño, se cosechan al inicio del verano y son conocidos como trigos de ciclo largo. Los trigos de ciclo corto se siembran en primavera y se cosechan a finales de verano; éstos tienen rendimientos menores que los trigos de invierno, pero presentan la ventaja de tener mayor contenido de gluten y fuerza proteica, lo que les confiere mejores propiedades para la panificación (Altenbach *et al.*, 2003).

La dureza del trigo está relacionada con la forma en la que el endospermo se rompe (Campbell *et al.*, 2007) y es lo que le otorga la calidad harinera, ya que a mayor dureza, mayor es el contenido proteico (Chang *et al.*, 2006). Los trigos duros producen una harina con granulometría amplia, mientras que los trigos blandos producen una harina muy fina. El trigo más duro es de la especie *Triticum durum*, cuya harina se usa para fabricar pastas (Dendy y Dobraszczyk, 2004; Turnbull y Rahman, 2002).

En México, los trigos se clasifican de acuerdo a su funcionalidad en fuertes, medio fuertes, suaves, tenaces y cristalinos. En la región noroeste del país, Sonora y norte de Sinaloa, se siembran los trigos panaderos y cristalinos (que corresponden a los trigos fuertes, medio fuertes, tenaces y cristalinos), mientras que los trigos suaves se cultivan en el estado de Guanajuato (región del Bajío) y en el estado de Chihuahua (Serna-Saldívar, 2009).

9.1.2 Estructura y composición del grano de trigo

Las variedades del trigo actuales (*Triticum aestivum*) han evolucionado por diferenciación genómica y por cruzamiento con trigos silvestres. Las tres especies originales, conocidas como trigos antiguos, son espelta (*Triticum spelta*), farro (*Triticum diococcum*) y escanda (*Triticum monococcum*). Una ventaja de los trigos antiguos es que retienen su cascarilla, que protege al grano maduro del ataque de insectos y se elimina antes del procesamiento del grano; en cambio, en los granos actuales esta cascarilla se trilla fácilmente durante la cosecha (Collar, 2007).

El fruto de los cereales se denomina botánicamente cariósipide. El grano de trigo tiene una forma ovalada y sus extremos redondeados, sobresaliendo el germen en uno de ellos y en el otro, un mechón de finos pelos (pincel). En la figura 9.1 puede observarse que el trigo está formado por tres partes principales: endospermo, salvado y germen (Serna-Saldívar, 2009). La mayor parte del salvado la constituye el pericarpio que está formado por la epidermis, el epicarpio y el endocarpio; contiene vitaminas, minerales y gran cantidad de proteínas. Entre el salvado y el endospermo se encuentra la capa de aleurona que cumple un papel muy importante en el desarrollo del embrión durante la germinación. El endospermo, por su parte, es el depósito de alimento para el embrión y constituye el 82% del peso del grano (Ritchie *et al.*, 2000; Mabile *et al.*, 2001; Shewry y Halford, 2002). Está compuesto por almidón, proteínas y, en menor proporción, celulosas; además, tiene una baja proporción de vitaminas y minerales. El germen de trigo es rico en vitaminas del grupo B y E, y también contiene grasas, proteínas y minerales (Shewry y Halford, 2002; Gómez-Pallarés *et al.*, 2007).

La composición del grano de trigo puede variar de acuerdo a la región, condiciones de cultivo y año de cosecha. También la calidad y cantidad de nutrientes dependen de las especies de los trigos, que influirán en sus propiedades nutritivas y funcionales (Kamal *et al.*, 2009; Serna-Saldívar, 2009). En general, el grano maduro está compuesto por hidratos de carbono, compuestos nitrogenados, lípidos, minerales y agua, junto con trazas de vitaminas, enzimas y otras sustancias (Kent, 1987; Altenbach *et al.*, 2003).

Los hidratos de carbono totales constituyen del 77 al 87% de la materia seca total y son los componentes más importantes, de los cuales aproximadamente el 64% es almidón y el resto, carbohidratos solubles e insolubles que constituyen la fibra dietética (Kent, 1987). La fracción insoluble está compuesta principalmente por celulosa y hemicelulosa, encontrándose en las envolturas del grano y no es digerible para el humano, aunque puede ser desdoblada en el intestino grueso. Este desdoblamiento, llamado hidrólisis, baja el pH intestinal por la producción de ácidos grasos de cadena corta y es lo que se asocia a la disminución del colesterol en sangre; esta fibra disminuye,

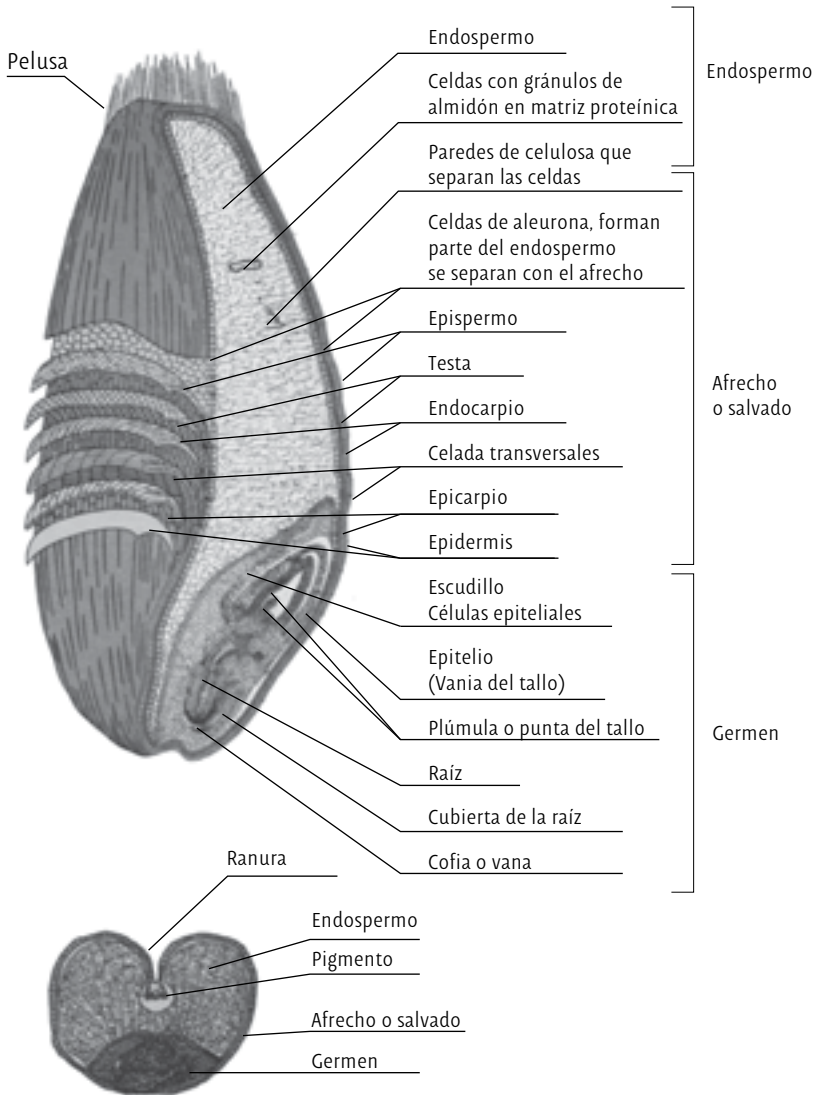


Figura 9.1

Estructura de un grano de trigo

CANIMOLT, 2005.

además, la disponibilidad de los minerales y ayuda a reducir la absorción de glucosa, lo que beneficia a los diabéticos (Serna-Saldívar, 2009). La fibra dietética soluble está formada por β -glucanos y pentosanos que, principalmente, se encuentran en las paredes celulares. Alteran el tránsito intestinal y la absorción de nutrientes, activando los movimientos peristálticos que previenen o combaten la constipación (Wang *et al.*, 2002; Philippe *et al.*, 2006).

El almidón es el hidrato de carbono más importante en todos los cereales, ya que la energía es almacenada de esta forma (Kent, 1987). El alto contenido de almidón en el trigo y en los cereales en general, hace que sean considerados fuente de energía en la dieta, además, es totalmente digerible en el sistema digestivo (Ao y Jane, 2007; Badui, 2013).

Las proteínas que acompañan al almidón tienen una buena tasa de digestibilidad, sin embargo, dado su bajo porcentaje (8 al 16%) y a la ausencia de los aminoácidos esenciales lisina, triptófano y treonina, se considera al trigo de calidad proteica baja para las primeras etapas de vida del humano. La cantidad de proteínas en el grano depende de las condiciones ambientales y de su genotipo, el mayor porcentaje está en el germen y la capa de aleurona (Wardlaw y Wrigley, 1994; Daniel y Triboi, 2000; Mikhaylenko *et al.*, 2000; Serna-Saldívar, 2009). Las proteínas pueden dividirse en dos grupos: las proteínas del gluten o de almacenamiento y las proteínas que no forman gluten, englobando a la mayoría de las enzimas. Las albúminas y globulinas se encuentran en el germen, el salvado y la aleurona, y en menor proporción en el endospermo, conteniendo un buen balance de aminoácidos. Las prolaminas y gluteninas se encuentran en el endospermo, distinguiéndose por sus altas concentraciones de glutamina y prolina (Dupont y Altenbach, 2003; Gómez-Pallarés *et al.*, 2007).

Las proteínas son las que otorgan principalmente la capacidad de esponjamiento de la harina de trigo, además del almidón y los lípidos. Las glutelinas y gliadinas forman el gluten que, junto con los lípidos y el agua, son responsables de las propiedades de viscoelasticidad y cohesividad de la masa panadera. El gluten, por su alto contenido en prolina (14% del total de aminoácidos) no posee una conformación helicoidal, favoreciendo que los grupos amida de la glutamina (37%

del total de aminoácidos) formen puentes de hidrógeno intra e intermoleculares; sumado a esto, el gluten también es rico en cisteína que permite la formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares, los cuales se forman durante el amasado. Las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas ayudan a que los polímeros se orienten longitudinalmente originando una red elástica y cohesiva para la formación del esponjado producido por la generación de CO₂, producto de la fermentación (Wieser, 2007; Kamal *et al.*, 2009; Badui, 2013).

Las enzimas, además del gluten, sobresalen por su importancia funcional. Las principales enzimas hidrolíticas que actúan sobre los hidratos de carbono son α - y β -amilasas, celulasas, enzimas desramificantes, β -gluconasas y glucosidasas. El trigo también contiene enzimas proteolíticas (endo y exopeptidasas), lipasas, estererasas, fosfatasas, fitasas y lipooxigenasas. Así también, se encuentran presentes varios tipos de lípidos como ácidos grasos, glicéridos simples, galactoglicéridos, fosfoglicéridos, esteroides, esfingolípidos, carotenoides, dioles, tocoferoles e hidrocarburos. De ácidos grasos saturados se encuentran presentes del 11 al 26% y de no saturados del 72 al 85% del total de lípidos (Gómez-Pallarés *et al.*, 2007). A pesar de que, durante la molienda muchos de los nutrientes se pierden, el trigo es considerado fuente importante de algunas vitaminas y minerales que se encuentran en el germen, pericarpio y la aleurona (Liu Wang *et al.*, 2006; Serna-Saldívar, 2009; Zhao *et al.*, 2009). Debido a esta pérdida, las harinas deben ser adicionadas con hierro y vitaminas del complejo B, siendo ésta una actividad regulada por ley (Jones, 2006; Gómez-Pallarés *et al.*, 2007; Rosell, 2003; 2004; 2007; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2007).

9.1.3 Tratamiento poscosecha y almacenamiento

El trigo debe pasar por varias etapas desde su cosecha hasta llegar a ser consumido. Esta serie o cadena de pasos se conocen como tratamientos poscosecha y consisten principalmente en tres bloques (Dendy y Dobraszczyk, 2004):

1. Desde la cosecha hasta el almacenado: contempla todas las acciones que permiten extraer y estabilizar el grano.
2. Procesado preliminar: acciones que permiten la obtención de productos intermedios (harinas).
3. Procesado secundario: acciones que transforman los productos intermedios en finales (elaboración de pan y muchos otros).

La cosecha consiste en la recolección de la planta completa. Por ello, es necesario después separar el grano de trigo del resto de sus partes y esto se lleva a cabo en dos operaciones: la trilla y el aventado. Actualmente, hay trilladoras mecánicas que realizan ambos procesos al mismo tiempo. También existen cosechadoras modernas que son capaces de realizar todas las operaciones de cosecha, trilla y aventado al mismo tiempo e incluso la de ensacar la paja (Dendy y Dobraszcyk, 2004).

Una vez que el trigo fue trillado y aventado, el grano debe ser almacenado. El principal factor que debe controlarse en el almacenamiento es el porcentaje de humedad del grano, el cual debe estar entre 11 y 14%, para evitar el crecimiento de hongos y la germinación del grano; por este motivo se debe efectuar el secado del mismo (Serna-Saldívar, 2009). El secado del grano se realiza de diferentes formas que pueden ser simples o sofisticadas, tales como exposición al sol o uso de equipos de cierta complejidad (Dendy y Dobraszcyk, 2004). Hay que tratar de evitar el secado por calentamiento ya que las proteínas pueden alterarse y, por consiguiente, obtener una harina de baja calidad (Kent, 1987; Gaines *et al.*, 1996; Crowley *et al.*, 2002).

Además de controlar la humedad, es importante el control de las plagas con agentes químicos o biológicos. Se calcula que en América Latina las pérdidas durante el almacenamiento varían del 25 al 50%, debido a problemas climáticos que dificultan la reducción de la humedad del grano y el control de las plagas (Evans, 2001; Serna-Saldívar, 2009).

Otros factores a tener en cuenta durante el almacenamiento son la atmósfera y temperatura dentro del almacén. Para almacenar granos, existen varias formas, diseños y tipos de almacenes. En general,

pueden clasificarse en bodegas al aire libre, silos y elevadores. En el almacén al aire libre, el grano es acumulado en un piso y expuesto a la intemperie, suele tener forma de loma para minimizar los daños por lluvias (Evans, 2001). Se acostumbra protegerlo en las épocas de lluvias con plástico. Por otra parte, los silos son depósitos de formas hexagonal, rectangular o circular con diámetros de dos a diez metros, contruidos con cemento, metal o asbesto y su capacidad suele ser para almacenar de 50 a 1000 toneladas de grano. Los elevadores son los almacenes más conocidos y se usan para el almacenamiento a granel. Consisten en estructuras destinadas a soportar los volúmenes de granos con sistemas de carga y descarga mecanizados. La capacidad de éstos suele variar entre 5 000 y 30 000 toneladas (Owens, 2001; Serna-Saldívar, 2009).

9.2 MICROORGANISMOS QUE ATACAN AL TRIGO

Los hongos afectan a los granos de trigo, tanto en el campo como durante su almacenamiento. El género que principalmente ataca al grano de trigo en campo es el *Fusarium*, mientras que en almacén es atacado principalmente por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Las principales micotoxinas que producen algunas especies de estos hongos son las aflatoxinas, las cuales son sustancias que causan graves enfermedades en humanos y animales, son potentes agentes cancerígenos y mutagénicos. Un estudio reciente ha reportado la identificación del sitio en el que las aflatoxinas parecen causar una mutación en el ADN de los humanos, encontrando también que estas toxinas pueden desencadenar problemas en el sistema inmune del hígado (Trucksess, 2012).

9.2.1 *Fusarium*

Los hongos del género *Fusarium*, considerados mayoritariamente como hongos de campo, contaminan al grano durante su desarrollo y maduración, requiriendo para su crecimiento óptimo una humedad del grano entre 20 y 25% (Stenglein, 2009). Este género de hongos se presenta generalmente en trigo y otros cereales como maíz, sorgo y avena (Eifler *et al.*, 2011). Es importante desde el punto de vista fitosanitario ya que producen muchas enfermedades a las plantas, acarreando importantes consecuencias económicas, llegando a reducir la producción hasta en un 40% (Bottalico y Perrone, 2002). Una enfermedad muy extendida a nivel mundial es la fusariosis de la espiga, perjudicial para el trigo y otros cereales, ya que disminuye el rendimiento y la calidad del grano (Liddell, 2003; Tančinová *et al.*, 2009).

Las especies de *Fusarium* son patógenas, especialmente perjudiciales debido a sus metabolitos secundarios o toxinas que se extienden a los productos alimenticios, convirtiéndose así en un riesgo para la salud de los animales y humanos (Eifler *et al.*, 2011). Algunas especies de este género producen toxinas como tricotecenos, zearalenona y fumonisina (Kimura *et al.*, 2007; Yli-Mattila, 2010). Reddy *et al.* (2010), sostiene que las fumonisinas pueden causar enfermedades en humanos y animales si consumen alimentos contaminados. El deoxinivalenol, conocido como DON, es la toxina más importante y pertenece a los tricotecenos tipo B (JECFA, 2010). Este metabolito ya presentó micotoxicosis en humanos y animales de granja, lo que provocó que en muchos países se establecieran límites para su presencia (FAO, 2004). Es producido, generalmente, antes de la cosecha por *F. graminearum* (Magan *et al.*, 2004). Por otra parte, en Asia se detectó otro tricoteceno del tipo B llamado nivalenol (NIV); aunque no existe regulación para el NIV, algunos estudios han determinado que el DON y el NIV tienen toxicidades similares (Eriksen *et al.*, 2004), mientras que otros han determinado que el NIV tiene una mayor toxicidad (Takahashi *et al.*, 2008). Otra micotoxina denominada zearalenona (ZEA), es producida generalmente después de la cosecha por *F. poae* mientras que las toxinas T-2 y HT-2 son producidas por *F. langsethiae* (Magan *et al.*, 2004).

9.2.2 *Aspergillus*

Las especies de *Aspergillus* requieren una humedad del grano entre 15 y 20%, así como condiciones ambientales de 25°C y humedad relativa de 70%. Éstos son responsables del deterioro de los alimentos y los piensos (Abarc *et al.*, 1994) y también son productoras de varias toxinas. Los metabolitos secundarios que producen son las aflatoxinas y ocratoxina A (OTA), siendo las especies productoras: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. ochraceus* (Fente *et al.*, 2001). El nombre aflatoxina proviene de *Aspergillus flavus*, por el hecho de que fueron reconocidas por primera vez en los cacahuates contaminados con esta especie (Trucksess, 2012); son potentes carcinógenos para los animales y los seres humanos (Dvorackova, 1990).

Las aflatoxinas se dividen en varias clases: B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁, siendo las principales las aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Serna-Saldívar, 2009). La aflatoxina M₁ (AFM₁) es producida por los mamíferos después del consumo de alimentos contaminados con aflatoxina B₁ (Trucksess, 2012). Por otra parte, la OTA produce efectos nefrotóxicos, inmunotóxicos, teratogénicos y cancerígenos (Höhler, 1998). Las aflatoxinas más comunes presentes en trigo son B₁ y B₂ provenientes de *A. flavus*, el cual requiere para su crecimiento una humedad relativa alta (85%) o un alto contenido de humedad en el grano (18.3 a 18.5%). Mientras se encuentra en crecimiento, *A. flavus* crea focos de calentamiento de hasta 55°C. *A. candidus* también produce focos de calentamiento, sin embargo, esta especie no produce toxinas aunque suele dañar y decolorar el germen ocasionando pudrición (Serna-Saldívar, 2009).

A. glaucus es la especie que se encuentra comúnmente en el trigo durante su almacenamiento; se caracteriza por crecer en granos con bajo contenido de humedad (14 a 15%) y por resistir temperaturas frías (25°C). Este hongo es el responsable de dañar y decolorar el germen del grano y no se le conocen efectos toxicológicos (Serna-Saldívar, 2009).

9.2.3 *Penicillium*

Los hongos del género *Penicillium* son saprófitos y suelen crecer en sustratos variados. Estos hongos matan y decoloran el germen; resisten bajas temperaturas y producen toxinas como citreoviridin, producida por *P. toxicarium*. A esta toxina se le asocian los síntomas del beri-beri cardíaco (Serna-Saldívar, 2009). Aunque la OTA fue aislada por primera vez de *Aspergillus ochraceus* en África del Sur, ha sido encontrada también en cereales infectados con *P. verrucosum* (Adams y Moss, 1997). La OTA se presenta en la etapa de la poscosecha en los climas frescos y húmedos del norte de Europa (Magan *et al.*, 2004). El secado del grano de trigo antes del almacenamiento es de suma importancia para evitar que *P. verrucosum* llegue a establecerse, ya que es una especie muy competitiva y puede llegar a dominar el grano almacenado cuando tiene las condiciones ambientales apropiadas (Magan *et al.*, 2003). Algunas publicaciones sugieren que la presencia de *P. verrucosum* es un síntoma de la presencia de la OTA (Ramakrishna *et al.*, 1996; Lund y Frisvad, 2003; Lindblat *et al.*, 2004); por ejemplo Lund y Frisvad (2003) encontraron que más del 70% de las muestras de granos contaminadas por este microorganismo presentaban OTA. Los factores abióticos más importantes que influyen en el crecimiento de la OTA son la temperatura, humedad relativa del ambiente alta, cuando el grano está húmedo y la composición del gas (relación de CO₂ y O₂) (Magan *et al.*, 2004; Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

9.3 PESTICIDAS SINTÉTICOS USADOS EN TRIGO

Como solución a los problemas que se presentan, la agricultura moderna depende mucho del uso de agroquímicos para obtener buenos rendimientos en los campos de cultivo. No solamente con el uso de fertilizantes, que tratan de recuperar los nutrientes del suelo en zonas de cultivos intensivos, sino también con la aplicación de pesticidas que buscan proteger los cultivos, tanto aquellos que están en campo como

los almacenados, del ataque de plagas. Estas plagas pueden ser de cualquier índole, desde mamíferos pequeños hasta aves y microorganismos.

El término pesticida se define como una sustancia química, agente biológico, antimicrobiano o desinfectante utilizado contra plagas que incluyen a insectos, plantas patógenas, malezas, moluscos, pájaros, mamíferos, pescados, nemátodos y microbios que compiten con los humanos por comida, destruyen propiedades, tienden a esparcirse, son vectores de enfermedades o simplemente una molestia (Erdman, 2004).

Así, por ejemplo, una aplicación de los fungicidas tebuconazol, epoxiconazol, bromuconazol o procloraz al grano de trigo duro, al inicio de la etapa de floración, controla la incidencia y severidad de la fusariosis de la espiga. Otro ejemplo puede ser controlar la producción de toxinas atacando al organismo productor como es el caso del trico-teceno DON que, al aplicar tebuconazol, bromuconazol o procloraz lo reducen de 43 a 96% (Menniti *et al.*, 2003).

El ser humano, con el afán de proteger su producción agrícola, ha hecho uso y abuso de los pesticidas. Esto ha ocasionado que las plagas adquieran rápidamente resistencia a los plaguicidas utilizados lo que, a su vez, origina que se aumente la dosis de aplicación hasta el punto de hacer ineficiente dicho pesticida y tener la necesidad de buscar otro más potente. En la actualidad, se utilizan pesticidas muy potentes que no sólo arrasan con la plaga sino con muchos otros organismos benéficos, ocasionando desequilibrios en el ecosistema al interferir en la cadena trófica. Otra particularidad de estos pesticidas es su persistencia y toxicidad, lo que origina complicaciones no sólo en la zona de cultivo sino también a varios kilómetros de distancia, ya que la sustancia puede atravesar el suelo, alcanzar las napas freáticas y ser transportada por ésta a lugares distantes contaminando lagos y mares. Más aún, la contaminación con estas sustancias puede llegar hasta los alimentos que consume el ser humano, sean éstos naturales o procesados.

En este sentido, se han reportado estudios donde se vinculan diferentes pesticidas no organoclorados como causa de problemas reproductivos tales como bajo peso al nacer, baja circunferencia craneana, hipospadias, defectos en el tubo neural y hernia congénita del diafragma. Asimismo, pesticidas en general pueden afectar conside-

rablemente el neurodesarrollo del niño desde su nacimiento hasta la adolescencia; la exposición de la madre a pesticidas organofosforados, organoclorados y carbamatos durante el embarazo, está asociada con una amplia gama de enfermedades respiratorias, incluida el asma (Sanborn *et al.*, 2012).

Según la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST, 2004) existen diferentes formas de clasificar un pesticida: según su concentración, en técnico y formulado; según el organismo que controla, en insecticida, acaricida, fungicida, bactericida, antibiótico, herbicida, rodenticida y molusquicida; según el modo de acción, en sistémico, de contacto, de ingestión, fumigante, repelente y defoliante; según su composición química, en inorgánicos, orgánicos (incluidos los botánicos) y biológicos. Por último, pueden clasificarse según el uso al que se destinan, en agrícolas, forestales, urbanos, para jardinería, pecuarios, domésticos e industriales. Las clasificaciones más utilizadas son: según el organismo al que controlan y según su composición química.

Entre los parámetros a evaluar de un plaguicida se encuentra su toxicidad aguda, la cual se divide en cinco categorías según la Norma Oficial Mexicana (NOM-232-SSA1-2009, 2009) como se ve en la tabla 9.1.

Asimismo, otro parámetro a tener en cuenta es la persistencia en el ambiente, habiendo cinco categorías: ligeramente persistentes (menos de cuatro semanas), poco persistentes (de 4 a 26 semanas), moderadamente persistentes (de 27 a 52 semanas), altamente persistentes (de 1 a menos de 20 años) y permanentes (más de 20 años) (CICOPLAFEST, 2004).

Tabla 9.1 Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su categoría de toxicidad*

Plaguicidas	Categorías	Vía oral (DL ₅₀)	Vía cutánea (DL ₅₀)
Extremadamente tóxicos	I	Hasta 5 ppm	Hasta 50 ppm
Altamente tóxicos	II	>5-50 ppm	>50 a 200 ppm
Moderadamente tóxicos	III	>50-300 ppm	>200 a 1000 ppm
Ligeramente tóxicos	IV	>300-2000 ppm	>1000 a 2000 ppm
Baja toxicidad	V	>2000-5000 ppm	>2000 a 5000 ppm

*Adaptada de NOM-232-SSA1-2009

Para completar la información de un plaguicida, además de indicar cómo afecta al ser humano y cuáles son las medidas a tomar en caso de intoxicación, se debe evaluar su impacto en el medio ambiente, es decir, si se bioacumula o biomagnifica a lo largo de la cadena trófica, si afecta otras formas de vida como peces y demás organismos acuáticos, a la vida silvestre y a las abejas y otros insectos polinizadores. En las Tablas 9.2, 9.3 y 9.4, se resumen las características principales de los plaguicidas utilizados en trigo, tanto en campo como en almacenamiento, las cuales se encuentran divididas de acuerdo a sus categorías de toxicidad. Salvo que se indique lo contrario, los datos fueron tomados del Catálogo de Plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004).

De las tablas antes mencionadas puede verse que, de los plaguicidas utilizados normalmente en trigo, los más tóxicos son algunos insecticidas, nematicidas y acaricidas, que se encuentran en las categorías de toxicidad I y II de los cuales, el Aldicarb es un plaguicida de uso restringido en México de acuerdo al Catálogo Oficial de Plaguicidas (1991). Muchos insecticidas no sólo son perjudiciales para la salud humana, sino también para insectos benéficos, aves y organismos acuáticos, donde algunos se bioacumulan y biomagnifican siendo, por esto, muy peligrosos para los seres humanos de una manera indirecta.

En cuanto a los fungicidas, si bien se encuentran en las categorías de toxicidad III y IV, no significa que sean inofensivos para la salud humana, como se ve en la columna de efectos sobre la salud, ya que pueden atacar al sistema nervioso central, ocasionar problemas sanguíneos e incluso podrían tener efectos carcinogénicos. Además, sus efectos sobre el ambiente son indeseados, al atacar a la fauna acuática, aves e insectos benéficos como las abejas; algunos presentan bioacumulación en peces, lo que podría ser altamente peligroso para los humanos si ingirieran estos peces con altas concentraciones de fungicida en su organismo. Por otra parte, la persistencia es otro factor importante, ya que son de poco a moderadamente persistentes, lo que significaría una permanencia de un mes a un año en el grano de trigo; esto implica una gran responsabilidad de los productores y comercializadores de observar este tiempo antes de poner a la venta sus productos, para no exponer al consumidor a estas sustancias.

Tabla 9.2 Clasificación y características sobresalientes de plaguicidas extremadamente tóxicos (categoría I) y altamente tóxicos (categoría II) utilizados en el trigo

Plaguicida	Clasificación según organismo blanco	Clasificación química	Lim. máx. residual	Efecto sobre la salud	Efecto sobre el ambiente
Aldicarb (Categoría I)	Insecticida nematocida	Carbamato	0.02	Debilidad, visión borrosa, dolor de cabeza, lagrimeo, sudoración, síndrome colinérgico, provoca la muerte por paro respiratorio. Altamente tóxico por vía oral y dérmica.	Poco persistente. Altamente tóxico para aves y abejas.
Disulfotón (Categoría I)	Insecticida acaricida	Organofosforato	0.2	Irritante dérmico, ocular y de mucosas, se absorbe rápidamente por la piel. Inhibición de la colinesterasa.	Poco persistente. Altamente tóxico a organismos acuáticos. Tóxico para abejas, aves y demás vida silvestre.
Fipronil (Categoría II)	Insecticida	Organoclorado (Fenilpirazol)	0.002	Irritante de la piel y ojos	Moderadamente persistente. Tóxico para abejas, peces e invertebrados acuáticos.
Lindano (Categoría II)	Insecticida acaricida	Organoclorado	0.01	Irritante dérmico, ocular y de mucosas. Afecta al SNC, hígado, riñón, páncreas, corazón, testículos, y posible carcinógeno.	Altamente persistente, puede ser lixiviado hasta las aguas subterráneas, puede almacenarse en las raíces de las plantas. Se bioacumula y biomagnifica.
Oxidemetón-Metilo (Categoría II)	Insecticida acaricida	Organofosforato	0.02	Neurotóxico, inhibidor de la colinesterasa. Irritante dérmico y ocular.	Ligeramente persistente. Tóxico para abejas y moderadamente tóxico para aves y peces
Metiocarb (Categoría II)	Insecticida	Carbamato	0.05	Tembolor, mareo, náuseas, salivación, sudoración, convulsiones.	Se hidroliza fácilmente en suelo. Tóxico para aves, organismos acuáticos y abejas.
Metomilo (Categoría II)	Insecticida	Carbamato	2	Inhibidor de la colinesterasa. Irritante ocular severo.	Persistencia moderada. Altamente tóxico para aves, mamíferos y organismo acuáticos.

CICOPLAFEST, 2004.

Tabla 9.3 Clasificación y características sobresalientes de plaguicidas moderadamente tóxicos (categoría III) utilizados en el trigo

Plaguicida	Clasificación según organismo blanco	Clasificación química	Lim. máx. residual	Efecto sobre la salud	Efecto sobre el ambiente
Imazalil	Fungicida	Organoclorado (imidazol)	0.01	Mala coordinación, reducción presión arterial, temblores, vómitos, irritación piel y ojos	Moderadamente persistente. Tóxico para peces
Clordano	Insecticida	Organoclorado	0.02	Convulsiones, náuseas, vómito, agitación, cansancio, confusión, dolor de cabeza, problemas de visión, irritación dérmica y ocular	Altamente persistente (décadas). Contamina sitios lejanos. Se bioacmula y biomagnifica. Muy tóxico para organismos silvestres y moderadamente tóxico para aves y peces
Propiconazol	Fungicida	Organoclorado (Triazol)	0.02	Irritante dérmico, ocular y del tracto digestivo	Ligeramente persistente. Tóxico para peces
Dimetoato	Insecticida	Organofosforato	0.05	Irritante ocular, náuseas, inhibe la colinesterasa, salivación, mareos, fallo respiratorio, eventualmente muerte	Poco persistente. De moderado a altamente tóxico para organismo acuáticos y aves. Muy tóxico para abejas
Cyhalotrina	Insecticida	Piretroide	0.05	Irritante para piel y ojos. Efectos sobre el SNC	Poco persistente. Muy tóxico para peces y abejas. Poco tóxico para aves
Tiacloprid	Insecticida acaricida	Organoclorado (Cianamida)	0.1	Irritante ocular y dérmico, efectos sobre el SNC, temblor, disnea	Ligeramente persistente. Tóxico para peces
Bioresmetrina	Insecticida	Piretroide	1	Irrita ojos y piel. Efectos sobre el SNC, mareos, convulsiones, ataxia, edema pulmonar, excitación, temblores	Ligeramente persistente. Tóxico para abejas y peces

Tabla 9.3 (Continuación)

Plaguicida	Clasificación según organismo blanco	Clasificación química	Lim. máx. residual	Efecto sobre la salud	Efecto sobre el ambiente
Carbaryl	Insecticida Acaricida	Carbamato	2	Quemaduras a piel y ojos. Tóxico para el sistema nervioso y aparato respiratorio, produce náuseas, salivación, sudoración, visión borrosa y convulsiones. Posibles efectos teratogénicos	Ligeramente persistente. Letal para abejas y otros insectos beneficios, muy tóxico para peces e invertebrados acuáticos
Cipermetrina	Insecticida acaricida	Piretroide	2	Irritante ocular, dérmico y del tracto respiratorio. Efectos sobre el SNC con manifestaciones de ardor, escozor y comezón en la cara. Hepatotóxico y posible carcinógeno	Ligeramente persistente. Muy tóxico a organismos acuáticos y abejas
2,4-D	Herbicida	Organoclorado (Clorofenoxi)	2	Irritante dérmico, somnolencia, tos, mareo, convulsiones, coma, daño hepático y renal, polineuritis, efectos sobre el SNC. Mala coordinación, pérdida de reflejos, náuseas, vómito, incontinencia. Posibles efectos reproductivos y teratogénicos.	Poco persistente. Tóxico para organismos acuáticos y terrestres. Altera el ecosistema terrestre
Diquat	Herbicida	Bipiridilo	2	Muy irritante de ojos y piel. Daño en hígado, cerebro y pulmón. Provoca cataratas. Posibles efectos teratogénicos.	Altamente persistente. Tóxico para aves y organismo acuáticos

CICOPIAFEST, 2004.

Tabla 9.4 Clasificación y características sobresalientes de plaguicidas ligeramente tóxicos (categoría IV) utilizados en el trigo

Plaguicida	Clasificación según organismo blanco	Clasificación química	Lím. máx. residual	Efecto sobre la salud	Efecto sobre el ambiente
Quintoceno	Fungicida	Organoclorado (Clorobenceno)	0.01	Irritación piel y ojos, fatiga, mareos, letargia, pérdida del conocimiento, anoxia, efectos hemáticos y hepáticos	
Clotianidín	Insecticida	Organoclorado (Nitroguanidina)	0.02	No se encontraron efectos	Moderadamente persistente. Altamente bioacumulable en organismos acuáticos. Altamente tóxico para peces
Difenocnazol	Fungicida	Organoclorado (Triazol)	0.02	Irritante para ojos y piel. Peligroso si se ingiere**	Tóxico para abejas***
Kresoxim-Metilo	Fungicida	Estrobilurina	0.05	Irritación de la mucosa y piel. Posible efecto carcinogénico* Irritante ocular, dérmico y de mucosas	Poco persistente. Tóxico para organismos acuáticos. Ligeramente tóxico para aves y abejas
Carbendazim	Fungicida	Benzimidazol	0.05	Irritante ocular, dérmico y de mucosas	Poco persistente. Tóxico para organismos acuáticos
Tiametoxam	Insecticida	Organoclorado	0.05	Irritante para ojos	
Bitertanol	Fungicida	Triazol	0.05	Hiperactividad seguida de sedación	Poco persistente. Tóxico para peces
Famoxadona	Fungicida	Oxazolidinediona	0.1	Irritante dérmico, ocular y de las vías respiratorias superiores	Tóxico para organismos acuáticos
Fenbuconazol	Fungicida	Organoclorado (Triazol)	0.1	Irrita piel y ojos, produce ataxia, pasividad, lagrimeo, salivación, efectos sobre el aparato respiratorio y gastrointestinal	Altamente tóxico para peces y aves

Tabla 9.4 (Continuación)

Plaguicida	Clasificación según organismo blanco	Clasificación química	Lim. máx. residual	Efecto sobre la salud	Efecto sobre el ambiente
Bentazona	Herbicida	Tiadiazina	0.1	Aumenta el tiempo de coagulación sanguínea, irrita piel, tracto respiratorio y ojos	Poco persistente. Ligeramente tóxico para aves y mamíferos
Tebuconazol	Fungicida	Organoclorado (Benzimidazol)	0.15	Irrita piel y mucosa, hiperactividad seguida de sedación, ataxia	Poco persistente. Poco tóxico para aves, abejas y peces
Trifloxistrobin	Fungicida	Estrobulurina	0.2	Irrita piel y ojos. Alergia a personas sensibles	Tóxico a peces e invertebrados acuáticos
Dicamba	Herbicida	Organoclorado (Sal del ácido benzoico)	2	Irritante dérmico y corrosivo ocular con daño permanente	Poco persistente
Clorpirifos-Metilo	Insecticida	Organofosforato	10	Irritante ocular, efectos colinérgicos y del SNC. Neurotóxico	Ligeramente persistente. Tóxico para peces y crustáceos, y muy tóxico para abejas
Malation	Insecticida	Organofosforato	10	Irrita la piel, mucosas y tracto respiratorio. Produce contracción de la pupila, dolor de cabeza, escalofríos, vista borrosa, hiperirritabilidad, hipersensibilidad, pérdida del control de esfínteres, náuseas, mareos, vómito, edema pulmonar, ataxia, pérdida del conocimiento, convulsiones. Inhibición de la colinesterasa plasmática y cerebral. Daño hepático	Ligeramente persistente. La toxicidad en peces depende de la especie. Muy tóxico para abejas y aves

CICOPIAFEST, 2004; TOXNET, 2014; Chemical Book, 2014; Di Prisco *et al.*, 2013.

CONCLUSIONES

El trigo es de los cereales más cultivados alrededor del mundo y el que da origen a más productos derivados. En la producción de éste, lo que más preocupa es la infección por hongos, los cuales se combaten principalmente con pesticidas sintéticos, antes y durante el almacenamiento. Esto provoca numerosos problemas a la salud humana, desde enfermedades crónicas neurológicas, alteraciones hormonales hasta la muerte; además, en el medio ambiente intervienen en la cadena trófica de diferentes ecosistemas.

Como parte de las tendencias actuales para una alimentación más saludable, la protección de los cultivos y sus productos juega un papel muy importante, por ello, está tomando impulso el uso de productos naturales, los cuales han mostrado tener una amplia gama de actividades biológicas que pueden utilizarse efectivamente en la agricultura.

REFERENCIAS

- Abarc, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G. y Cabanes, F. J. (1994). «Mycoflora and aflatoxin producing strains in animal mixed feeds». *Journal of Food Protection*, 57, 256-258.
- Adams, M. R. y Moss, M. O. (1997). *Microbiología de los alimentos*. España: Editorial Acribia, S.A.
- Altenbach, S. B., DuPont, F. M., Kothari, K. M., Chan, R., Johnson, E. L. y Lieu, D. (2003). «Temperature, water and fertilizer influence the timing of key events during grain development in US Spring Wheat». *Journal of Cereal Science*, 37, 9-20.
- Ao, Z. y Jane, J. L. (2007). «Characterization and modeling of the A and B granule starches of wheat, triticale, and barley». *Carbohydrate Polymers*, 67, 46-55.
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos* (5a. ed). México: Pearson.
- Bottalico, A. y Perrone, G. (2002). «Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small grains cereals in Europe». *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611-624.

- Cairns-Fuller, V., Aldred, D. y Magan, N. (2005). «Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain». *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1215-1221.
- Campbell, G. M., Fang, C. y Muhamad, I. I. (2007). «On predicting roller milling performance VI - Effect of kernel hardness and shape on the particle size distribution from first break milling of wheat». *Food and Bioproducts Processing*, 85, 7-23.
- CANIMOLT. Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo. (2005). *Estructura del grano*. En línea. Obtenido el 30 de enero de 2014 desde: <http://www.canimolt.org/trigo/estructura-del-grano>.
- Catálogo Oficial de Plaguicidas. (1991). *Diario Oficial de la Federación*. En línea. Obtenido el 30 de enero de 2014 desde: <http://uninet.mty.itesm.mx/legis-demo/cico/cata001.txt>
- Chang, C., Zhang, H., Xu, J., Li, W., Liu, G., You, M. y Li, B. (2006). «Identification of allelic variations of puroindoline genes controlling grain hardness in wheat using a modified denaturing PAGE». *Euphytica*, 152, 225-234.
- Chemical Book. (2014). *CAS Data Base List*. En línea. Obtenido el 9 de febrero de 2014 desde: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4740447.htm
- CICOPLAFEST. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. (2004). *Catálogo de Plaguicidas*. México: S.S.; Sagarpa; SEMARNAT; SE.
- Collar, C. (2007). Cereales menores: Avena, sorgo, mijo. En A. E., Leó, y C. M., Rosell, *De tales harinas tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica (195-242)*. Córdoba, Argentina: Ediciones Báez.
- Crowley, P., Schober, T. J., Clarke, C. J. y Arendt, E. K. (2002). «The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread». *European Food Research Technology*, 214, 489-496.
- Daniel, C. y Triboi, E. (2000). «Effect of temperature and Nitrogen nutrition on the grain composition of winter wheat: effects on gliadin content and composition». *Journal of Cereal Science*, 32, 45-56.
- Dendy, D. A. V. y Dobraszczyk, B. J. (2004). *Cereales y productos derivados. Química y tecnología*. España: Acribia.

- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G. y Pennacchio, F. (2013). «Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 18466-18471.
- Dupont, F. M. y Altenbach, S. B. (2003). «Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis». *Journal of Cereal Science*, 38, 133-146.
- Dvorackova, I. (1990). *Aflatoxins and Human Health*. Inc. Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.
- Eifler, J., Martinelli, E., Santonico, M., Capuano, R. y Schild, D. (2011). Differential detection of potentially hazardous *Fusarium* species in wheat grains by an electronic nose. *PLoS ONE*, 6, e21026.
- Embaby, E. M., Ayaat-Nahed, M., Abd-El-Hamid, N. H., Abdel-Galil- Mona, M., Yaseen, A. A. y Younos-Marwa, A. (2012). «Detection of fungi and mycotoxin affected wheat quality». *Journal of Applied Sciences Research*, 8, 3382-3392.
- Erdman, A. R. (2004). Insecticides. En R. C., Dart, *Medical toxicology* (1475-1496). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Eriksen, G. S., Pettersson, H. y Lundh, T. (2004). «Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites». *Food and Chemical Toxicology*, 42, 619-624.
- Evans, E. J. (2001). Cereal production methods. En G., Owens, *Cereal processing technology* (7-26). Boca Ratón: CRC Press.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). «*Food and nutrition papers 81: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*». En línea. Obtenido el 7 de febrero de 2014 desde: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>
- Fente, C. A., Jaimez, O. J., Vizquez, B. I., Franco, C. M. y Cepeda, A. (2001). «A new additive for culture media for rapid determination of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains». *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4858-4862.
- Gaines, C. S., Finney, P. L. y Rubenthaler, G. (1996). «Milling and baking qualities of some wheat developed for Eastern or Northwestern regions or the United States and grown at both locations». *Cereal Chemistry*, 73, 521-525.

- Gómez-Pallarés, M., León, A. E. y Rosell, C. M. (2007). Trigo. En A. E., León y C. M., Rosell, *De tales harinas tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica (17-72)*. Córdoba, Argentina: Ediciones Báez.
- Höhler, D. (1998). «Ochratoxin A in food and feed: Occurrence, legislation and mode of action». *European Journal of Nutrition (Zeitschrift für Ernährungswissenschaft)*, 37, 2-12.
- JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2010). Summary and conclusions the seventy second meeting of Joint FAO/WHO Expert. (10-11). Committee on Food Additives (JECFA/72/SC). En línea. Obtenido el 10 de febrero de 2014 desde: http://www.who.int/food-safety/chem/summary72_rev.pdf
- Jones, J. M. (2006). «Grain-based foods and health». *Cereal Foods World*, 57, 108-113.
- Kamal, A. H. M., Kim, K. H., Shin, D. H., Seo, H. S., Shin, K. H., Park, C. S., Heo, H. Y. y Woo, S. H. (2009). «Proteomics profile of pre-harvest sprouting wheat by using MALDI-TOF Mass Spectrometry». *Plant Omics Journal*, 2, 110-119.
- Kent, N.L. (1987). *Tecnología de los cereales*. España: Acribia.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S. y Fujimura, M. (2007). «Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis pathways genes and evolution». *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 2105-2123.
- Liddell, C. M. (2003). Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. En K. J., Leonard y W. R., Bushnell, *Fusarium head blight of wheat and barley*(35-43). Saint Paul, Minnesota, United States of America: The American Phytopathological Society.
- Lindblat, M., Johnsson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R. y Olsen, M. (2004). «Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts». *Journal of Applied Microbiology*, 97, 609-616.
- Liu, Z. H., Wang, H. Y., Wang, X. E., Zhang, G. P., Chen, P. D. y Liu, D. J. (2006). «Genotypic and spike positional difference in grain phytase activity, phytate, inorganic phosphorus, iron, and zinc contents in wheat (*Triticum aestivum* L.)». *Journal of Cereal Science*, 44, 212-219.

- Liyana-Pathlrana, C. M. y Shahidi, F. (2007). «Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions». *Food Chemistry*, 101, 1151-1157.
- Lund, F. y Frisvad, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1117-1123.
- Mabile, F., Grill, J. y Abecassis, J. (2001). «Mechanical properties of wheat seed coats». *Cereal Chemistry*, 78, 231-235.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V. y Aldred, D. (2003). «Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain». *European Journal of Plant Pathology*, 109, 723-730.
- Magan, N., Sanchis, V. y Aldred, D. (2004). «Role of spoilage fungi in seed deterioration». En D. K., Aurora, *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications* (pp. 311-323). Nueva York: Marcell Dekker.
- Menniti, A. M., Pancaldi, D., Maccaferri, M. y Casalini, L. (2003). «Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain». *European Journal of Plant Pathology*, 109, 109-115.
- Mikhaylenko, G. G., Czuchajowska, L., Baik, B. K. y Kidwell, K. K. (2000). «Environmental influences on flour composition, dough rheology and baking quality of spring wheat». *Cereal Chemistry*, 77, 505-511.
- NOM-232-ssa1-2009. (2009). *Diario Oficial de la Federación*. En línea. Obtenido el 20 de enero de 2014 desde: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5139018&fecha=13/04/2010
- Owens, G. (2001). «Wheat, corn and coarse grains milling». En G., Owens, *Cereals processing technology* (27-52). Boca Ratón: CRC Press.
- Philippe S., Saulnie, L. y Guillon, F. (2006). «Arabinoxylan and (1/3), (1/4)-b-glucan deposition in cell walls during wheat endosperm development». *Planta*, 224, 449-461.
- Ramakrishna, N., Lacey, J. y Smith, J. E. (1996). «Colonisation of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi». *Journal of Food Protection*, 59, 1311-1317.
- Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A. y Shier, W. T. (2010). «An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health». *Toxin Reviews*, 29, 3-26.

- Ritchie, S., Swanson, S. J. y Gilroy, S. (2000). «Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology». *Seed Science Research*, 10, 193-212.
- Rosell, C. M. (2003). «The nutritional enhancement of wheat flour». En S., Cauvain, *Breadmaking: Improving quality* (pp. 253-269). Reino Unido: Woodhead Publishing.
- Rosell, C. M. (2004). «Fortification of grain based foods». En C., Wrigley, H., Corke y C., Walker, *Encyclopedia of grains science* (pp. 399-405). Reino Unido: Elsevier Science.
- Rosell, C. M. (2007). «Vitamin and mineral fortification of bread». En B., Hamaker, *Technology of Functional Cereal Products* (pp. 336-361). Reino Unido: Woodhead Publishing Limited Cambridge.
- Sanborn, M., Bassil, K., Vakil, C., Kerr, K. y Ragan, K. (2012). *Systematic review of pesticides health effects*. Ontario, Canadá: Ontario College of Family Physicians.
- Serna-Saldívar, S. R. O. (2009). *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. México: AGT Editor.
- Shewry, P. R. y Halford, N. G. (2002). «Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization». *Journal of Experimental Botany*, 53, 947-958.
- Stenglein, S. A. (2009). «*Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention». *Journal of Plant Pathology*, 91, 25-36.
- Takahashi, M., Shibutani, M., Sugita-Konishi, Y., Aihara, M., Inoue, K., Woo, G. H., Fujimoto, H. y Hirose, M. (2008). «A 90 day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats». *Food and Chemical Toxicology*, 46, 125-135.
- Takayama, T., Ishikawa, N. y Taya, S. (2006). «The effect to the protein concentration and flour quality of nitrogen fertilization at 10 days after heading in wheat». *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40, 291-297.
- Tančinová, D., Piovarčiová, Z., Dovičiová, M. y Felsociová, S. (2009). «Endogenous contamination of wheat grains harvested in Slovakia during the season 2007». *Acta fytotechnica et zootechnica*, 12, 639-651.

- TOXNET. Toxicology Data Network. United States National Library of Medicine. (2014). En línea. Obtenido el 9 de febrero 2014 desde: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@rn+143390-89-0>
- Trucksess, M. W. (2012). Aflatoxins. En FDA (Food and Drug Administration), *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins* (231-236). United States of America: FDA.
- Turnbull, K. M. y Rahman, S. (2002). «Endosperm texture in wheat». *Journal of Cereal Science*, 36, 327-337.
- Vicente, A., Arqués, F. A., Villalbi, J. R., Centrich, F., Serrahima, E., llebaria, X. y Casas, C. (2004). «Plaguicidas en la dieta, aportando piezas al rompecabezas». *Gaceta Sanitaria*, 18, 425-430.
- Wang, M., van Vliet, T. y Hamer, R. J. (2002). «Interaction of water extractable pentosanos with gluten protein: effect on dough properties and gluten quality». *Journal of Cereal Science*, 36, 25-37.
- Wardlaw, C. M. y Wrigley, C. M. (1994). «Heat tolerance in temperate cereals: An overview». *Australian Journal of Plant Physiology*, 21, 695-703.
- Webley, D. J. (1994). «Grain protectants and pesticide residues». En E. Highley, E. J. Wright, H. J. Banks y B. Champ (Eds.). *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored Product Protection* (pp. 857-862). Wallingford, UK: CAB International.
- Wieser, H. (2007). «Chemistry of gluten proteins». *Food Microbiology*, 24, 115-119.
- Yli-Mattila, T. (2010). «Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia». *Journal of Plant Pathology*, 92, 7-18.
- Zhao, F. J., Hawkesford, M. J. y McGrath, S. P. (1999). «Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat». *Journal of Cereal Science*, 30, 1-17.
- Zhao, F. J., Su, Y. H., Dunhama, S. J., Rakszegi, M., Bedo, Z., McGrath, S. P. y Shewry, P. R. (2009). «Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin». *Journal of Cereal Science*, 49, 290-295.



10

Envejecimiento del pan: causas y soluciones

M. Luna-Fernández y M. E. Bárcenas-Pozos

El pan de sal es un alimento que existe desde épocas muy antiguas y que, en la actualidad, sigue consumiéndose a diario en muchas partes del mundo. Sin embargo, es un producto que se deteriora en forma rápida, debido a que en él ocurren fenómenos que causan cambios de sabor, pérdida de aroma, pérdida de agua, endurecimiento de la miga y ablandamiento de la corteza. Todo esto provoca que el pan deje de ser aceptado por los consumidores tan sólo dos o tres días después de haber sido fabricado y que los excedentes de la producción sean desechados, con las consecuentes pérdidas económicas para los panaderos, distribuidores o consumidores.

El conjunto de cambios indeseables que sufre el pan después del horneado se conoce como «envejecimiento» y ha sido ampliamente estudiado desde hace varias décadas, con el propósito de comprenderlo y contrarrestarlo. Aunque las consecuencias del envejecimiento en la calidad del pan pueden detectarse con facilidad, sus causas son más complicadas, ya que involucran fenómenos fisicoquímicos complejos. Entre éstos, la retrogradación del almidón es reconocida como el principal responsable del endurecimiento del pan.

Un estudio llevado a cabo a principios de 1990 sobre la producción anual de pan en Estados Unidos, mostró que se producían aproximadamente 20 billones de libras de pan al año, de los cuales el 3% se desechaba debido al envejecimiento. Considerando que el precio del pan en el mercado era de dos dólares por libra, las pérdidas anuales debidas al deterioro del pan eran de 1.2 billones de dólares o más (Xie *et al.*, 2004).

Este artículo tiene el propósito de presentar, en forma resumida, los fenómenos de mayor importancia involucrados con el envejecimiento del pan, así como algunas de las técnicas más utilizadas para retardar o contrarrestar este problema.

10.1 CAUSAS DEL ENVEJECIMIENTO DEL PAN

Desde el momento en el que es retirado del horno, en el pan ocurren los fenómenos que dan lugar a los signos característicos de su envejecimiento. Entre éstos, los más importantes se describen a continuación.

10.1.1 Retrogradación del almidón

El compuesto más abundante en el pan es el almidón, ya que constituye alrededor del 55% del peso del pan recién horneado (Guinet y Godon, 1994). El almidón proviene de la harina de trigo que es el principal ingrediente de la formulación del pan.

En estado nativo, el almidón se encuentra en forma de gránulos ovoides agrupados en dos poblaciones: una de gránulos grandes de 25 a 35 μm de diámetro, y otra de gránulos pequeños de 2 a 10 μm . Cada gránulo está formado por capas concéntricas alternativamente cristalinas y amorfas. Estas capas se diferencian por la organización más o menos regular de las macromoléculas formadas por unidades de glucosa, constitutivas del almidón. En las zonas amorfas, las posiciones son irregulares; mientras que en las zonas cristalinas (que representan del 25 al 40% del gránulo) son muy regulares, a punto de formar agrupaciones de microcristales. Aunque, cada cadena macromolecular puede estar implicada en las zonas amorfas y cristalinas, fijando, por tanto, la estructura del almidón de forma rígida. Pruebas ópticas, térmicas y de rayos X, han revelado una estructura granular interna ordenada y parcialmente cristalina (Morris, 1990).

El almidón está formado por dos tipos de cadenas poliméricas de glucosa. Unas, que constituyen la amilosa, son largas cadenas flexibles, lineales, que asocian varios millares de moléculas de glucosa li-

gadas entre ellas para formar del 18 al 30% del almidón. Las otras, cadenas ramificadas, denominadas amilopectina, reúnen cerca de 100,000 unidades de glucosa, y constituyen del 70 al 80% del almidón. La amilopectina se presenta en forma arborescente y está constituida por una multitud de ramificaciones de 20 a 40 unidades de glucosa injertadas en una cadena más larga (Guinet y Godon, 1996). Las ramas agrupadas en paralelo de la amilopectina se encuentran plegadas como dobles hélices (Karaoglu, 2006).

Los gránulos de almidón son insolubles en agua. Pero cuando una suspensión acuosa de almidón es calentada a una temperatura superior a 55-60° C, los gránulos absorben agua, se hinchan, y pierden su estructura; además, la amilosa se solubiliza. Este fenómeno se conoce como gelatinización del almidón y da lugar a un sistema compuesto de gránulos hinchados y porosos (esqueletos de amilopectina), suspendidos en una solución caliente de amilosa (Morris, 1990).

Cuando la temperatura del almidón gelatinizado disminuye, se forma un gel progresivamente más rígido, que se retrae debido a que se elimina agua y a que las cadenas de amilosa y amilopectina se reorganizan bajo una forma cristalina mucho más generalizada que en el estado nativo del almidón. Esta reorganización se denomina retrogradación.

De acuerdo a los estudios de Miles *et al.* (1985), Ring *et al.* (1987), Clark (1990), y Gidley (1989), la retrogradación del almidón ocurre como dos procesos cinéticamente distintos: la rápida gelación de la amilosa a través de la formación de segmentos de cadena de doble hélice que es seguida por la agregación hélice-hélice, y la recristalización lenta de las cadenas de amilopectina. Mientras la amilosa parece dominar las etapas iniciales de la retrogradación, los principales cambios en rigidez y cristalinidad de los geles de almidón son generalmente atribuidos a la amilopectina.

Katz (1928) propuso que la retrogradación de los polímeros del almidón era responsable del envejecimiento del pan, debido a que sus patrones de difracción de rayos X de pan fresco eran similares a aquellos del almidón recién gelatinizado, mientras que los patrones del pan envejecido eran parecidos a los del almidón retrogradado.

Desde entonces se han realizado un gran número de estudios que han llevado a concluir que los procesos que colectivamente constituyen la retrogradación del almidón, son los principales causantes del endurecimiento de la miga de pan.

10.1.2 Pérdida y redistribución de agua

Si la humedad relativa del aire que rodea al pan recién retirado del horno es inferior a la actividad de agua del mismo, habrá una salida de agua del pan hacia el entorno, de lo contrario el pan ganará agua. Por otro lado, la miga del pan recién horneado tiene una actividad de agua superior a la de la corteza; esta diferencia provoca que el agua que se encuentra en el interior del pan se desplace a la superficie. Adicionalmente, la transferencia de humedad de un constituyente de la miga a otro es generalmente aceptada como un factor que contribuye al envejecimiento.

Las migraciones de agua que ocurren en el pan dan lugar a cambios en las características del producto. Los más notables son la resequedad de la miga y la pérdida de la naturaleza crujiente de la corteza. La redistribución y pérdida de agua en el pan y sus consecuencias han sido observadas y estudiadas desde hace algunas décadas por varios investigadores (Leung *et al.*, 1983; Rogers *et al.*, 1988; He y Hosenev, 1990).

Por ejemplo, se ha confirmado que existe una relación inversa entre el contenido de humedad y la velocidad de envejecimiento del pan. Sin embargo, se ha encontrado que la velocidad de retrogradación del almidón en el pan es directamente proporcional al contenido de humedad (Rogers *et al.*, 1988; He y Hosenev, 1990).

Asimismo, Schiraldi y Fessas (2001) enfocaron su revisión hacia el contenido de agua, actividad de agua, migración de agua entre fases, y estructura alveolar de la miga de pan. Ellos sugirieron que la migración de agua de la miga a la corteza da lugar a una deshidratación local, que hace las paredes de los alvéolos de la miga más rígidas y puede contribuir a un empaquetamiento cerrado de la estructura a través de la cual el agua se desplaza.

Por su parte, Baik y Chinachoti (2000) encontraron que el pan almacenado con su corteza llegó a ser significativamente más duro que el almacenado sin corteza y contuvo más amilopeptina recristalizada, indicando que la redistribución de humedad de la miga hacia la corteza juega un papel significativo en el endurecimiento.

Además, usando resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) se encontró que conforme el envejecimiento procede, el agua en el pan llega a ser menos móvil (Leung *et al.*, 1983).

Por otro lado, se han realizado una gran cantidad de investigaciones para determinar si el envejecimiento involucra la deshidratación del gluten o del almidón. La mayoría de las evidencias sugieren una transferencia de agua del gluten hacia el almidón, conforme el almidón se cristaliza. En diferentes estudios Willhoft y sus colaboradores (Breaden y Willhoft, 1971; Willhoft, 1971; Kay y Willhoft, 1972) reportaron que el gluten se transforma durante el almacenamiento del pan, dando lugar a la liberación de agua, la cual es absorbida por el almidón que se está retrogradando. Leung (1981) y Leung *et al.* (1983) propusieron que conforme el almidón cambia a un estado cristalino, más moléculas de agua son inmovilizadas debido a su incorporación a las estructuras cristalinas. El uso de NMR y un mayor entendimiento del mecanismo de cristalización de los polímeros del almidón han permitido confirmar lo anterior.

10.1.3 Interacciones gluten-almidón

Estudios realizados por diferentes investigadores (Longton y Legrys, 1981; Biliaderis y Zawistowski, 1990; Sahlström y Brathen, 1997) han demostrado que la retrogradación del almidón no siempre se correlaciona con la dureza del pan. Esto ha llevado a investigar el papel de compuestos distintos a los polisacáridos, que se encuentran en el pan, en el envejecimiento de este producto.

Uno de los trabajos más conocidos en relación con este tema es el de Martín *et al.* (1991), quienes sugirieron que la dureza del pan es el resultado de la formación de enlaces de hidrógeno entre los gránulos de almidón gelatinizado y la red de gluten en el pan, enlazándose juntos la

red de proteína continua y los gránulos remanentes discontinuos. Ellos propusieron que durante el horneado se forman enlaces cruzados (enlaces de hidrógeno) entre el almidón y el gluten; luego, durante el almacenamiento, tanto el número de interacciones como su fuerza se incrementan. En el recalentamiento, la frescura del pan se recupera debido a que los enlaces de hidrógeno y las madejas formadas entre las moléculas de los polímeros del almidón y el gluten, son rotos.

Contrario a lo anterior, varios investigadores han concluido que la dureza de la miga no está significativamente correlacionada con el tipo de proteínas de la harina o con su concentración (Ponte *et al.*, 1962; León *et al.*, 1997; Gerrard *et al.*, 2001). Every *et al.* (1998), sugirieron que, cualitativamente, las interacciones almidón-almidón y almidón-proteínas son de igual importancia para el envejecimiento del pan; pero cuantitativamente las interacciones almidón-almidón son más notables debido a que la harina de trigo convencional contiene 85% (bs) de almidón. Examinando pan libre de gluten, Morgan *et al.* (1997) sugirieron que la retrogradación del almidón por sí misma es suficiente para causar el endurecimiento del pan y que el gluten no es esencial para el proceso de endurecimiento.

10.1.4 Alteraciones en los compuestos responsables del sabor

El sabor del pan se deriva de los ingredientes y de las condiciones y métodos de procesamiento usados en su elaboración.

En cuanto a los ingredientes, la harina refinada tiende a mostrar un sabor bastante suave. Es la sal adicionada a la formulación del pan la principal modificadora del sabor, ya que además de impartir su sabor salado característico, funciona como potenciadora de otros sabores presentes en el pan. Por su parte, la levadura usada en la formulación también hace su propia y única contribución al sabor del pan.

Con respecto al procesamiento, durante la fermentación se generan nuevos productos de sabor en la masa, cuya intensidad y notas particulares cambian con el incremento en el tiempo de fermentación. Los cambios más comúnmente observados se asocian con el

desarrollo de sabores ácidos provenientes de la actividad microbiana en la masa, los cuales son fácilmente detectados en la miga. No toda esta actividad microbiana relacionada con el sabor viene de la levadura adicionada por el panadero; alguna proviene de levaduras y bacterias (especialmente bacterias ácido lácticas) salvajes, presentes en forma natural en la harina. Usualmente se requieren varias horas de fermentación antes de que hayan cambios significativos en el perfil de sabor de la miga de pan. En algunos procesos, el sabor puede mejorarse usando un prefermento o «esponja», el cual es posteriormente mezclado con el resto de los ingredientes para formar la masa para el proceso final (Cauvain, 2001).

El horneado es la etapa que más contribuye al sabor del pan, ya que durante éste, muchos de los compuestos presentes sufren cambios y otros se pierden y, paralelamente, se forman nuevos. Estos cambios están asociados con las reacciones de Maillard, también responsables del oscurecimiento de la corteza, las cuales producen compuestos de sabor intenso. A esto se debe que la percepción del sabor del pan por los consumidores esté fuertemente influenciada por la relación corteza/miga (Cauvain, 2001).

El pan recién horneado tiene un sabor agradable y característico, debido a la presencia de compuestos volátiles formados durante la fermentación y el horneado. Dichos compuestos son alcoholes, aldehídos, diacetilos, cetonas y ésteres, entre otros. Conforme el tiempo transcurre, el sabor del pan fresco es remplazado por el sabor típico del pan envejecido. Esto ocurre porque los volátiles se colocan en las hélices de amilosa, las cuales evitan que sean percibidos por el gusto, y porque se producen los compuestos de degradación responsables del sabor característico del pan viejo (Schiraldi y Fessas, 2001).

10.2 MÉTODOS PARA CONTRARRESTAR EL ENVEJECIMIENTO DEL PAN

La prolongación de la vida útil del pan continúa siendo un tema de investigación prioritario. Las estrategias empleadas para prolongar la frescura de este producto han incidido principalmente en la formulación de la masa, en la variación de los parámetros de proceso y en los métodos de producción. Algunas de estas estrategias se comentan a continuación.

10.2.1 Uso de aditivos

10.2.1.1 Hidrocoloides

Se han realizado un gran número de estudios cuyo propósito ha sido determinar el efecto de los hidrocoloides en el envejecimiento del pan (Davidou *et al.*, 1996; Armero y Collar, 1998; Rosell *et al.*, 2001; Guarda *et al.*, 2004; Bárcenas *et al.*, 2004; Ribotta *et al.*, 2004; Mandala, 2005; Asghar *et al.*, 2006; Bárcenas y Rosell, 2006a; Lazaridou *et al.*, 2007). Entre los hidrocoloides que se han estudiado están la pectina, la goma xantana, el alginato de sodio, la goma de algarrobo, la carboximetilcelulosa (CMC), la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), la carragenina, la goma guar y la goma arábiga. Con varios de los hidrocoloides probados se han obtenido buenos resultados, ya que se ha conseguido reducir la velocidad de envejecimiento, así como fabricar pan de mayor volumen y textura más suave. Estos compuestos inducen cambios estructurales en los principales componentes de la masa panadera (almidón, gluten, lípidos) durante la panificación, y posterior almacenamiento de los productos horneados. Específicamente, las interacciones entre los hidrocoloides y el almidón, modifican la estructura e influyen sobre los procesos de gelatinización y retrogradación (Armero y Collar, 1996; Rojas *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 2007), y el envejecimiento del pan (Armero y Collar 1998; Bárcenas *et al.*, 2003).

Algunos hidrocoloides muestran efectos interesantes sobre la dureza de la miga. En particular, algunos derivados de la celulosa (HPMC y CMC) disminuyen la textura inicial de ésta (Armero y Collar, 1998). Para

panes blancos la HPMC y CMC se comportan como buenos agentes antiendurecimiento en procesos indirectos con masa agria; la eficacia de CMC es superior a tiempos cortos de almacenamiento y la de HPMC, a tiempos medios y largos (Collar y Armero, 1996). La HPMC ha mostrado ser un agente eficaz para prolongar la vida de conservación de panes sometidos a panificación interrumpida y bajas temperaturas, en cuyos sistemas el progresivo endurecimiento de la miga y la cristalización de las cadenas de amilopectina se desarrollan rápidamente (Bárceñas y Rosell, 2006a). La presencia de HPMC mejora los parámetros tecnológicos y disminuye la velocidad de envejecimiento, sin afectar los atributos sensoriales ni la microestructura de los sistemas panarios precocidos congelados o refrigerados (Bárceñas y Rosell, 2006a, 2007).

10.2.1.2 Enzimas

El retraso del envejecimiento del pan se puede efectuar, mediante el uso de enzimas amilolíticas y no amilolíticas como coadyuvantes tecnológicos. Además de las enzimas que hidrolizan el almidón (amilolíticas/dextrinizantes, sacarificantes y desramificantes), la incorporación a las masas panarias de enzimas que degradan los polisacáridos diferentes del almidón, y/o de enzimas que modifican los lípidos y el gluten, ha demostrado ser eficaz para retardar el envejecimiento (Armero y Collar, 1997; Collar *et al.*, 1998, 2000; Rosell y Collar, 2008) actuando sobre los polímeros mayoritarios de la harina.

Las amilasas han sido utilizadas ampliamente como inhibidores del envejecimiento del pan a través de la disminución de la velocidad de endurecimiento de la miga. Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar el efecto anti-envejecimiento de estas enzimas. Algunos autores sostienen que las α -amilasas producen dextrinas de bajo peso molecular durante la cocción, y los productos de la hidrólisis interfieren en la retrogradación de la amilopectina y en las interacciones almidón-gluten, involucradas en el proceso de endurecimiento (Martínez-Anaya *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001). Durante el almacenamiento, la dureza de la miga aumenta, mientras que la elasticidad y la cohesividad disminuyen. En presencia de α -amilasa fúngica o α -amilasa bacteriana de termoestabilidad intermedia, los cambios son más len-

tos, lo que confirma su actividad anti-envejecimiento (Armero y Collar, 1998; Blaszcak *et al.*, 2004), particularmente evidente para la dureza, la cohesividad y la elasticidad (Collar y Bollaín, 2005). También se ha demostrado que las α -amilasas son eficaces agentes anti-endurecimiento en panes fabricados por panificación interrumpida (Bárceñas *et al.*, 2003).

Por otro lado, la combinación de transglutaminasa y α -amilasa bacteriana de termostabilidad intermedia da lugar a una cinética de envejecimiento más lenta, particularmente para panes de harina blanca (Collar y Bollaín, 2005). Un estudio cinético de la dureza a lo largo del almacenamiento muestra que la presencia de diferentes carbohidrasas reduce la velocidad de endurecimiento de la miga y disminuye la retrogradación del almidón, a la vez que proporciona a las xilanasas el mayor efecto (Haros *et al.*, 2002). La adición de mezclas binarias de amilasa y lipasa mejora la conservación del pan mediante la formación de un complejo amilosa-lípido más termoestable y la inhibición de la retrogradación de la amilopectina por generación enzimática de dextrinas de bajo peso molecular (León *et al.*, 2002).

10.2.1.3 Pentosanos

Se piensa que algunos polisacáridos no almidonosos, como los arabinoxilanos y arabinogalactanos, también tienen un efecto anti-envejecimiento. Estos compuestos son conocidos como pentosanos y son componentes nativos de las harinas de cereales. La adición de pequeñas cantidades de pentosanos a la formulación del pan puede producir un decremento significativo en la velocidad de endurecimiento del producto final. Se han propuesto varias teorías para explicar el efecto anti-envejecimiento de los pentosanos; sin embargo, ha sido claramente demostrado que estos compuestos no afectan la retrogradación del almidón, aunque producen un retraso en el endurecimiento de la miga (Patil *et al.*, 1976).

Una hipótesis es que los pentosanos pueden actuar como «pozos de agua» moleculares en la matriz de la miga, liberando agua en el curso del almacenamiento. Debido a su efecto plastificante, el agua liberada podría mantener la miga suave durante un lapso de tiempo más

largo (Meuser y Suckow, 1986). Esta interpretación se basa en el hecho de que los pentosanos pueden retener grandes cantidades de agua (Michniewicz *et al.*, 1992). No obstante, en un estudio llevado a cabo por Courtin y Delcour (1998) se concluyó que los pentosanos nativos de la harina tienen una baja velocidad de absorción de agua.

De acuerdo con otras investigaciones, la estructura alveolar de la miga de pan producida con masas enriquecidas con pentosanos es más gruesa que la del pan control. Por tanto, la acción de los pentosanos podría estar enfocada a la formación de la masa y la estructura de la miga, lo cual afectaría a la matriz que rodea a las celdas de gas formadas durante la fermentación y el inicio del horneado. El principal efecto de los pentosanos podría estar concentrado en el ambiente inmediato de la interfase gas/masa. La estructura alveolar de la miga tiene un papel importante en la textura del pan (Fessas y Schiraldi, 1998).

10.2.1.4 Gluten

En 1938, Steller y Bailey observaron una relación inversa (aunque no lineal) entre el contenido de proteínas y el envejecimiento del pan, durante el almacenamiento. Posteriormente, otros investigadores encontraron que el incremento en el nivel de proteínas producía un decremento en la dureza de la miga y en la velocidad de endurecimiento. Prentice *et al.* (1954) explicaron que el incremento en el contenido de proteínas podría disminuir cualquier asociación entre los gránulos de almidón, hinchados y embebidos en la red de gluten, retardando de este modo el endurecimiento de la miga. Ellos también sugirieron que el gluten puede servir como un reservorio de humedad para amortiguar cualquier cambio en la capacidad de hidratación del almidón. Por su parte, Erlander y Erlander (1969) sugirieron que las interacciones gluten-almidón pueden prevenir el envejecimiento del pan, posiblemente mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos amida de las gliadinas, gluteninas y tal vez albúminas, y los grupos hidroxilo del almidón. Además concluyeron que la relación almidón: proteínas en la masa es determinante en la velocidad de envejecimiento. Algo similar fue propuesto por Maleki *et al.* (1980), quienes

postularon que el componente de la harina principalmente responsable de las diferencias en la velocidad de envejecimiento es el gluten.

10.2.1.5 Monoglicéridos y surfactantes

La adición de monoglicéridos y surfactantes (tales como el estearoil lactilato de sodio, SSL) a la formulación del pan, produce un efecto anti-envejecimiento significativo (Russell, 1983; Eliasson y Ljunger, 1988) y se han propuesto varios mecanismos para explicar su acción. Willhoft (1973) sugirió que el efecto anti-envejecimiento de los monoglicéridos puede deberse a una interacción con el gluten, lo cual ha sido confirmado por otros investigadores (De Stefanis *et al.*, 1977; Quail, 1991). Por otro lado, se sabe que los surfactantes son atrapados por el gluten durante el amasado y liberados hacia el gel de almidón durante el horneado. Es probable que los surfactantes permanezcan principalmente en las regiones inter-granulares, donde pueden formar complejos con la amilosa lixiviada o con la amilopectina. Esto puede impedir la formación de puentes entre gránulos de almidón hinchados y, consecuentemente, evitar la retrogradación (Conde-Petit y Escher, 1994).

10.2.2 Uso de masas congeladas

Una de las estrategias usadas para disminuir las pérdidas debidas al envejecimiento del pan es la congelación de las masas, ya que este proceso permite ofrecer al consumidor un producto «recién elaborado», de forma permanente. En esta tecnología, la producción de las piezas de masa es centralizada en una industria panificadora, mientras que el horneado se efectúa en los puntos de venta. El amasado de los ingredientes se realiza de la misma manera que para la elaboración de productos frescos, luego se forman las piezas y posteriormente se congelan; la distribución se lleva a cabo en estado congelado. En los puntos de venta, a medida que el producto se consume, se hace la descongelación, la fermentación en piezas y el horneado (Ribotta *et al.*, 2009). De esta forma, sólo se elabora el pan que se vende, eliminando o minimizando los excedentes, con lo que las pérdidas debidas al envejecimiento del pan se reducen de manera importante. La razón

por la cual la fabricación de masas congeladas permite contrarrestar el envejecimiento, es que al no haberse llevado a cabo el horneado, el almidón de las masas no está gelatinizado y, por tanto, no retrograda durante el almacenamiento. Además, las bajas temperaturas inhiben las reacciones que pudieran ocurrir en las masas almacenadas.

La producción industrial de masas congeladas se realiza a través de procesos altamente mecanizados, lo que reduce los costos de producción y permite obtener productos con calidad constante. Sin embargo, desde el punto de vista económico, las masas congeladas presentan el inconveniente de requerir ser transportadas y mantenidas a -18°C hasta el final del proceso. Adicionalmente, las masas congeladas son sistemas complejos más sensibles al cambio de los ingredientes y a las condiciones de proceso que las masas tradicionales. La congelación y el almacenamiento en estado congelado prolongado provocan pérdida en la calidad de los productos (Ribotta *et al.*, 2009). El deterioro gradual de las masas durante el almacenamiento en congelación se atribuye a la pérdida en la capacidad de retener gases de la masa. Este cambio se debe principalmente a una disminución de la fuerza de la masa y a la pérdida gradual de la actividad y la viabilidad de las levaduras (Inoue y Bushuk 1992; Stauffer, 1993; Casey y Foy, 1995; Ribotta *et al.*, 2001). Las principales consecuencias de estos fenómenos son: mayores tiempos de fermentación, producción de panes con menor volumen y mayor deterioro de la textura final (Dubois y Blockcolsky, 1986).

10.2.3 Horneado en dos etapas

Esta tecnología es adecuada para contrarrestar el envejecimiento y obtener a cualquier hora del día un producto con una calidad similar a la del pan fresco. Consiste en llevar a cabo un proceso de panificación semejante al convencional a excepción del horneado, el cual se realiza en dos etapas. En la primera, se hornea durante un tiempo equivalente a aproximadamente un tercio del tiempo de horneado total del pan, obteniéndose pan parcialmente horneado (PPH). Este producto se conserva en refrigeración, congelación o envasado en atmósfera modificada o inerte, y se mantiene en dicho estado hasta su horneado

final. En general se trata de un producto al que le faltan unos minutos para completar la cocción. La segunda etapa de horneado permite generar la corteza y liberar el aroma característico de los productos recién horneados (Rosell y Collar, 2009). La fabricación del pan por horneado en dos etapas, hace posible completar el horneado y tener pan fresco justamente en el momento de la venta o el consumo y en la cantidad requerida por los compradores o comensales. Así, la cantidad de pan sobrante es pequeña y las pérdidas por envejecimiento también. El horneado en dos etapas es una forma de contrarrestar el envejecimiento debido a que cuando el PPH es almacenado en congelación, la retrogradación del almidón y otras reacciones son inhibidas por la reducción en la movilidad del sistema. Si el PPH es refrigerado o almacenado en atmósfera inerte o modificada, el almidón retrograda y la dureza del producto se incrementa; no obstante, al aplicar altas temperaturas durante la segunda etapa de horneado, la retrogradación se revierte y la textura blanda de la miga se recupera (Fiky Surowka, 2002; Bárcenas y Rosell, 2006b).

Entre las principales ventajas del horneado en dos etapas se encuentran: disponibilidad de pan caliente a cualquier hora del día y en diversos sitios, amplia gama de productos y ahorro de tiempo y mano de obra en los puntos finales de distribución. Cuando se efectúa un proceso de elaboración poco cuidadoso pueden surgir algunos inconvenientes; entre ellos pan con menos volumen, envejecimiento rápido y descascarillado.

CONCLUSIONES

El envejecimiento del pan es un proceso que involucra varios fenómenos fisicoquímicos complejos, cuyas consecuencias (pérdida de la textura suave de la miga y crujiente de la corteza, resequedad del pan y pérdida del sabor característico) dan lugar a un producto desagradable para el consumidor. Además del deterioro en la calidad del pan, el envejecimiento causa pérdidas económicas importantes. Con el fin de contrarrestarlo, se ha evaluado la adición de diferentes compuestos

a la formulación del pan, encontrándose entre los más efectivos las amilasas y la HPMC. También se han probado procesos de panificación alternativos como el uso de masas congeladas y el horneado en dos etapas. Estos últimos son procesos de especial interés, si se considera la tendencia al consumo de alimentos con «etiqueta limpia».

REFERENCIAS

- Armero, E. y Collar, C. (1997). «Texture properties of formulated wheat doughs. Relationships with dough and bread technological quality». *Food Science and Technology*, 204, 136-145.
- Armero, E. y Collar, C. (1998). «Crumb firming kinetics of wheat breads with antistaling additives». *Journal of Cereal Chemistry*, 28, 165-174.
- Asgar, H., Ishaq, Z., Zahir, M., Khalid, Z. y Arshad, M. (2006). «Effect of water soluble pentosans on loaf volume of reconstituted gluten and starch doughs». *Journal of Cereal Chemistry*, 53, 44-1976.
- Baik, M.Y. y Chinachoti, P. (2000). «Moisture redistribution and phase transitions during bread staling». *Journal of Cereal Chemistry*, 77(4), 484-488.
- Bárceñas, M.E., Haros, M., Benedito, C. y Rosell, C.M. (2003). «Effect of freezing and frozen storage on the staling of partly baked bread». *Food Research International*, 36, 863-869.
- Bárceñas, M.E., Benedito, C. y Rosell, C.M. (2004). «Use of hydrocolloids as bread improvers in interrupted baking process with frozen storage». *Food Hydrocolloids*, 18(5), 769-764.
- Bárceñas, M.E. y Rosell, C.M. (2006a). «Different approaches for improving the quality and extending the shelf life of the partially baked bread: low temperatures and HPMC addition». *Journal of Food Engineering*, 72, 92-99.
- Bárceñas, M.E. y Rosell, C.M., (2006b). «Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of parbaked bread». *Food Chemistry*, 95, 438-445.
- Bárceñas, M.E. y Rosell, C.M. (2007). «Different approaches for increasing the shelf life of partially baked bread: Low temperatures and hydrocolloid addition». *Food Chemistry*, 100, 1594-1601.

- Biliaderis, C.G. y Zawistowski, J. (1990). «Viscoelastic behavior of ageing starch gels: effects of concentration, temperature and starch hydrolysates on network properties». *Cereal Chemistry*, 67, 240-246.
- Błaszczak, W., Sadowska, J., Rosell, C.M. y Fornal, J. (2004). «Structural changes in the wheat dough and bread with the addition of alpha amylases». *European Food Research and Technology*, 219(4), 348-354.
- Breaden, P.W. y Willhoft E.M.A. (1971). «Bread staling. III. Measurement of the redistribution of moisture in bread by gravimetry». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22, 647-649.
- Casey, G. y Foy, J. (1995). «Yeast performance in frozen doughs and strategies for improvement». En K. Kulp, K. Lorenz y J. Brummer (Eds.). *Frozen and Refrigerated Doughs and Batter* (19-51). St. Paul: American Association of Cereal Chemistry.
- Cauvain, S.P. (2001). *Breadmaking. cereals processing technology*. Tercera edición. EE.UU.: CRC press.
- Clark, R. B. (1990). *Advances in Agronomy: physiology of cereals for mineral nutrient uptake, use, and efficiency*. Primera edición. EE.UU.: Academic Press.
- Collar, C. y Armero, E. (1996). «Physicochemical mechanisms of bread staling during storage: formulated doughs as a technological issue for improvement of bread functionality and keeping quality». *Recent Research Developments in Nutrition*, 1, 115-143.
- Collar, C., Armero, E. y Martínez, J. (1998). «Lipid binding of formula bread doughs». *Food Research and Technology*, 207, 110-121.
- Collar, C. y Bollaín, C. (2005). «Impact of microbial transglutaminase on the staling behaviour of enzyme supplemented pan breads». *European Food Research and Technology*, 221 (3-4), 298-304.
- Conde-Petit, B. y Escher, F. (1994). «Influence of starch lipid complexation on the ageing and baked goods and associated changes in textural properties». *Journal of Texture Studies*, 1(4), 272-477.
- Courtin, C. M. y Delcour, J. A. (1998). «Physicochemical and bread making properties of low molecular weight wheat derived arabinoxylans». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4066-4073.
- Davidou, S., Le Meste, M., Debever, E. y Bekaert, D. (1996). «A contribution to the study of staling of white bread: effect of water and hydrocolloids». *Food Hydrocolloids*, 10, 375-383.

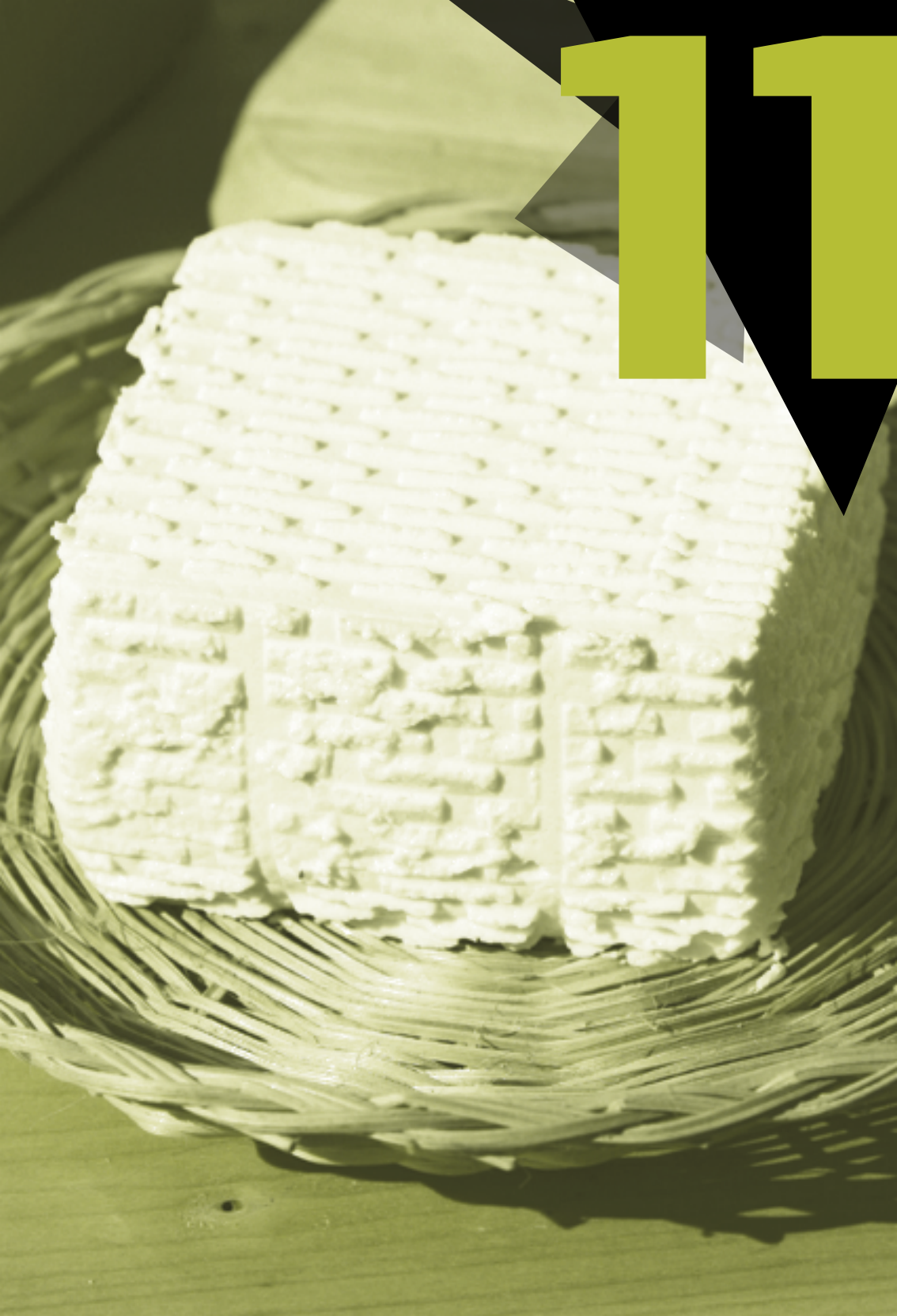
- De Stefanis, V., Ponte, J., Chung, F. y Ruzza, N. A. (1977). «Binding of crumb softeners and dough strengtheners during breadmaking». *Cereal Chemistry*, 54, 13-24.
- Dubois, D. y Blockolsky, D. (1986). «Frozen bread dough. Effect of dough mixing and thawing methods». *American Institute of Baking Research Department Technology Bull*, 1(8), 1-7.
- Eliasson, A.C. y Ljunger, G. (1988). «Interaction between amylopectin and lipid additives during retrogradation in model system». *Journal of Science of Food and Agriculture*, 44, 353-361.
- Erlander, S. y Erlander, L. (1969). «Explanation of ionic sequences in various phenomena. X. Protein-carbohydrate interactions and the mechanism of staling bread». *Starch/Stärke*, 21, 305-315.
- Every, D., Gerrard, J.A., Gilpin, M.J., Ross, M. y Newberry, M.P. (1998). «Staling in starch bread: the effect of gluten additions on specific loaf volume and firming rate». *Starch/Stärke*, 50, 443-446.
- Fessas, D. y Schiraldi, A. (1998). «Texture and staling of wheat bread crumb: effects of water extractable proteins and pentosans». *Thermochimica Acta*, 323, 17-23.
- Fik, M. y Surowka, K. (2002). «Effect of prebaking and frozen storage on the sensory quality and instrumental texture of bread». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1268-1275.
- Gerrard, J.A., Abbot, R.C., Newberry, M.P., Gilpin, M.J., Ross, M. y Fayle, S.E. (2001). «The effect of nongluten proteins on the staling of bread». *Starch/Stärke*, 53, 278-280.
- Gidley, M. J. (1989). «Molecular mechanisms underlying amylose aggregation and gelation». *Macromolecules*, 22, 351-358.
- Guarda, A., Rosell, C.M., Benedito, C. y Galotto, M.J. (2004). Different hydrocolloids as bread improvers and antistaling agents. *Food Hydrocolloids*, 18, 241-247.
- Guinet, R. y Godon, B. J. (1994). *La panificación francesa: la ultracongelación*. Primera edición. España. Montagud.
- Haros, M., Rosell, C. y Benedito, C. (2002). «Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling». *European Food Research and Technology*, 215, 425-430.
- He, H. y Hosoney, R.C. (1990). «Changes in bread firmness and moisture during long term storage». *Cereal Chemistry*, 67(6), 603-605.

- Inoue, Y. y Bushuk, W. (1992). «Studies on frozen doughs. II. Flour quality requirements for bread production from frozen dough». *Cereal Chemistry*, 69, 423-428.
- Karaoglu, M.M. (2006). «Effect of initial baking and storage time on pasting properties and aging of parbaked and rebaked rye bread». *International Journal of Food Properties*, 9(3), 583-596.
- Katz, J.R. (1928). *Technology and engineering: gelatinization and retrogradation of starch in relation to the problem of bread staling*. Primera edición. EE.UU.: Walton RP.
- Kay, M. y Willhoft, E.M.A. (1972). «Bread staling. IV. Electrical properties of the crumb during staling». *Journal of Science of Food and Agriculture*, 23, 321-331.
- Lazaridou, A., Duta, D., Papageorgiou, M., Belc, N. y Biliaderis, C. G. (2007). «Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten free formulations». *Journal of Food Engineering*, 79, 1033-1047.
- León, A., Duran, E. y Benedito De Barber, C. (1997). «Firming of starch gels and amylopectin retrogradation as related to dextrin production by amylase». *Food Chemistry*, 12, 156-160.
- León, A., Durán, E. y Benedito de Barber C. (2002). «Utilization of enzyme mixtures to retard bread crumb firming». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1416-1419.
- Leung, H.K. (1981). «Structure and properties of water». *Cereal Foods World*, 26, 350-352.
- Leung, H.K., Magnuson, J.A. y Bruinsma, B.L. (1983). «Water binding of wheat flour doughs and breads as studied by deuterium relaxation». *Journal of Food Science*, 48, 95-99.
- Longton, J. y Legrys, G. A. (1981). «Differential scanning calorimetry studies on the crystallinity of aging wheat starch gels». *Starch-Stärke*, 33, 410-414.
- Maleki, M., Hosney, R. C. y Mattern, P.J. (1980). «Effects of loaf volume, moisture content, and protein quality on the softness and staling rate of bread». *Cereal Chemistry*, 57, 138-140.
- Mandala, I. (2005). «Physical properties of fresh and frozen stored, microwave reheated breads, containing hydrocolloids». *Journal of Food Engineering*, 66, 291-300.

- Martin, M., Zeleznak, K. y Hosenev, R. (1991). «A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling». *Cereal Chemistry*, 68(1), 498-503.
- Martinez-Anaya, M., Devesa, Andreu, P., Escriva, P. y Collar, C. (1998). «Effects of the combination of starters and enzymes in regulating bread quality and shelf life». *Food Science Technology International*, 4, 425-435.
- Meuser, F. y Suckow, P. (1986). «Physics and chemistry of baking. Non-starch polysaccharides». En J.M.V. Blanshard, P. J. Frazie. y T. Galliani (Eds.), Royal Society of Chemistry, London.
- Michniewicz, J., Biliaderis, C. y Bushuk, W. (1992). «Effect of added pentosans on some properties of wheat bread». *Food Chemistry*, 43, 251-257.
- Miles, M. J., Morris, V.J., Orford, P.D. y Ring, S.G. (1985). «The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch». *Carbohydrate Research*, 135-271.
- Morgan, K.R., Gerrard, J., Every, D., Ross, M. y Gilpin, M. (1997). «Staling in starch breads. The effect of antistaling alfa amylase». *Starch/Stärke*, 49, 54-59.
- Morris, V. J. (1990). «Starch gelation y retrogradation». *Trends in Food Science and Technology*, 1, 2-6.
- Patil, K., Finney, K., Shogren, M. y Tsen, C. (1976). «Water soluble pentosans of wheat flour. III. Effect of wáter soluble pentosans on loaf volume of reconstituted gluten and starch doughs». *Cereal Chemistry*, 53(44), 188-193.
- Ponte, J., Titcomb, S. y Cotton, R. (1962). «Flour as a factor in bread firming». *Cereal Chemistry*, 39, 437-444.
- Prentice, N., Cuendet, L.S. y Geddes, W.F. (1954). «Studies on bread staling. V. Effect of flour fractions and various starches on the firming of bread crumb». *Cereal Chemistry*, 31, 188-206.
- Quail, K.J., McMaster, G.J. y Wootton, M. (1991). «The role of flour lipids in the baking of arabic bread». *Journal Cereal Science*, 14, 131-134.
- Ribotta, P., León, A. y Añón, M. C. (2001). «Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality». *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49, 913-918.
- Ribotta, P., Pérez, G.T., León, A. y Añón, C. (2004). «Effect of emulsifier and guar gum on micro structural, rheological and baking performance of frozen bread dough». *Food Hydrocolloids*, 18, 305-313.

- Ribotta, P., Alcantara, P. y Tadini, C. (2009). «Masas congeladas». En P.D. Ribotta y C.C. Tadini (Eds.), *Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados* (13-60). Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Ring, G., Colonna, P., l'Anson, J., Kalichevski, M. T., Miles, M. J., Morris, V. J. y Orford, P. D. (1987). «The gelation and crystallization of amylopectin». *Carbohydrate Research*, 162-277.
- Rogers, D. E., Zeleznak, K. J., Lai, C. S. y Hoseney, R. C. (1988). «Effect of native lipids, shortening, and bread moisture on bread firming». *Cereal Chemistry*, 65, 498-501.
- Rojas, J.A., Rosell, C.M. y Benedito de Barber, C. (1999). «Pasting properties of different wheat flour hydrocolloids systems». *Food Hydrocolloids*, 13, 27-33.
- Rojas, J. A., Rosell, C. M. y Benedito de Barber, C. (2001). «Role of maltodextrins in the staling of starch gels». *European Food Research and Technology*, 212, 364-368.
- Rosell, C.M., Rojas, J.A. y Benedito de Barber, C. (2001). «Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality». *Food Hydrocolloids*, 15, 75-81.
- Rosell, C.M., Collar, C. y Haros, M. (2007). «Assessment of Hydrocolloids Effects on the Thermo Mechanical Properties of Wheat Using the Mixolab». *Food Hydrocolloids*, 21, 452-462.
- Rosell, C.M. y Collar, C. (2008). «Effect of various enzymes on dough rheology and bread quality». En R. Porta, P. Di Pierro y L. Mariniello (Eds.). *Recent Research Developments in Food Biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids* (pp 165-183). Kerala, India: Research Signpost.
- Rosell, C.M. y Collar, C. (2009). «Productos precocidos congelados y refrigerados». En: P.D. Ribotta y C.C. Tadini (Eds.), *Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados* (61-86). Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Russell, P. L. (1983). «A kinetic study of bread staling by differential scanning calorimetry. The effect of painting loaves with ethanol». *Starch-Stärke*, 35, 277-281.
- Sahlström, S. y Brathen, E. (1997). «Effects of enzyme preparations for baking, mixing time and resting time on bread quality and bread staling». *Food Chemistry*, 58 (1), 75-80.

- Schiraldi, A. y Fessas, D. (2001). *Bread Staling: mechanism of staling*. Primera edición. EE.UU.: CRC Press.
- Stauffer, E. (1993). Frozen bakery products. En Mallet, A.C. (Ed.), «Frozen Food Technology». Londres, Reino Unido: Blakie Academic and Professional.
- Steller, W. y Bailey, C. (1938). «The relation of flour strength, soy flour and temperature of storage to the staling of bread». *Cereal Chemistry*, 15, 39-401.
- Willhoft, E. M. A. (1971). «Bread staling. I. Experimental study». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22(4), 176-180.
- Willhoft, E. M. A. (1973). «Mechanism and theory of staling of bread and baked goods and associated changes in textural properties». *Journal Texture Study*, 4, 292-392.
- Xie, F., Dowell, F.E. y Sun, X. S. (2004). «Using visible and near-infrared reflectance spectroscopy and differential scanning calorimetry to study starch, protein, and temperature effects on bread staling». *Cereal Chemistry*, 81(2), 249-254.



Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad

C. Ramírez-López, J. F. Vélez-Ruiz

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial cuyas características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales difieren entre cada tipo. Se estiman más de 2000 variedades de queso (Guna-sekaran y Ak, 2003), entre madurados, semi-madurados y frescos. No obstante en nuestro país predomina el consumo de quesos frescos, mismos que forman parte de una enorme variedad de platillos que constituyen nuestro legado gastronómico.

La práctica en torno a la elaboración del queso ha sufrido importantes cambios, transformándola de un arte empírico, a una tecnología industrial con fuertes bases científicas. Se han identificado diversos factores como causantes de modificaciones en las propiedades del queso (microestructura, propiedades fisicoquímicas, texturales, reológicas y sensoriales), entre ellos la formulación, las condiciones de proceso y almacenamiento y las alteraciones provocadas por microorganismos. Razón por la cual, la comprensión de los aspectos científico-técnicos en torno a la elaboración del queso es de suma importancia para un adecuado control de las condiciones que pudieran afectar dichas propiedades y, en consecuencia, su calidad y aceptación por parte del consumidor.

El objetivo de la presente revisión es brindar al lector un panorama actual del conocimiento respecto a la ciencia y tecnología de quesos frescos, destacando sus propiedades principales, clasificación y métodos de elaboración. Asimismo, se incluye una descripción de los conceptos texturales y reológicos relacionados con este producto lácteo, las pruebas más comunes, su interpretación y correlación con otras

técnicas como la evaluación sensorial, que contribuyan en su conjunto al desarrollo de productos de gran calidad y amplia aceptabilidad por parte del consumidor.

11.1 DEFINICIÓN DE QUESO

El queso es el producto obtenido por coagulación de la leche cruda o pasteurizada (entera, semidescremada y descremada), constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel más o menos deshidratado (Eck, 2000). Mediante este proceso se logra preservar el valor nutritivo de la mayoría de los componentes de la leche, incluidas las grasas, proteínas y otros constituyentes menores, generando un sabor especial y una consistencia sólida o semisólida en el producto obtenido (Vélez-Ruiz, 2009).

De acuerdo al *Codex Alimentarius* de la FAO/OMS (2008), el queso es el producto sólido o semisólido, madurado o fresco, en el que el valor de la relación suero proteínas/caseína no supera al de la leche, y que es obtenido por coagulación (total o parcial) de la leche por medio de la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes adecuados, con un escurrido parcial del lactosuero (Scott *et al.*, 1998).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el queso se define como un sistema tridimensional tipo gel, formado básicamente por la caseína integrada en un complejo caseinato fosfato cálcico, el cual por coagulación, engloba glóbulos de grasa, agua, lactosa, albúminas, globulinas, minerales, vitaminas y otras sustancias menores de la leche, las cuales permanecen adsorbidas en el sistema o se mantienen en la fase acuosa retenida (Walstra *et al.*, 2006).

11.1.1 Proceso de elaboración

El proceso de elaboración del queso es bastante simple, no obstante involucra fenómenos físicos y químicos muy complejos. Se trata esencialmente de un proceso de concentración, a partir de la coagulación de la proteína mayoritaria de la leche (caseína) por la acción enzimá-

tica (cuajo) u otro coagulante de tipo ácido (comúnmente ácido láctico) (Johnson y Law, 2011).

En la figura 11.1 se muestra un esquema general para la elaboración de queso fresco. Para el caso de quesos suaves (panela, fresco, blanco y crema), la coagulación se desarrolla a temperatura de aproximadamente 38 °C, mientras que para el queso tipo Oaxaca la temperatura debe alcanzar los 42 °C, además algo distintivo es que se requiere una preacidificación de la leche, la cual se logra por la adición de cultivos iniciadores (Caro *et al.*, 1998).

El paso indispensable en la elaboración de los quesos, es la coagulación de la caseína, provocada mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas (cuajos de distintos tipos) y calcio. El proceso de formación del coágulo incluye dos etapas (figura 11.2). En la primera, se desarrolla un proceso enzimático modulado por la quimosina, la cual rompe los enlaces entre los aminoácidos fenilalanina y metionina (Fen-105 y Met-106) presentes en la κ -caseína, liberándose el glicomacropéptido en la solución. En la segunda etapa, los agregados de para- κ -caseína producen el coágulo (Udayarajan, 2007). Hasta la etapa de coagulación, los procedimientos básicos en la elaboración de los diferentes tipos de quesos son muy similares; sin embargo, las etapas siguientes varían de acuerdo con el tipo de queso a producir.

Una vez que la leche se ha coagulado, se debe proceder al cortado del coágulo (cortes verticales y horizontales) en pequeños cubos, para favorecer la eliminación del suero (desuerado). Posteriormente se procede a su moldeado.

El moldeado tiene como finalidad dar forma al queso y ayudar a que los gránulos de la cuajada se aglomeren. Los moldes pueden ser cilíndricos, cuadrados o alargados. Generalmente, el moldeo y el prensado se realizan utilizando el mismo equipo, pues los moldes tienen dispositivos que ejercen presión sobre el queso. Comúnmente en el caso de quesos suaves como del tipo fresco, no es necesario aplicar presión, pues es suficiente con la que provoca el propio peso del queso (autoprensado).

El salado, además de proporcionar sabor al producto, evita la proliferación de microorganismos y contribuye a la formación de la cor-

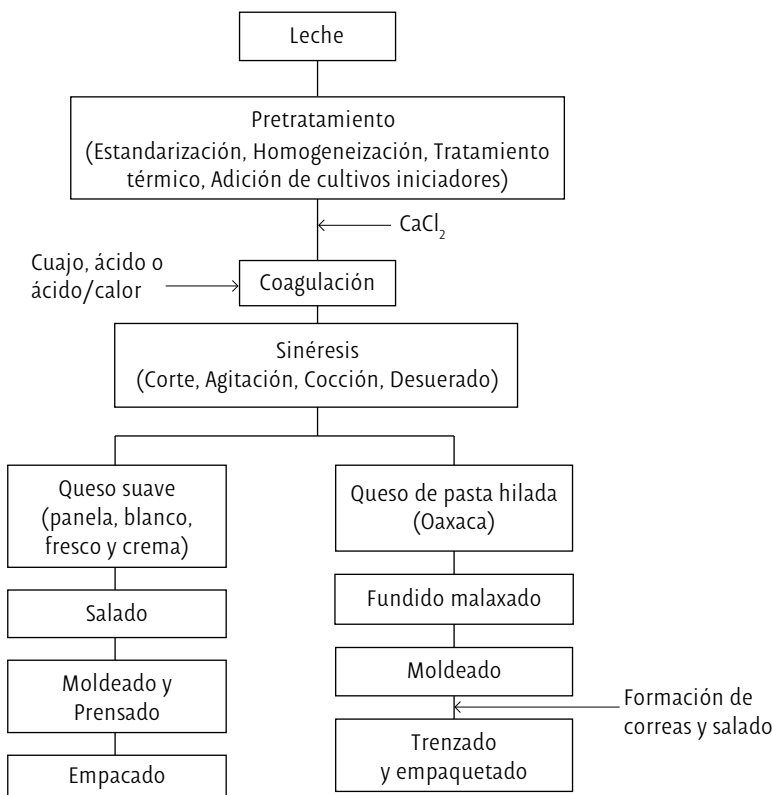


Figura 11.1

Diagrama general para la elaboración de queso fresco

Adaptado de Gunasekaran y Ak, 2003.

teza del queso. En el proceso, se utiliza sal cristalizada o salmueras de diferentes concentraciones, de acuerdo con el tipo de queso.

11.1.2 Clasificación y criterios de clasificación

El queso es producido en todo el mundo con una gran diversidad de sabores, aromas, texturas y formas, habiéndose recopilado en diversos catálogos y trabajos más de 2 000 variedades y tipos (Fox *et al.*, 2000). No obstante, la mayoría de los quesos que se elaboran en Mé-

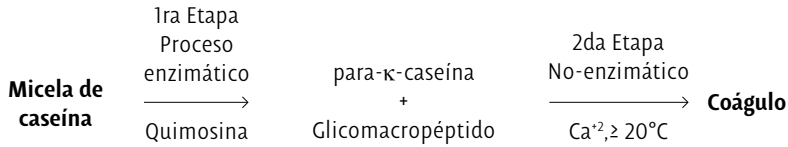


Figura 11.2.

Formación del coágulo de caseína

Adaptado de Udayarajan, 2007.

xico son frescos o de corta duración, algunos con buena aptitud para el fundido (con pH entre 5.1 y 5.3) y algunos con propiedades de desmoronamiento o fragmentación (García-Islas, 2006; Jiménez-Guzmán *et al.*, 2009).

Existen diversos criterios de clasificación con base en las condiciones de proceso o las características fisicoquímicas del tipo de queso:

- a) Por contenido de humedad, se clasifican en quesos duros (20-42%), semiduros (44-55%) y blandos o suaves (aprox. 55%) (Scott *et al.*, 1998).
- b) De acuerdo al tipo de coagulación de la caseína, se clasifican en quesos de coagulación enzimática, quesos de coagulación ácida y quesos de coagulación ácida/térmica (Dalgleish, 1999; Fox *et al.*, 2000; Gunasekaran y Ak, 2003).
- c) De acuerdo a su estado de maduración: frescos (seis días), semi-madurados (40 días) y madurados (>70 días) (McSweeney, 2004).

En la figura 11.3 se muestra una representación que engloba estos criterios de clasificación (Farkye, 2004).

El queso fresco presenta distintos nombres según la región de producción y numerosas variantes en cuanto a las técnicas de elaboración. De acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-121-SSA1-1994) el queso fresco se caracteriza por un contenido de humedad elevado, un sabor suave y un periodo de vida de anaquel corto, por lo que debe ser refrigerado. Se consideran como quesos frescos los siguientes: panela,

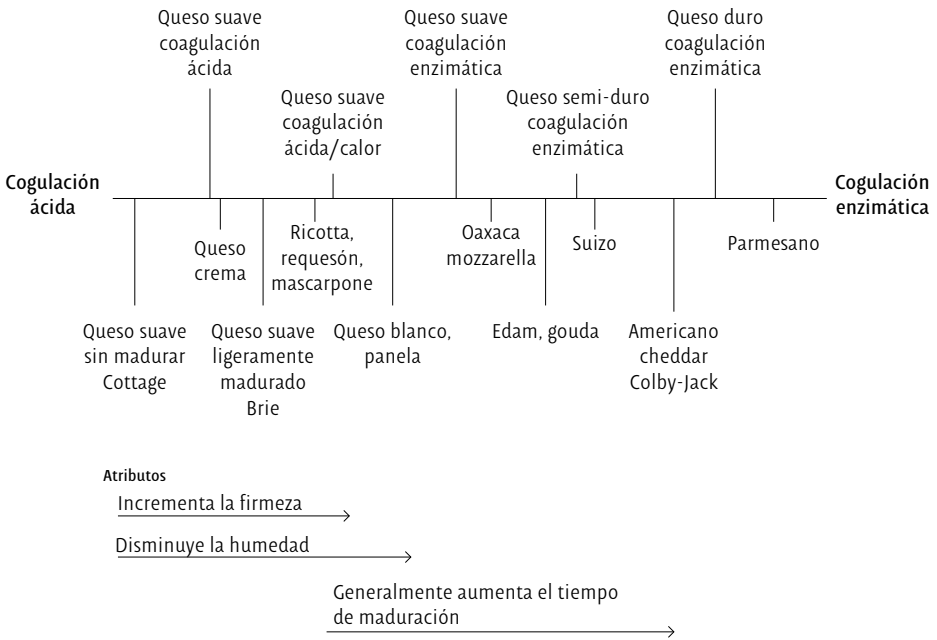


Figura 11.3

Criterios de clasificación del queso

Adaptado de Farkye, 2004.

fresco, ranchero, blanco, Oaxaca, asadero, adobera, requesón, queso crema, entre otros.

11.1.3 Descripción de algunos tipos de quesos frescos

- *Queso fresco mexicano.* Se dice que es, por mucho, el queso hispano más popular en los EE.UU. y México. Es un queso obtenido por coagulación con cuajo, elaborado a partir de leche descremada o semidescremada. Tiene un ligero sabor lácteo, con notas entre dulce y salado. En su proceso de elaboración, la cuajada se suele moler finamente antes de la salazón, lo que hace que el queso sea desmenuzable. Este tipo de queso contiene una humedad de entre 46-57%, 18-29% de grasa,

- 17-21% de proteína, sal de 1-3% y un pH > 6.1 (Hwang y Gunasekaran, 2001; Path, 1991).
- *Queso blanco*. Es un queso cremoso y blanco elaborado con leche descremada, de acuerdo al proceso es una mezcla entre queso cotija y queso mozzarella, tradicionalmente se coagula la leche con limón pero en la actualidad, en forma comercial, se elabora con cultivos y cuajo, por lo que tiene un sabor ligeramente ácido. Suele suavizarse con el calor, pero no se funde. La cuajada no se muele finamente, por lo que el resultado es un queso con textura más dura que la de queso fresco. Contiene 51-53% de humedad, 19-25% de grasa, 20-22% de proteína, y 1.8-3% de sal y tiene un pH ≤ 5.6 (Farkye *et al.*, 1995). Por sus características, el queso blanco puede ser producido en un periodo de tiempo muy corto. Primero la leche se calienta a 85 °C y se añade un ácido orgánico hasta alcanzar un pH de 5.3 (esto ocasiona la precipitación de la proteína o formación de la cuajada). Después del desuerado, la cuajada es salada y moldeada en aros presionando para eliminar el exceso de suero. Finalmente el queso se empaqueta para su venta inmediata (Farkye *et al.*, 1995).
 - *Queso panela*. Es un queso fresco de coagulación enzimática de pasta blanda y fresca que no incluye maduración, prensado por su propio peso, elaborado con leche entera pasteurizada suplementada con cloruro de calcio. Una vez que la leche se coagula, ésta se corta en cubos de aproximadamente una pulgada y se cocina hasta alcanzar la firmeza deseada bajo agitación suave. Posteriormente se drena la mitad del lactosuero para proceder con la adición de sal, la cual se puede añadir directamente o en solución. Después de mezclar durante unos pocos minutos, la cuajada húmeda se transfiere a los moldes en forma de canasta o cesta para drenar durante la noche. El queso se envasa para su venta inmediata. Contiene alrededor de 53-58% de humedad, 19-25% de grasas, 18-20% de proteínas, 1.3-1.8% de sal y un pH de 5.6 a 6.4 (Guisa, 1999; Path, 1991).

- *Requesón*. Es un queso blando untable, que tiene un sabor ligeramente salado y textura granulada, similar al queso ricotta. Se fabrica a partir de suero de leche pasteurizada complementado con leche entera o crema. La mezcla de suero de leche/leche se calienta a 85 °C; se añade vinagre para ocasionar la coagulación de las proteínas de la leche y se añade sal para condimentar. La cuajada húmeda se transfiere a recipientes para drenar durante la noche; el queso terminado contiene alrededor de 75% de humedad (Van Hekken y Farkye, 2003).
- *Queso Oaxaca*. Es quizás el tipo de queso fresco de «pasta hilada» de mayor consumo en México. Es un queso suave de coagulación enzimática que incluye, sin embargo, adición previa de microorganismos (30-35 °C), es generalmente elaborado a partir de leche entera cruda y es producido ampliamente a nivel casero e industrializado en diferentes regiones de nuestro país. Respecto a sus propiedades fisicoquímicas, contiene una humedad de entre 40-46%, 23% de grasas y 24% de proteína, así como un pH de entre 5.0-5.5 (Guisa, 1999). Se caracteriza por tener una textura fibrosa única, excelentes propiedades de fundido, sabor ligero, cuya presentación final en madeja de hilo es también muy característica (De Oca-Flores *et al.*, 2009).

El proceso de elaboración del queso Oaxaca es similar al del queso mozzarella, con algunas consideraciones (figura 11.1). Después de la cuajada, la pasta se cuece a 40-42 °C, se deja reposar en el suero para alcanzar el pH deseado. A continuación, la pasta se sumerge en agua caliente y se amasa. El queso fundido se estira en una hebra larga y plana, la cual se enfría al colocarla en agua fría, posteriormente el queso se saca del tanque después de que se solidifica. El salado se realiza frotando sal de grano sobre cada lado de la hebra, para a continuación enrollar la cadena en forma de bola de hilo (Van Hekken y Farkye, 2003).

11.2 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES DE LOS QUESOS FRESCOS Y SUS MÉTODOS DE MEDICIÓN

11.2.1 Composición química y valor nutritivo

El queso comparte casi las mismas propiedades nutricionales con la leche; a excepción de la lactosa, los otros componentes se encuentran más concentrados (tabla 1.1). Además de brindar un excelente aporte de proteínas de alto valor biológico, el queso se destaca por ser una fuente importante de calcio y fósforo (Alais, 1985; Van Hekken y Farkye, 2003; García-Islas, 2006).

11.2.2 Microestructura

Existe una estrecha relación entre la microestructura del queso y su reología, ambas propiedades a su vez están determinadas por la composición química del queso. El análisis de microestructura es útil cuando se desea evaluar el efecto de diferentes ingredientes en la formulación o el uso de alguna tecnología de procesado y conservación (Buffa *et al.*, 2004).

En el queso, el análisis de microestructura se ha utilizado principalmente para observar la distribución de los glóbulos de grasa y micelas de proteína (Lobato-Calleros *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2010), para evaluar la incorporación de gomas (Liu *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2007) o el efecto de procesos enzimáticos, proteólisis y lipólisis, durante la maduración (Karami *et al.*, 2009) o por acción microbiana (Pereira *et al.*, 2009), el efecto del procesamiento térmico de la leche (Morales-Celaya *et al.*, 2012) y almacenamiento en condiciones de congelación (Kuo y Gunasekaran, 2003; Ribero *et al.*, 2009), entre otros aspectos.

Para la observación de la microestructura del queso, se han empleado diversas técnicas; entre las más comunes están la microscopía electrónica de barrido (Lobato-Calleros *et al.*, 2007; Kuo y Gunasekaran, 2003), la microscopía electrónica de transmisión (Udayarajan, 2007; Kuo y Gunasekaran, 2009) y la microscopía confocal de barrido láser, sobre

Tabla 11.1 Composición química y valor nutritivo de la leche de vaca con respecto a los quesos frescos típicamente consumidos en México

	Leche entera de vaca ^a	Quesos fresco ^b	Queso panela ^c	Queso Oaxaca ^c	Queso blanco ^c	Queso asadero ^c	Requesón ^c
Humedad(%)	87.5	46-57	53.2-58.3	49.3-52.4	51-53	40-46	74-75
Grasa(%)	3.5	18-29	12.1 -18.8	20.6-24.2	19-25	23-25	7.0-8.0
Proteína(%)	3.5	17-21	18.4-20.5	20.4-22.4	20-22	24-27	11.0-12.0
Ceniza(%)	0.7-0.9	-	2.5-2.7	3.2-3.7	-	1.4-1.8	
Lactosa(%)	4.7	-	3.44.2	0.1-0.3	-	-	
Calcio(%)	1.3-1.8	-	23.9	-	-	-	
Fósforo(%)	1.0-2.3	-	18.4	-	-	-	
Sal		1.0-3.0	1.3-1.8	1.4-2.3	1.803.0	1.4-1.8	
pH	6.7	6.1	5.6-6.4	5.0-5.3	5.6	5.0-5.0-5.5	<1.0
Valor nutritivo (kcal/100g)	62-66	255±37	255±37	288±22	-	-	

^aAlais,1985; ^bVan Hekken y Farkye, 2003; ^cGarcía-Islas, 2006.

todo, cuando se busca evidenciar la presencia de otros componentes no lácteos en la fórmula, tales como el almidón (Trivedi *et al.*, 2008a; Trivedi *et al.*, 2008b).

Recientemente se ha hecho uso de la micro-tomografía de rayos X, de la que se señalan como principales ventajas no sólo el proporcionar un porcentaje preciso de la cantidad de grasa presente en productos como el queso, sino que también ayuda a revelar su distribución espacial (Laverse *et al.*, 2011).

11.2.3 Propiedades texturales y reológicas

Sin lugar a dudas, para el consumidor la textura juega un rol importante en términos de inferir la calidad de un alimento. Particularmente en el queso, la textura es uno de los atributos más importantes que ayudan a determinar la identidad del mismo (Bourne, 2002).

Otro aspecto importante del alimento que se asocia con la textura es su comportamiento reológico. De manera general se puede definir a la reología, como el estudio de la deformación y flujo de materias

primas, productos intermedios y productos terminados (Muller, 1973; Bourne, 2002; Shoemaker *et al.*, 1987).

La información textural y reológica es importante en el diseño de procesos de transformación en alimentos (mezclado, flujo de materiales, calentamiento, enfriamiento), en la determinación de la funcionalidad de los ingredientes para el desarrollo de productos, en el control de calidad de productos intermedios y finales, en estudios de tiempo de vida útil y en evaluaciones de propiedades texturales correlacionadas con pruebas sensoriales, entre otros (Steffe, 1996; Vélez-Ruiz y Barbosa-Cánovas, 1997; Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005; Foegeding y Drake, 2007).

El queso posee propiedades viscoelásticas, siendo los estudios reológicos esenciales para expresar sus características físicas y propiedades mecánicas (Bohlin *et al.*, 1984). Para tal efecto, se han desarrollado numerosos instrumentos y métodos para evaluar las propiedades reológicas de los alimentos, en particular en lo que concierne a la textura de quesos. Esta diversidad de instrumentos suele ser agrupada y reconocida en tres grupos; empírico, imitativo y fundamental (Segards y Kapsalis, 1987; Rosenthal, 1999; Bourne, 2002; Gunasekaran y Ak, 2003; Kilcast, 2004; Vélez-Ruiz, 2009).

Las mediciones empíricas son aquellas pruebas que tienden a relacionar una variable medida con una propiedad del material, sin una base científica rigurosa. El penetrómetro, el tensómetro, la prueba de punción, y las pruebas con compresores de bola son ejemplos típicos de mediciones empíricas (Gunasekaran y Ak, 2003). Cabe señalar, que estas pruebas no se consideran de precisión y frecuentemente los resultados que se obtienen son difícilmente comparables a los obtenidos con equipos de pruebas fundamentales (Bourne, 2002).

Por otro lado, las pruebas imitativas (también denominadas pruebas semi-fundamentales), incluyen sistemas de medición mecánica con poco control de variables experimentales (tales como, el tipo de sonda, el tamaño y forma de la muestra, entre otras). Como su nombre lo indica son pruebas que tratan de imitar mecánicamente la evaluación sensorial realizada por evaluadores humanos. De hecho, se recomienda emplearlas junto con la evaluación sensorial, a fin de obtener

modelos más exactos de los atributos de textura del alimento (Gunasekaran y Ak, 2003). Una de las pruebas imitativas más comunes es el Análisis de Perfil de Textura (TPA, por sus siglas en inglés).

Finalmente, las pruebas fundamentales miden las propiedades físicas de acuerdo al módulo de viscosidad o elasticidad. Las muestras utilizadas en estas determinaciones deben tener una geometría específica y ser deformadas de manera controlada, a fin de permitir definir lo más exactamente posible la respuesta reológica del alimento. Dentro de esta clasificación se incluyen: la prueba de compresión uniaxial a velocidad constante, la prueba de relajación y *creep* y las pruebas dinámicas oscilatorias (Bourne, 2002).

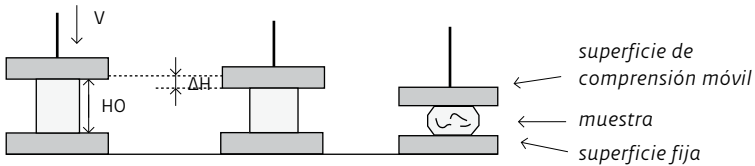
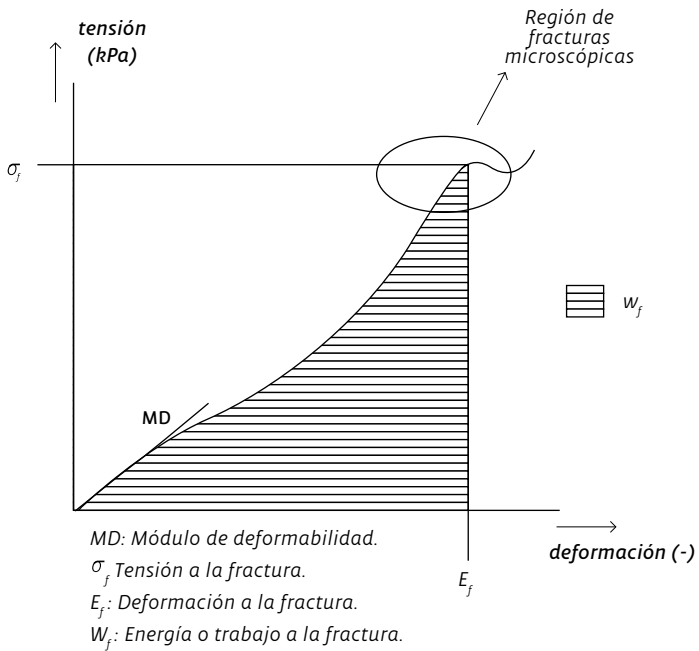
Sin embargo, desde un punto de vista práctico en la caracterización reológica de queso, las técnicas de compresión uniaxial a velocidad constante, la relajación ante el esfuerzo y el denominado TPA, son las pruebas más ampliamente utilizadas (Ibáñez *et al.*, 1998; Pavia *et al.*, 1999). Por lo que a continuación se describen con más detalle.

11.2.3.1 Compresión uniaxial a velocidad constante

El método consiste en comprimir una muestra de queso de geometría y dimensiones conocidas mediante un plato descendente a velocidad constante, hasta un nivel de deformación superior al punto de fractura (generalmente a una distancia $>75\%$ de su altura original). Los parámetros reológicos obtenidos a través de este método se esquematizan en la figura 11.4 y son: el módulo de deformabilidad (MD), estimado como la regresión lineal de la parte inicial de la curva, la tensión o esfuerzo (σ_f), la deformación (ϵ_f) y la energía (W_f) a la fractura (Castañeda, 2002).

11.2.3.2 Relajación y *creep*

El comportamiento viscoelástico del queso se puede describir mediante las pruebas de relajación y *creep*. En esta prueba se le aplica una deformación inicial a la muestra de queso, la cual se mantiene constante y se monitorea el esfuerzo necesario para mantener constante esta deformación. Por otro lado, la relajación del esfuerzo se describe como la habilidad del material para aliviar la aplicación de un esfuerzo



v : velocidad de desplazamiento de la sup. de compresión
 H_0 : altura inicial de la muestra
 ΔH : variación de la altura de la muestra

Figura 11.4.

Curva de compresión uniaxial a velocidad constante

Adaptado de Castañeda, 2002.

impuesto en una deformación constante. Los datos obtenidos en la prueba de *creep* y en la relajación se representan gráficamente y/o mecánicamente por medio de curvas (figura 11.5) y modelos como el Maxwell y el de Kelvin (Steffe, 1996).

11.2.3.3 Análisis de perfil de textura

El análisis de perfil de textura consiste en una prueba de doble compresión en la cual se someten muestras del producto a una compresión del 80 a 90% de su altura inicial, que resulta casi siempre en la ruptura del alimento. Bourne (2002) cita los siguientes parámetros texturales obtenidos con el TPA: fractura, dureza, cohesión, adhesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad, en la figura 11.6 se muestran un esquema típico de una prueba de TPA, y los parámetros obtenidos.

En la tabla 11.2, se muestran los rangos de valores de la caracterización funcional (fundibilidad) y textural (dureza, masticabilidad y rigidez) para algunos quesos frescos mexicanos.

Asimismo, en la tabla 11.3 se describen las condiciones para algunas de las pruebas texturales aplicadas a diferentes tipos de queso fresco.

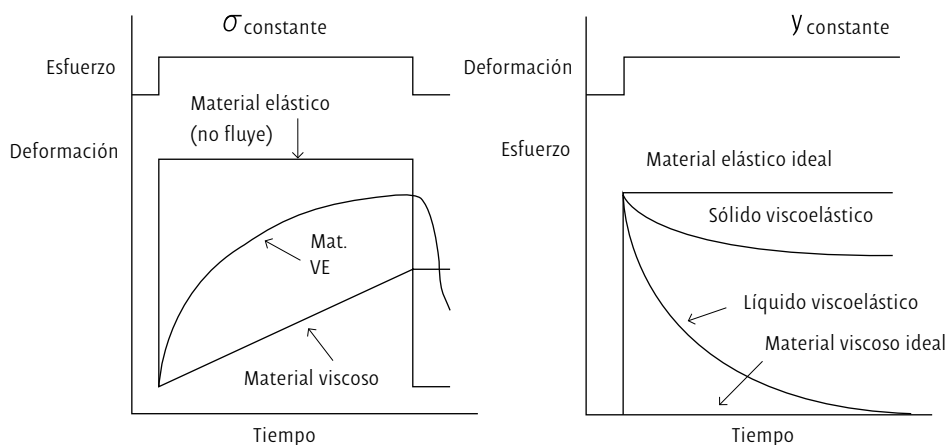


Figura 11.5

Curva de creep y relajación del esfuerzo

Modificado de Steffe, 1996.

Tabla 11.2 Caracterización textual y funcional de algunos quesos frescos tradicionales mexicanos

Tipo de queso	Dureza (mJ)	Masticabilidad (kPa)	Rigidez(Ns)	Fundibilidad (N)
Oaxaca	55-56	130-230	14-33	2.1-2.4
Panela	42-45	47-64	28-52	1.0-1.3
Queso fresco	17-33	19-21	19-28	1.0-1.4
Queso blanco	43-54	52-74	36-56	1.0-1.3

Adaptado de Van Hekken y Farkye, 2003.

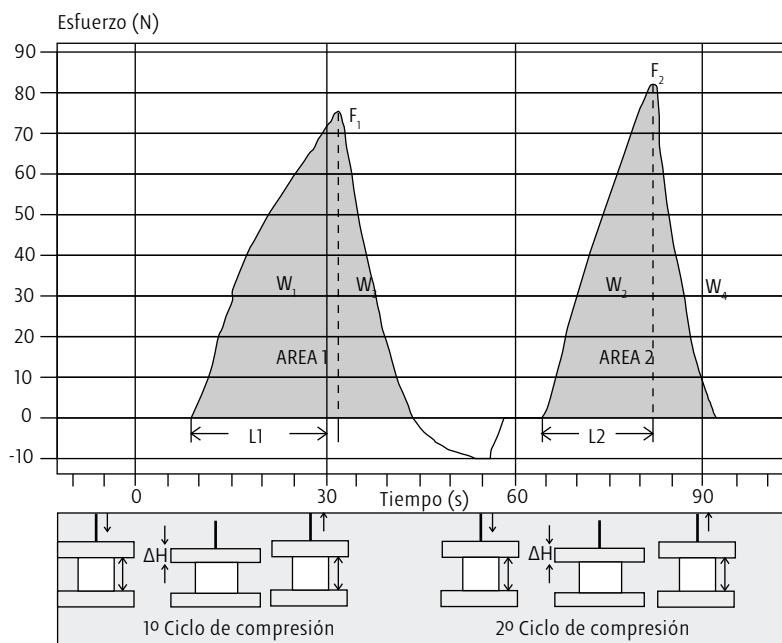


Figura 11.6

Curva típica de TPA

En la cual los parámetros reológicos obtenidos son: la firmeza dada por la fuerza máxima registrada durante el primer ciclo de compresión (F_1), la fuerza máxima durante la compresión en el segundo ciclo (F_2), el trabajo registrado hasta F_1 (W_1) y el trabajo registrado hasta F_2 (W_2). Luego se calculan las siguientes relaciones: cohesividad, que es igual al trabajo durante el primer ciclo de compresión dividido entre el trabajo realizado en el segundo ciclo de compresión ($(W_1+W_3)/8W_2+W_4$), la dureza estimada como el cociente F_2/F_1 , y la elasticidad que es igual al cociente (porcentaje) entre el trabajo recuperado (W_3) y el trabajo total (W_1+W_3) en el primer ciclo de compresión.

Tabla 11.3 Condiciones para la determinación de propiedades texturales en algunos tipos de queso fresco

Prueba textural	Tipo de queso	Geometría de la muestra	Equipo utilizado	Condiciones de la prueba	Parámetros calculados	Referencia
Compresión uniaxial	Queso fresco (sin iniciadores lácticos)	Cilindros de 25 mm de diámetro por 20 mm de altura	TA-TX2 Texture Analyzer ^a	Temperatura: 4 °C % de compresión: 80% con respecto a la altura original. Plato de 50 mm de diámetro. Velocidad: 0.8 mm/s Núm. de mediciones por muestra: 6	Fuerza de fractura(σ) Fuerza de deformación (ϵ_p)	Zamora, 2009
Compresión uniaxial	Queso fresco elaborado con leche de cabra cruda, pasteurizada y tratada por altas presiones	Cubos de 10 mm de cada lado.	TA-TX2 Texture Analyzer ^a	Temperatura: 20 °C 80% de compresión con respecto a su altura original. Velocidad: 80 mm/min=1.3 mm/seg. Núm. de mediciones por muestra: 6 Nota: Las mediciones se realizaron bajo condiciones lubricadas	Fuerza de fractura(σ) Fuerza de deformación (ϵ_p)	Buffa <i>et al.</i> , 2001
TPA	Queso suave de leche de cabra	Bloques cilíndricos de aprox. 14.5 mm de diámetro y altura.	Máquina universal de ensayos (modelo SM-25-155, Material Testing Products Systems Corp., Eden Prairie, MN)	Doble compresión a 75% de su altura original. Velocidad: 100 mm/min. Núm. De mediciones por muestra: 4	A partir de las gráficas de fuerza contra tiempo se calcularon: la dureza, cohesividad y fracturabilidad. Así como la masticabilidad	Van Helkken <i>et al.</i> , 2005

Tabla 11.3 (Continuación)

Prueba textural	Tipo de queso	Geometría de la muestra	Equipo utilizado	Condiciones de la prueba	Parámetros calculados	Referencia
TPA	Queso fresco de México	Cilindros de 15 mm de diámetro y 15 mm de altura	Máquina universal de ensayos Sintech 1/G (MSS Systems, Eden Prairie, MN).	Doble compresión a 75% de su altura original. Velocidad: 100 mm/min= 1.6 mm/s No. de mediciones por muestra: 4	Dureza y cohesividad	Tunicky Van Hekken, 2010
Relajación del esfuerzo	Queso untable	Cubos de 2 cm.	Texture Analyzer TAXT2 ^b empleando el software Texture Expert versión 1.22.	Se utilizó un plato de 3.6 cm de diámetro, se aplicó una fuerza de 0.5 N con 1 mm/s de velocidad, con una deformación del 50%.	Tiempo de relajación	Carvajal-Cuéllar, 2004
Creep	Queso untable	Cubos de 2 cm.	Texture Analyzer TAXT2 ^b empleando el software Texture Expert versión 1.22.	Se utilizó un plato de 3.6 cm de diámetro, se aplicó una fuerza de 0.2 N con una velocidad de 1 mm/s, midiendo distancia contra tiempo.	Deformación como función del tiempo	Carvajal-Cuéllar, 2004
Penetración	Queso crema	Bloques rectangulares de (12 x 6.8 x 3 cm).	TAXT2 Texture Analyzer ^b	Se utilizó una sonda cónica de acero inoxidable con ángulo de 45° (AT-15) la cual se introdujo 15 mm en las muestras a una velocidad de 1 mm/s.	Dureza	Brighenti et al., 2008

Ramírez-López et al., 2012.

11.3 FACTORES QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES DEL QUESO FRESCO

Independientemente del origen de la leche, las propiedades físicas del queso se rigen por la interacción entre las moléculas de caseína (Tunick, 2000). Algunos de los factores que influyen en estas interacciones varían en función del tipo de queso, el grado de maduración (Lucey *et al.*, 2003), su composición química (en particular, el contenido de caseína y la distribución de la humedad y la grasa), el contenido de sal, pH y acidez (Guo *et al.*, 2012; Scholz, 1995), así como determinadas condiciones medioambientales como la temperatura (Johnson y Law, 2011).

11.3.1 Cambios bioquímicos y propiedades fisicoquímicas

En términos generales, se habla de que existen dos fenómenos opuestos que controlan la firmeza del queso. El primero consiste en la acción de las diferentes enzimas proteolíticas sobre la matriz proteica, principalmente sobre la α_{s1} -caseína, que da como resultado una disminución de la firmeza y en consecuencia, modificaciones en algunas propiedades como el color, la elasticidad y la textura del queso (Lawrence *et al.*, 1987; Lucey *et al.*, 2003). El segundo es el efecto de pérdida de humedad, que al provocar una disminución de la hidratación de las proteínas conduce a una mayor interacción de las mismas provocando el aumento de la firmeza de la matriz proteica (Adda *et al.*, 1982; Walstra, 1990).

Otro de los cambios bioquímicos que ocurren en el queso es la lipólisis. En la estructura del queso, la grasa se encuentra distribuida como material de relleno en la matriz proteica, por lo tanto, si se incrementa su contenido en la formulación, el queso presentará menor firmeza y mayor elasticidad, mientras que cuando su contenido se reduzca (ya sea por acción lipolítica o intencional para fines de obtener un producto con bajo contenido en grasa) se obtendrán quesos más duros y rígidos (Theophilou y Wilbey, 2007; Brighenti *et al.*, 2008).

Se reconoce también que el pH es uno de los parámetros que afecta sobre todo las propiedades texturales del queso, debido a su efecto sobre la red de proteínas. Un pH cercano al punto isoeléctrico provoca grandes fuerzas iónicas e hidrófobas, que resultan en una red de caseína compacta típica de los quesos duros; mientras que en el caso de un pH más alto, las caseínas presentan una carga negativa, lo que genera repulsión entre los agregados proteicos, generándose un queso con mayor humedad, más elástico y menos compacto (Watkinson *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2008).

En los quesos frescos, la elevada humedad y el bajo pH, son condiciones que afectan notoriamente la textura y sabor durante la conservación, de forma que una excesiva proteólisis podría ocasionar defectos como una textura excesivamente blanda y un sabor amargo (Fox y McSweeney, 1996). Un ejemplo donde se hace más evidente este defecto es en el queso Oaxaca, que con el tiempo se ablanda, pierde elasticidad y definición visual del hilado, semejante al que se observa en el queso mozzarella (Imm *et al.*, 2003; Zisu y Shah, 2005).

La sal, además de tener un papel en el sabor y conservación del queso, en altas concentraciones disminuye la actividad enzimática proteolítica, aumentando la salida de agua presente en la red proteica de la cuajada (sinéresis), ocasionando con ello menor humedad y, por lo tanto, mayor dureza en el queso (Pinho *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2012).

La acidez, en el queso es otro factor que no sólo tiene incidencia sobre el sabor, sino también directamente en los cambios que experimenta la red de proteína (cuajada) del queso, teniendo ésta una correlación directa en los fenómenos de sinéresis (es decir, a mayor acidez, mayor sinéresis) y textura final (Pinho *et al.*, 2004). Además de la acidez, la sinéresis está afectada también por circunstancias propias del proceso de elaboración y por la presencia de calcio libre, el cual provoca la unión de la caseína en la red protéica de la cuajada (Walstra, 1990).

11.3.2 Condiciones de proceso

No obstante que la composición original del queso es determinante en las características texturales del mismo, otros aspectos como la tecnología aplicada, la adición de cultivos iniciadores y las condiciones de maduración tendrían mayor impacto, determinando con ello la identidad y aceptabilidad del queso (Fox *et al.*, 2000; Walstra *et al.*, 2006; Johnson y Law, 2011).

11.3.2.1 Tratamiento térmico/Pasteurización

Aunque no existe un mecanismo claro, se ha observado que la pasteurización de la leche produce una desnaturalización ligera de las proteínas séricas (α_s y β -caseínas), así como modificaciones leves en la capacidad de coagulación de la leche (Grappin y Beuvier, 1997). Provoca también la disminución significativa de péptidos de cadena corta y aminoácidos libres, compuestos precursores de aromas y sabores en el queso (Tunick y Van Hekken, 2010), lo que origina quesos con alto contenido de humedad con respecto a los elaborados con leche cruda (Ortigosa *et al.*, 2001).

Para evitar los efectos del tratamiento térmico en las proteínas de la leche, se ha investigado la aplicación de altas presiones en queso y su potencial uso en la industria láctea (Buffa *et al.*, 2001; Trujillo *et al.*, 2002; Juan *et al.*, 2007; Evert-Arriagada *et al.*, 2012). Las altas presiones inactivan el crecimiento de los microorganismos presentes en la leche y el queso, asimismo alteran las velocidades de las reacciones enzimáticas (Ávila *et al.*, 2007).

11.3.3 Alteraciones causadas por microorganismos

Como ya se mencionó, las propiedades físicas del queso pueden verse afectadas como consecuencia de procesos bioquímicos, tales como la proteólisis y la lipólisis. Las enzimas involucradas en estos procesos pueden estar presentes en el cuajo, la leche o bien, ser producidas por microorganismos (Sousa *et al.*, 2001).

Algunos microorganismos utilizados como cultivos iniciadores, además de metabolizar la lactosa, pueden producir y liberar otros compuestos en el queso. Jiménez-Guzmán *et al.* (2009), evaluaron la presencia de un exopolisacárido producido por una cepa de *Streptococcus thermophilus* en la composición y propiedades de queso Panela, concluyendo que la presencia de dicho compuesto incrementó la retención de humedad y grasa dentro de la matriz del queso.

El principal mecanismo a través del cual un cultivo iniciador puede afectar las propiedades texturales, reológicas y funcionales del queso, tiene que ver con su capacidad de producción de ácido que, como ya se mencionó, afecta la red proteica y a su capacidad para retener agua. Un aumento en el contenido de humedad provocará una textura más blanda, menor firmeza, y en el caso del queso de pasta hilada, una mayor capacidad de fusión (fundibilidad) (Zisu y Shah, 2005).

11.3.4 Otros factores

El uso de cuajo artesanal da como resultado quesos de mayor dureza (bajo prueba de compresión y penetración), adhesividad y elasticidad con respecto al cuajo comercial (Álvarez, 2003). Esto se puede deber a la mayor capacidad proteolítica del coagulante artesanal frente al comercial, derivando en una mayor cremosidad de este tipo de quesos.

Algunos estudios demuestran que el cambio de dieta del animal lactante modifica la composición de la leche y en consecuencia, puede ocasionar un cambio de leve a moderado en las propiedades reológicas y texturales de queso (Jaramillo *et al.*, 2010; Álvarez, 2003)

Finalmente, la oxidación de las grasas de los quesos es otro fenómeno presente en el queso en mayor o menor extensión. En quesos frescos la exposición a la luz es la causa principal de oxidación, aparición de aromas atípicos (desagradables) y cambios en el color (Mortensen *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

A lo largo de esta revisión se ve la importancia de factores como la composición química y condiciones de proceso, que afectan en menor o mayor medida las propiedades y características que por definición corresponden a los quesos frescos.

La mayoría de las técnicas mencionadas para el análisis de las propiedades de los quesos frescos, han sido estandarizadas y ampliamente aceptadas por la comunidad científica. No obstante, dados los avances tecnológicos en los equipos empleados para la medición de las mismas, éstas se han perfeccionado e inclusive han surgido otras técnicas como la micro-tomografía de rayos X en el caso del análisis de microestructura o los recientes estudios sobre análisis de textura mediante espectroscopía de infrarrojo cercano acoplada a sonda de fibra óptica, cuya aplicación resulta novedosa. Sin embargo, habría que reflexionar sobre el costo-beneficio de dichas técnicas.

Con respecto a las diferentes pruebas que se emplean para evaluar los parámetros texturales y reológicos, una de las ventajas de los métodos reológicos fundamentales, es la posibilidad de evaluar la influencia de modificaciones mínimas a la formulación, mientras que dichas diferencias, cuando son muy pequeñas, no pueden ser detectadas con métodos empíricos o imitativos.

Finalmente se destaca que el conocimiento de las características y propiedades del queso como resultado de su formulación, elaboración y proceso, así como el dominio de las técnicas y métodos para su caracterización, son de gran relevancia no sólo para garantizar su calidad y aceptabilidad; sino también como una herramienta de identidad útil para diferenciar los diversos tipos de quesos frescos.

REFERENCIAS

- Adda, J., Gripon, J.C. y Vassal, L. (1982). «The chemistry of flavour and texture generation in cheese». *Food Chemistry*, 9(1), 115-129.
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. Cuarta edición. Barcelona: Editorial Reverté S.A.
- Álvarez, S. (2003). *Influencia de la alimentación del ganado caprino en la caracterización físico-química y organoléptica del queso Majorero (D.O.)*. (Tesis doctoral). España: Universidad de La Laguna.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis*. 18va Edición. Gaithersburg: AOAC International.
- Ávila, M., Calzada, J., Nuñez, M. y Garde S. (2007). «Effect of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain and high-pressure treatment on the esterase activity and free fatty acids in Hispánico cheese». *International Dairy Journal*, 17, 1415-1423.
- Bohlin, L., Hegg, P.O. y Ljusberg-Wahren H. (1984). «Viscoelastic properties of coagulating milk». *Journal Dairy Science*, 67, 729-734.
- Bourne, M.C. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. 2da Edición. San Diego: Academic Press.
- Brighenti, M., Govindasamy-Lucey, S., Lim K., Nelson, K. y Lucey, J.A. (2008). «Characterization of rheological, textural and sensory properties of samples of commercial US cream cheese with different fat contents». *Journal of Dairy Science*, 91, 4501-4517.
- Buffa, M.N., Guamis, B., Saldo J. y Trujillo, A.J. (2004). «Changes in organic acids during ripening of cheese made from raw, pasteurized or high-pressure treated goat's milk». *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie. Food Science and Technology*, 37(2), 247-253.
- Buffa, M.N., Trujillo, A.J., Pavia, M. y Guamis, B. (2001). «Changes in textural, microstructural, and color characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk». *International Dairy Journal*, 11, 927-934.
- Carvajal-Cuéllar, D.M. (2004). *Estudio del comportamiento fisicoquímico y reológico de un queso untable*. (Tesis de maestría). México: Universidad de las Américas Puebla.
- Caro, I., Franco M.J., Mateo J. y Alonso, C. (1998). *Influencia en la acidificación del queso tipo Oaxaca de la adición de distintas cantidades de*

fermentos mesófilos y termófilos a distintos tiempos de inoculación. XI Congreso Nacional de Microbiología de la SEM. Libro de ponencias, comunicaciones y posters. Pamplona, España.

- Castañeda, R. (2002). «La reología en la tipificación y la caracterización de quesos». *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 20 (26), 48-53.
- Cunha, C.R., Dias, A.I. y Viotto, W.H. (2010). «Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat». *Food Research International*, 43(3), 723-729.
- Dalgleish, D.G. (1999). «The Enzymatic Coagulation of Milk». En: P.F. Fox (Ed). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (pp. 69-100). Volumen 1. Maryland: Aspen Publishers.
- De Oca-Flores, E. M., Castelán-Ortega, O. A., Estrada-Flores, J. G. y Espinoza-Ortega, A. (2009). «Oaxaca cheese: manufacture process and physicochemical characteristics». *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 535-540.
- Eck, A. (2000). What is a cheese? En: A. Eck y J.C. Gilis (Eds). *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance* (pp. 661-662). Lavoisier Publishing.
- Evert-Arriagada, K., Hernández-Herrero, M.M., Juan, B., Guamis, B. y Trujillo, A.J. (2012). «Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life». *Journal of Food Engineering*, 110(2), 248-253.
- FAO/OMS. (2008). *Leche y productos lácteos*. 2ª edición. Norma general del Codex para el queso. Codex Stan 283-1978. Revisión 1999, Enmienda 2006.
- Farkye, N.Y. (2004). «Cheese technology». *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 91- 98.
- Farkye, N.Y., Prasad, B.B., Rossi, R. y Noyes, O.R. (1995). «Sensory and textural properties of Queso Blanco-type cheese influenced by acid type». *Journal of Dairy Science*, 78, 1649.
- Foegeding, E.A. y Drake, M.A. (2007). «Invited Review: Sensory and mechanical properties of cheese texture». *Journal of Dairy Science*, 90, 1611-1624.
- Fox, P.F., Guinne, T.P., Timothy, M.C. y McSweeney P.L.H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 392- 422). Maryland: Aspen Publishers.
- Fox, F.P. y McSweeney P.L.H. (1996). «Proteolysis in cheese during ripening». *Food Reviews International*, 12, 457-509.

- García-Islas, B. (2006). *Caracterización fisicoquímica de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hgo con el fin de proponer normas de calidad*. (Tesis de licenciatura). Estado de Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Grappin, R. y Beuvier, E. (1997). «Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese». *International Dairy Journal*, 7, 751-761.
- Guisa, F.L. (1999). *Types of Mexican cheeses. Exploring cheeses of Mexico and Latin America. Artisan course*. Universidad de Wisconsin, Madison. EE.UU.
- Guo, L., Van Hekken, D.L., Tomasula, P.M., Tunick, M.H. y Huo, G. (2012). «Effect of salt on microbiology and proteolysis of Queso Fresco cheese during storage». *Milchwissenschaft*, 67, 74-77.
- Gunasekaran, S. y Ak, M.M. (2003). *Cheese Rheology and Texture*. Nueva York: CRC Press.
- Hwang, C.H. y Gunasekaran, S. (2001). «Measuring crumbliness of some commercial Queso Fresco-type Latin American cheeses». *Milchwissenschaft*, 56, 446-450.
- Ibáñez, F. C., Loygorri, S., Ordoñez, A. y Torre I.P. (1998). «Evaluación instrumental y sensorial de la textura en quesos de oveja con denominación de origen». *Alimentaria*, 292, 49-53.
- Imm, J.Y., Oh, E.J., Han, K.S., Park, Y.W. y Kim S.H. (2003). «Functionality and physico-chemical characteristics of bovine and caprine Mozzarella cheeses during refrigerated storage». *Journal of Dairy Science*, 86, 2790-2798.
- Jaramillo, D.P., Buffa, M., Rodríguez, I., Pérez-Baena, I., Guamis, B. y Trujillo, A.J. (2010). «Effect of the inclusion of artichoke silage in the ration of lactating ewes on the properties of milk and cheese characteristics during ripening». *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1412-1419.
- Jiménez-Guzmán, J., Flores-Nájera, A., Cruz-Guerrero, A.E. y García-Garibay, M. (2009). «Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese». *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie-Food Science and Technology*, 42, 1508-1512.
- Johnson, M. y Law, B.A. (2011). The fundamentals of cheese technology. En: B.A. Law y A.Y. Tamime (Eds.). *Technology of cheesemaking*. Segunda edición. Reino Unido: Wiley Blackwell.

- Juan, B., Trujillo, A.J., Guamis, V., Buffa M. y Ferragut, V. (2007). «Rheological textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewe's milk cheese». *International Dairy Journal*, 17, 248-254.
- Karami, M., Ehsani M.R., Mousavi S.M., Rezaei K. y Safari M. (2009). «Microstructural properties of fat during the accelerated ripening of ultrafiltered-Feta cheese». *Food Chemistry*, 113(2), 424-434.
- Kilcast, D. (2004). *Texture in Foods. Solid Food (205-236)*. Vol. 2. Nueva York: CRC Press.
- Kuo, M.I. y Gunasekaran, S. (2003). «Effect of frozen storage on physical properties of pasta filata and non-pasta filata Mozzarella cheeses». *Journal of Dairy Science*, 86, 1108-1117.
- Kuo, M.I. y Gunasekaran, S. (2009). «Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses». *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie- Food Science and Technology*, 42(1), 9-16.
- Laverse, J., Mastromatteo, M., Frisullo, P. y Del Nobile, M.A. (2011). «X-ray microtomography to study the microstructure of cream cheese-type products». *Journal of Dairy Science*, 94(1), 43-50.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K. y Gilles, J. (1987). «Syposium: cheese ripening technology. Texture development during cheese ripening». *Journal of Dairy Science*, 70(8), 1748-1760.
- Liu, H., Xu, M.X. y Guo, S.D. (2008). «Comparison of full-fat and low-fat cheese analogues with or without pectin gel through microstructure, texture, rheology, thermal and sensory analysis». *International Journal of Food Science and Technology*, 43(9), 1581-1592.
- Lobato-Calleros, C., Reyes-Hernández, J., Beristain, C.I., Hornelas-Uribe, Y., Sánchez-García, J.E. y Vernon-Carter, E.J. (2007). «Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat». *Food Research International*, 40, 529-537.
- Lu, N., Shirashoji, N. y Lucey, J.A. (2008). «Effects of pH on the textural properties and meltability of pasteurized process cheese made with different types of emulsifying salts». *JFS: Food Engineering and Physical Properties*, 73(8), E363-E369.
- Lucey, J.A., Johnson, M.E. y Horne, D.S. (2003). «Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese». *Journal Dairy Science*, 86, 2725-2743.

- McSweeney, P.L.H. (2004). «Biochemistry of cheese ripening». *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- Morales-Celaya, M.F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J. y Vernon-Carte, E.J. (2012). «Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese». *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie: Food Science and Technology*, 45(2), 132-141.
- Mortensen, G., Bertelsen, G., Mortensen, B.K. y Stapelfeldt, H. (2004). «Lighth-induced changes in packaged cheeses -a review». *International Dairy Journal*, 14, 85-102.
- Muller, H.G. (1973). *An introduction to Food Rheology*. Londres: William Heineman Ltd.
- NOM-121-SSA1-1994. *Norma oficial. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias para lácteos y sus derivados*.
- Path, J. (1991). «Hispanic cheeses: A promising new market for the specialty cheesemaker». *UW Dairy Pipeline*, 3(4), 1-4.
- Pavia, M., Trujillo, A.J., Guamis, B. y Ferragut, V. (1999). «Evolución de la composición y textura de un queso de oveja en la maduración». *Alimentaria*, 306, 43-47.
- Pereira, C.I., Gomes, A.M.P. y Malcata, F.J. (2009). «Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations». *Trends in Food Science and Technology*, 20 (5), 213-219.
- Pinho, O., Mendes, E., Alves, M.M., Ferreira, IMPLVO. (2004). «Chemical, physical, and sensorial characteristics of "Terrincho" ewe cheese: Changes during ripening and intravarietal comparison». *Journal of Dairy Science*, 87(2), 249-257.
- Ortigosa, M., Torre, P. y Izco, J.M. (2001). «Effect of pasteurization of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of roncal cheese». *Journal of Dairy Science*, 8(6), 1320-1330.
- Ribero, G.G., Rubiolo, A.C. y Zorrilla, S.E. (2009). «Microstructure of Mozzarella as affected by the immersion freezing in NaCl solutions and by the frozen storage». *Journal of Food Engineering*, 91, 516-520.
- Rosenthal, A.J. (1999). «Relation between instrumental and sensory measures of food texture». En: A.J. Rosenthal (Ed). *Food texture, measurement and perception*. Nueva York: Aspen Publishers Inc.

- Scholz, W. (1995). *Elaboración de quesos de oveja y de cabra*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Scott, R., Robinson, R.K. y Wilbey, R.A. (1998). «Cheese varieties». En: R. Scott, R.K. Robinson y R.A. Wilbey (Eds.). *Cheesemaking Practice*, Tercera edición. Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Segards, R.A. y Kapsalis, J.G. (1987). «Texture, rheology, psychophysics». En: J.G. Kapsalis (Ed.). *Objective methods in food quality assessment* (155-184). Nueva York: CRC Press.
- Shoemaker, C.F., Lewis, J.I. y Tamura, M.S. (1987). «Instrumentation for rheological measurements of food». *Food Technology*, 41, 80-84.
- Sousa, M.J., Ard, Y. y McSweeney, P.L.H. (2001). «Advances in the study of proteolysis during cheese ripening». *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Steffe, J. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Segunda edición. Michigan: Freeman Press.
- Tabilo-Munizaga, G. y Barbosa-Cánovas, G. (2005). «Rheology for food industry». *Journal of Food Engineering*, 67, 147-156.
- Tan, Y.L., Ye, A.A., Singh, H. H. y Hemar, Y.Y. (2007). «Effects of biopolymer addition on the dynamic rheology and microstructure of renneted skim milk systems». *Journal of Texture Studies*, 38(3), 404-422.
- Theophilou, P. y Wilbey, R.A. (2007). «Effects of fat on the properties of halloumi cheese». *International Journal of Dairy Technology*, 60(1), 1-4.
- Trivedi, D., Bennett, R.J., Hemar, Y., Reid, D.W., Lee, S. e Illingworth, D. (2008a). «Effect of different starches on rheological and microstructural properties of (I) model processed cheese». *International Journal of Food Science and Technology*, 43(12), 2191-2196.
- Trivedi, D., Bennett, R.J., Hemar, Y., Reid, D.W., Siew, K.L. e Illingworth, D. (2008b). «Effect of different starches on rheological and microstructural properties of (II) commercial processed cheese». *International Journal of Food Science and Technology*, 43 (12), 2197-2203.
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R. y Guamis, B. (2002). «Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review». *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 295-307.

- Tunick M.H. (2000). «Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture». En: Symposium: Dairy products rheology. *Journal of Dairy Science*, 83, 1892-1898.
- Tunick, M.H. y Van Hekken, D.L. (2010). «Rheology and texture of commercial queso fresco cheeses made from raw and pasteurized milk». *Journal of Food Quality*, 33, 204-215.
- Udayarajan, C. (2007). *Relating physicochemical characteristics of cheese to its functional performance*. (Tesis doctoral). (PhD of Philosophy Food Science). EE.UU.: Universidad de Wisconsin-Madison.
- Van Hekken, D.L. y Farkye, N. (2003). «Hispanic Cheeses: The quest for queso». *Food Technology*, 57, 32-38.
- Van Hekken, D.L., Tunick, M.H. y Park, Y.W. (2005). «Effect of frozen storage on the proteolytic and rheological properties of soft caprine milk cheese». *Journal of Dairy Science*, 88, 1966-1972.
- Vélez-Ruiz, J.F. y Barbosa-Cánovas, C.G. (1997). «Rheological properties of selected dairy products». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 311-359.
- Vélez-Ruiz, J.F. (2009). «Rheology and Texture of Cheese». En: M.E. Sosa-Morales y J.F. Vélez-Ruiz (Eds.). *Food Processing and Engineering Topics* (87-122). Nueva York: Ed. Nova Science Publishers.
- Walstra, P. (1990). «On the stability of casein micelles». *Journal of Dairy Science*, 73, 1965-1979.
- Walstra P., Wouters J.T.M. y Geurts T.J. (2006). *Dairy Science and Technology* (140-155). Nueva York: CRC Press.
- Watkinson P., Coker C., Crawford R., Dodds C., Johnston K., McKenna A. y White N. (2001). «Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis». *International Dairy Journal*, 11, 455-464.
- Zamora A. (2009). *Ultra high pressure homogenisation of milk: Effects on cheese making*. (Tesis doctoral). Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Zisu B. y Shah N.P. (2005). «Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter». *International Dairy Journal*, 15, 957-972.

12



Efecto de la incorporación de estabilizantes en la viscosidad de bebidas lácteas no fermentadas

M. O. Ramírez-Sucre y J. F. Vélez-Ruiz

La leche es uno de los alimentos más nutritivos, ya que está compuesta principalmente por agua, lactosa, materia grasa, proteínas y otros nutrientes como vitaminas y minerales. La leche proveniente de la vaca es la más importante para la dieta humana y la que tiene más aplicaciones industriales (Badui, 2006). El consumo de productos lácteos también ha experimentado, desde la década de 1950, un considerable crecimiento en la demanda mundial que ha llevado a la industria a superar retos tecnológicos importantes (Saxelin *et al.*, 2003).

Las últimas tres décadas de desarrollo en la ciencia y la tecnología dedicada a la leche y los productos lácteos, han dado lugar a importantes avances en la mecanización, la automatización, la higiene en la planta, la calidad y la seguridad, la ampliación de la vida útil, y la introducción de nuevos productos que han traído variedad y conveniencia para el consumidor. El consumidor se ha beneficiado enormemente, en especial por la mejora de la calidad y la vida útil de la leche y la diversidad de productos lácteos. Estos treinta años se han caracterizado por la consolidación de la industria de la leche y los productos lácteos. De los 74.3 mil millones de litros de leche producida en los Estados Unidos en 2003, el 39% se consumió como leche fluida. En Canadá, la producción de leche en 2002 se situó en 7.4 mil millones de litros y un 38% se vendió como leche fluida. En 2002, México ocupó el décimo tercer lugar del mundo con un total de leche producida de 9,542 millones de litros. Actualmente, las plantas de producción de leche pasteurizada y las bebidas afines generan volúmenes de hasta 200,000 L/h (Goff y Griffiths, 2006).

Los productos lácteos se pueden dividir en productos sólidos y bebidas lácteas. Las bebidas lácteas son el grupo de alimentos procesados derivados de la leche, cuya consistencia es líquida o semilíquida y que son altamente perecederos. Las bebidas lácteas pueden presentarse en formas fermentadas como el yogur y el kéfir, así como en formas no fermentadas como leches funcionales y leches saborizadas. El desarrollo de nuevas bebidas lácteas es una alternativa a la producción de leche fluida cruda, ya que como mencionan Yanes *et al.* (2002), las bebidas lácteas saborizadas para consumo directo son comunes en muchos países y su consumo se fortalece en grupos de personas como jóvenes y ancianos. Varias de las propiedades de estas bebidas han sido modificadas, adicionando fibra, calcio, vitaminas, minerales, ácido linoleico, distintas cepas microbianas (probióticos), prebióticos (fructo-oligosacáridos), distintos tipos de frutas con altos contenidos de antioxidantes, carotenoides, flavonoides y antocianinas, entre otros.

Aunque todas las propiedades fisicoquímicas de estas bebidas, tales como color, densidad, acidez, entre otras, son muy importantes, una de las principales es su consistencia, misma que puede ser expresada a partir de la viscosidad. La viscosidad es una propiedad física de gran importancia en etapas de control de calidad de ingredientes y producto terminado; en el diseño y evaluación de procesos y para el desarrollo de alimentos debido a que tienen gran impacto en la aceptabilidad del producto por parte del consumidor.

Existen muchas bebidas lácteas en las cuales la viscosidad es afectada por la adición de distintos ingredientes y/o aditivos, entre los que destacan las gomas (Villegas y Costell, 2007; Villegas, 2008; Tárrega *et al.*, 2005).

De aquí que el objetivo de este artículo sea hacer una revisión de estudios en los que se haya evaluado la adición de estabilizantes en la viscosidad de bebidas lácteas no fermentadas.

12.1 BEBIDAS LÁCTEAS Y PROPIEDADES REOLÓGICAS

Las bebidas lácteas se pueden dividir en dos grandes grupos: fermentadas o no fermentadas. Las bebidas lácteas fermentadas son productos líquidos en los que la acción de las bacterias ácido lácticas contribuye de manera sobresaliente en las características de dichas bebidas. El efecto de las bebidas lácteas fermentadas en el organismo humano es restablecer y fortalecer la flora intestinal; además, el proceso de fermentación incrementa la vida útil del lácteo y le proporciona características sensoriales diferentes y agradables.

Por otro lado, las bebidas lácteas no fermentadas son productos derivados de la leche, a los que se les ha modificado el contenido graso, el valor nutricional o el sabor, entre otras características. Entre estos productos están las leches funcionales y las leches saborizadas.

La industria de los productos lácteos está interesada en la incorporación de ciertos elementos, tales como nutrientes, microorganismos y sabores a los productos de la leche, ya que actualmente la fortificación, la funcionalidad y la búsqueda de satisfacción del consumidor son una práctica común (Aportela-Palacios *et al.*, 2005).

Mientras que las leches saborizadas se comercializan con sabores como fresa, chocolate, vainilla (vainillina), entre otros, con el objeto de hacer la ingesta de la leche más atractiva a ciertos sectores de la población, las leches funcionales son aquellas cuyo contenido nutricional natural ha sido alterado de forma artificial con el objeto de que el producto cubra ciertas carencias nutricionales (Madrigal y Sangronis, 2007).

Por otra parte, las bebidas lácteas de diferentes sabores para el consumo directo son comunes en muchos países. Sus características nutricionales y sensoriales, así como su conveniencia, mayormente cuando se presentan en empaques individuales, favorecen su consumo por grupos de personas como los jóvenes y los ancianos. Las más populares son las bebidas de chocolate. Básicamente son formuladas con leche, glucosa, polvo de cacao y algunos hidrocoloides; éstos últimos son adicionados para mejorar la consistencia y prevenir la se-

dimentación de partículas de cacao. Los sólidos lácteos también son incluidos con frecuencia. Las características particulares de los diferentes ingredientes como el contenido de grasa de la leche, la alcalinidad y el color del polvo de cacao, el tipo y la concentración del hidrocoloide, producen diferencias notables en la composición final y en las propiedades físicas y sensoriales específicas de los productos formulados (Yanes *et al.*, 2002).

En la literatura se encuentran referencias que señalan la dependencia de las propiedades sensoriales de estos productos de los factores composicionales, como el contenido de grasa en la leche (Raats y Shepherd, 1992), el contenido de hidrocoloides, la glucosa y el polvo de cacao (Folkenberg *et al.*, 1999; Houg y Sánchez, 1998). Los efectos del contenido de grasa en el color y la viscosidad y el efecto de los hidrocoloides en las propiedades de flujo, han sido estudiados en leche, el mayor componente de estas bebidas (Langendorff *et al.*, 2000).

El conocimiento de las propiedades reológicas de los productos lácteos es esencial para el manejo del material, para el diseño y operación del equipo de proceso utilizado en la industria y también debido a la relación que tienen con las propiedades sensoriales. Algunos productos lácteos, cuando se someten a deformación, exhiben «adelgazamiento», aparentemente debido al rompimiento en su estructura. Sin embargo, la estructura puede reconformarse con el tiempo, cuando al producto se le permite asentarse, y exhibe un comportamiento tixotrópico, una característica de muchos productos alimenticios (Awadhal y Singh, 1985).

La reología de los productos lácteos ha sido estudiada en forma limitada. En ciertas condiciones, como velocidad moderada de deformación, contenidos de grasa por debajo del 40% y temperaturas sobre los 40 °C, a la que la grasa es líquida y no existe coagulación por enfriamiento. La leche bronca, la leche concentrada y la crema son fluidos con propiedades reológicas newtonianas. Sin embargo, estos productos lácteos exhiben propiedades reológicas no newtonianas, sobre todo cuando las cremas se mantienen en condiciones por debajo de los 40 °C y pequeñas velocidades de deformación (Fox y McSweeney, 1998). La leche condensada y endulzada, la crema y el yogurt muestran

comportamiento tixotrópico, es decir, su viscosidad aparente está inversamente relacionada con las velocidades de deformación. La leche concentrada, mantequilla, helado, yogurt y queso son productos que pueden expresar propiedades viscoelásticas (Vélez-Ruiz y Barbosa-Cánovas, 1997; Penna *et al.*, 2001).

12.2 AGENTES ESTABILIZADORES

Los agentes estabilizadores mejoran el cuerpo y la viscosidad de los productos lácteos. Estos estabilizadores incluyen compuestos como almidón, carragenina, garrofín, goma xantana, goma guar, pectina, inulina, entre otros (Silverson, 2009). A continuación se presentan las características de algunos, mismos que fueron seleccionados debido a su amplia utilización en la industria láctea (carragenina) o la adición de otras propiedades como la dulzura (inulina) o a su bajo costo de producción (almidón), además de sus características de agentes estabilizadores modificadores de la viscosidad.

12.2.1 Almidón

El almidón es un polisacárido de reserva alimenticia predominante en las plantas, que proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. Tanto el almidón como los productos de la hidrólisis del almidón, constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual. Tanto los almidones nativos como los almidones modificados, tienen un número enorme de posibles aplicaciones en los alimentos, que incluyen las siguientes: adhesivo, ligante, enturbiantes, formador de películas, estabilizante de espumas, agente anti-envejecimiento de pan, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante. Los almidones nativos y modificados se usan comúnmente en los productos lácteos, porque incrementan la viscosidad, mejoran la palatabilidad y evitan la pérdida del suero de leche.

Cuando se usa solo o como parte de una mezcla de estabilizadores, el almidón es un buen agente espesante debido a su textura cremosa, la facilidad de procesamiento y bajo costo en comparación con otros hidrocoloides (Foss, 2009). En sistemas con almidón, la interacción con los componentes de la leche puede afectar a la estructura del sistema, influyendo tanto en sus propiedades de flujo como viscoelásticas, dependiendo de la naturaleza del almidón (Tárrega *et al.*, 2005).

12.2.2 Carrageninas

Las carrageninas pertenecen al grupo de los polisacáridos sulfatados lineales aniónicos. Se componen de residuos de D-galactopiranosos ligados por enlaces alternados α (1-3) y β (1-4). Existen tres tipos principales de carrageninas: λ , ι y κ .

Su capacidad de formación de gel se atribuye al hecho de que son capaces de combinarse en doble hélice, para formar enlaces cruzados entre las moléculas en una red tridimensional. La λ -carragenina no forma geles, sólo provoca un aumento de la viscosidad de las soluciones acuosas. Las interacciones entre la carragenina y las proteínas de leche han sido estudiadas en detalle en vista de su amplia aplicación en la industria láctea (Shchipunov y Chesnokov, 2003).

La funcionalidad de la κ -carragenina en sistemas de producción lechera ha sido bien conocida y estudiada por muchos años. En leche tiene la capacidad para inhibir la separación de fases entre las proteínas de la leche y los polisacáridos, aún en concentraciones muy bajas (< 200ppm) (Vega *et al.*, 2004).

Cuando las partículas se hidratan en una dispersión de carragenina, la viscosidad aumenta debido a que las partículas hidratadas ofrecen más resistencia al flujo. Las soluciones muy diluidas, con niveles de alrededor de 200 ppm de carragenina, se usan para estabilizar las leches de chocolate y otras bebidas lácteas.

Algunos de los primeros usos de la carragenina se encuentran en geles de leche y flanes, y en la estabilización de la leche evaporada y mezclas de helado. En estas aplicaciones, la κ -carragenina forma un gel débil en la fase acuosa que también interactúa con los aminoáci-

dos de las proteínas de la superficie de las micelas de caseína. Niveles muy bajos de carragenina (150-250 ppm) son suficientes para evitar la separación de suero de leche durante la fabricación y el almacenamiento de una amplia gama de productos lácteos. Éstos incluyen el helado y batidos de leche, queso crema y postres lácteos. En las leches de chocolate, este bajo nivel de carragenina es capaz de evitar la separación de fases y generar una red que mantiene las partículas de cacao en suspensión. El amplio espectro de propiedades espesantes y gelificantes de la carragenina, hace que su uso sea extenso en una amplia gama de productos lácteos (Imeson, 2000).

12.2.3 Inulina

La inulina es un compuesto que se encuentra de manera natural en muchas especies vegetales y que actualmente se produce a escala comercial por extracción a partir de la raíz de la achicoria. La inulina nativa es una mezcla de cadenas de oligómeros y polímeros con un número variable de moléculas de fructosa, unidas por enlaces β (2 \rightarrow 1), que suele incluir en su extremo una molécula de glucosa (Villegas, 2008). La inulina y sus derivados ofrecen múltiples usos como ingredientes en la formulación de productos, ya que tienen la capacidad de formar geles, actúan como agentes emulgentes, como edulcorantes, como sustitutos de grasas, y son capaces de modificar la viscosidad. El grado de polimerización de la inulina es variable, y determina sus propiedades fisicoquímicas y sus aplicaciones como ingrediente en las formulaciones alimenticias (Madrigal y Sangronis, 2007). La inulina de cadena corta u oligofructosa es mucho más soluble y más dulce que la inulina nativa, con un perfil de dulzor similar al de la sacarosa y menor contenido calórico (4200-8400 kJ/kg), aunque con un poder edulcorante inferior (30-35%). Puede ser útil para reemplazar parcialmente a la sacarosa de una formulación o sustituirla totalmente cuando se combina con otros edulcorantes calóricos. La inulina de cadena larga, con grado de polimerización alto (22-25), es más estable térmicamente, menos soluble y más viscosa que la nativa (Wada *et al.*, 2005), y tiene una capacidad como sustituto de grasa, que es prácti-

camente el doble que la de la inulina nativa (Coussement, 1999). Sus propiedades como sustituto de grasa se atribuyen a su capacidad para formar microcristales que interactúan entre sí formando pequeños agregados que atrapan gran cantidad de agua, originando una textura cremosa y fina que proporciona una sensación bucal similar a la de la grasa (Bot *et al.*, 2004). En fórmulas de leche de chocolate, la adición de inulina aumenta la viscosidad (Tungland y Meyer, 2002); además, incrementa la dulzura, la oscuridad, el espesor y la cremosidad, y reduce al mínimo la sedimentación de partículas de cacao (Abd, 2009).

Otros agentes estabilizantes como el garrofin, alginatos, goma xantana, goma guar y pectina también se utilizan en bebidas lácteas siendo su efecto estabilizante similar al de la carragenina, almidón o inulina; sin embargo, son utilizados con menor frecuencia.

12.3 LECHE ESTABILIZADA

En las leches con sabor pueden utilizarse una gran variedad de estabilizadores. La leche más comercial es la de sabor chocolate y se estabiliza con carragenina, otras gomas, y almidón de maíz (Krautheim, 2008).

En la figura 12.1 se muestra la viscosidad de dispersiones de tres tipos de almidón que fueron agregados a la leche. Como se esperaba, la viscosidad de la dispersión se incrementó con el aumento de la concentración del almidón, debido, probablemente, al aumento de la fracción volumétrica de los gránulos de almidón en la dispersión. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de almidón y su efecto viscoso (Tárrega *et al.*, 2005). Los altos valores de viscosidad obtenidos son atribuibles a la viscosidad de la fase continua (leche), debido a la presencia de las caseínas, lactoglobulinas, grasa y otros componentes de la leche y a las posibles interacciones entre estos componentes y el almidón (Vélez-Ruiz y Barbosa, 1997).

Abu-Jdayil *et al.* (2004) estudiaron el efecto de dispersiones de almidón de trigo en la viscosidad de leche y encontraron que, además de presentar un aumento en la viscosidad aparente, el efecto se hizo más pronunciado con el aumento del contenido graso de la leche.

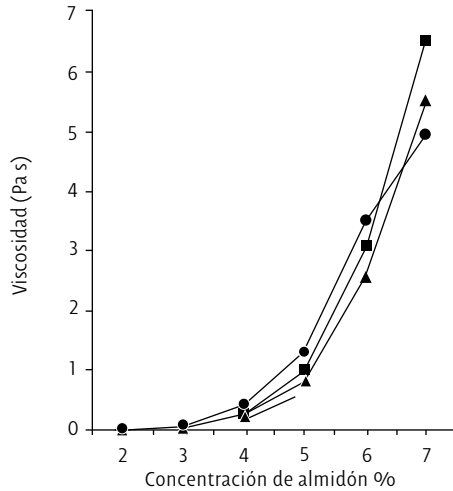


Figura 12.1

Viscosidad de leche adicionada como función de la concentración de almidón: hidroxipropilado de maíz (■), acetilado de maíz (●), hidroxipropilado de tapioca (▲)

Adaptada de Tárrega *et al.*, 2005.

El comportamiento reológico de mezclas de proteínas de leche comercial con κ -carragenina en solución acuosa, fue estudiado por Hemar *et al.* (2002) con cuatro fuentes de proteína de leche: leche descremada en polvo, concentrado de proteína de leche, caseinato de sodio, y proteína de suero. Para concentraciones de κ -carragenina de hasta 0.5%, la viscosidad de la mezcla se incrementó notablemente a bajas velocidades de deformación con la adición de leche descremada en polvo y concentrado de proteína de leche, pero no cambió con la adición de caseinato de sodio o proteína de suero de leche. Para κ -carragenina con concentraciones de 1 a 2.5%, las mediciones reológicas mostraron que se mejoró notablemente la resistencia de los geles.

Anderson *et al.* (2002) encontraron que la viscosidad en leche descremada con adición de carragenina aumentó significativamente a distintos niveles de concentración (0.005, 0.01, 0.02, o 0.04%), como se esperaba. En otro estudio de Tijssen *et al.* (2007), la viscosidad de la leche descremada aumentó con la adición de carragenina, de 0.008 a 0.06 Pa s.

En la figura 12.2 se presenta el efecto de la adición de κ -carragenina en las propiedades reológicas de soluciones a 25 °C, que contienen 40% de sustitutos de azúcar. En estos sistemas se encontró que la κ -carragenina es un factor efectivo de control de la viscosidad aparente, ya que dicho parámetro se incrementa proporcionalmente con la concentración de la goma (Ozdemir y Hasan, 1998).

En un estudio de Villegas (2008), se adicionaron tres tipos de inulina a la leche para conocer el efecto de la longitud de ésta en la viscosidad. La inulina de longitud de cadena larga fue la que proporcionó los mayores incrementos de viscosidad instrumental, seguida de la inulina de cadena corta y de la inulina nativa. Paralelamente, se puso de manifiesto que la capacidad de la inulina como sustituto de grasa dependía no sólo de la longitud media de las cadenas, sino también de la concentración de inulina añadida.

En la figura 12.3, Villegas y Costell (2007) presentan el efecto de la inulina sobre la viscosidad de leche. En este estudio no se observaron diferencias significativas entre la viscosidad de las muestras con concentraciones de inulina menores al 6%; sin embargo, se detectaron diferencias significativas en la viscosidad de la leche adicionada con concentraciones de 8 y 10% de inulina. El incremento de las concentraciones de inulina aumentó significativamente la viscosidad; este efecto resultó más acusado en los sistemas con inulina de cadena larga.

Villegas (2008) concluyó que es necesario añadir inulina de cadena larga en concentraciones de más del 8% a la leche baja en grasa, a fin de obtener bebidas con viscosidad y cremosidad similares a las percibidas en las bebidas elaboradas con leche entera. En concentraciones más bajas (6 y 8%), los tres tipos de inulina estudiados tienen una viscosidad significativamente menor que la correspondiente a la leche entera. Independiente del grado de polimerización, cuando una

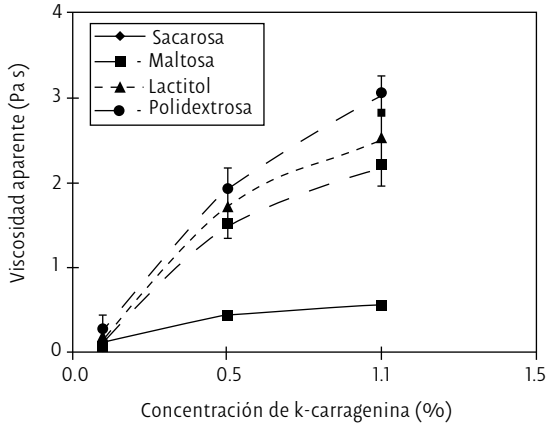


Figura 12.2

Relación entre viscosidad aparente y la concentración de κ -carragenina a velocidad de deformación constante (30rpm)

Adaptada de Ozemir y Hasan, 2007.

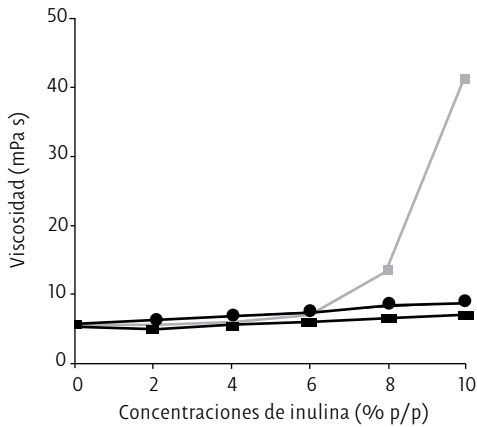


Figura 12.3

Viscosidad de leche con inulina de cadena corta (●), nativa (■) y de cadena larga (■)

Adaptada de Villegas y Costell, 2007.

concentración de 6% de inulina se ha añadido a la leche descremada, la leche se percibe menos viscosa y menos cremosa que la leche entera. Al añadirse diferentes tipos de inulina con una concentración del 8%, la leche baja en grasa se percibe menos viscosa que la leche entera. La influencia de la longitud de la cadena sobre el potencial de sustitución de grasa de la inulina en bebidas, se acentuó con el aumento de la concentración hasta el 10%. La viscosidad de la muestra con el 10% de inulina de cadena larga no difirió de la viscosidad de la muestra con la leche entera.

Entonces el efecto de la adición de inulina en el comportamiento reológico de la leche y de leche con κ -carragenina, depende claramente del contenido de materias grasas lácteas y de la longitud de la cadena de inulina en función de la concentración añadida.

La adición de inulina con los diferentes grados de polimerización en una concentración suficientemente alta, aumenta la viscosidad aparente de la leche. Mientras que el comportamiento de la viscosidad de leche adicionada con almidón, principalmente depende tanto del tipo de almidón como de la fracción volumétrica de los gránulos, lo cual se puede atribuir al aumento en la rigidez de los gránulos de almidón.

Tanto el almidón como la inulina son agentes que confieren consistencia a la leche; no obstante, la inulina es un agente que no sólo confiere estabilidad sino también sabor a las bebidas lácteas. Aunque este compuesto afecta el sabor de la leche, este atributo se ha modificado más claramente mediante la adición de distintos ingredientes como chocolate, vainilla, etcétera.

Por otro lado, Preston (2007) encontró que otro aditivo, la miel, puede utilizarse en la leche de chocolate mejorando su sabor y viscosidad. Los cambios de la viscosidad en almacenamiento de esta bebida láctea tuvieron valores desde 496.52 mPa s hasta 537.63 mPa s en un lapso de catorce días, mejorando la viscosidad de la leche de chocolate comercial (525 mPa s). Diversos azúcares, jarabes y mezclas de edulcorantes artificiales se utilizan de igual manera en el mejoramiento del sabor y de la consistencia de bebidas lácteas.

CONCLUSIONES

Las bebidas lácteas no fermentadas son de gran importancia a nivel mundial debido al incremento en su consumo, por lo que el mejoramiento de la consistencia mediante la modificación de la viscosidad con diferentes agentes estabilizantes es una práctica que se desarrolla actualmente.

La viscosidad es una propiedad de suma importancia en la caracterización de productos alimenticios y por ende de productos lácteos, por lo cual se han encontrado nuevos aditivos que han mejorado esta propiedad. Ejemplos de estos aditivos son la inulina, el almidón y la carragenina, que se han agregado a bebidas lácteas no fermentadas y que al mejorar la consistencia, han mejorado también su aceptabilidad por parte del consumidor.

Existen aún muchos aditivos por estudiar, que modifiquen la viscosidad de bebidas lácteas. Aditivos innovadores que podrían corregir la consistencia, sin modificar otras propiedades fisicoquímicas.

REFERENCIAS

- Abd, E. A. (2009). «Optimization of a new version of chocolate milk for endurance performance and postexercise». *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(4), 482-489.
- Abu- Jdayil, B., Mohameed, H. y Eassa, A. (2004). «Rheology of wheat starch-milk-sugar systems: effect of starch concentration, sugar type and concentration, and milk fat content». *Journal of Food Engineering*, 64, 207-212.
- Aportela-Palacios, A., Sosa-Morales, M. E. y Vélez-Ruiz, J. F. (2005). «Rheological and physicochemical behavior of fortified yogurt, with fiber and calcium». *Journal of Texture Studies*, 36, 333-349.
- Awadhal, N. K. y Singh, C. P. (1985). «A rheological model for milk products». *Journal of Food Science*, 50, 1611-1614.

- Anderson, A.D., Daubert, C.R. y Farkas B.E. (2002). «Rheological characterization of skim milk stabilized with carrageenan at high temperatures». *Journal of Food Science*, 67(2), 649-652.
- Badui, D. S. (2006). *Química de los alimentos*. Editorial Pearson.
- Bot, A., Erle, U., Vreeker, R. y Agterof, W.G. (2004). «Influence of crystallization conditions on the large deformation rheology of inulin gels». *Food Hydrocolloids*, 18(4), 547-556.
- Coussement, P.A. (1999). «Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status». *American Society for Nutritional Sciences*, 129, 1412-1417.
- Folkenberg, D. M., Bredie, W. L. y Martens, M. (1999). «What is mouthfeel? Sensory- rheological relationships in instant hot cocoa drinks». *Journal of Sensory Studies*, 14, 181-195.
- Foss, J. W. (2009). *How processing affects starch selection for yogurt*. En línea: Obtenido el 5 de junio de 2009 desde: http://eu.foodinnovation.com/pdfs/process_yogurt.pdf
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. EE.UU.: Blackie Academic and Professional.
- Goff, H. D. y Griffiths. (2006). Major advances in fresh milk and milk products: fluid milk products and frozen desserts. *Journal of Dairy Science*, 89, 1163-1173.
- Hemar, Y. Hall, C. E., Munro, P. A. y Singh, H. (2002). Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milk protein products. *International Dairy Journal*, 12(4), 371-381.
- Hough, G. y Sánchez, R. (1998). «Descriptive analysis and external preference mapping of powdered chocolate milk». *Food Quality and Preference*, 9(4), 197-204.
- Imeson, A. P. (2000). «Carrageenan». En: G.O. Phillips y P.A. Williams. *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Krauthaim, A. (2008). *Formulating reduced calorie / reduced sugar flavored milks*. National dairy council. En línea: Obtenido el 1 de marzo de 2009 desde: <http://www.innovatewithdairy.com/NR/rdonlyres/B6AOCFA0-7CAF-4EF4-80EF-5C4907C7C810/0/FormulatingReduced-CalorieReducedSugarFlavoredMilks.pdf>

- Langendorff, V. Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A. y De Kruif, C. G. (2000). «Effects of carrageenan type on the behavior of carrageenan/milk mixtures». *Food Hydrocolloids*, 14, 273-280.
- Madrigal, L. y Sangronis, E. (2007). «La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales». *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4), 387-396.
- Ozdemir, M. y Hasan, S. (1998). «Characterization of rheological properties of systems containing sugar substitutes and carrageenan». *International Journal of Food Science and Technology*, 33, 439-444.
- Penna, A. L., Sivieri, K. y Oliveira, M. N. (2001). «Relation between quality and rheological properties of lactic beverages». *Journal of Food Engineering*, 49, 7-13.
- Preston, M. B. (2007). *Honey in chocolate milk-based Beverages*. National Honey Board and University of Nebraska-Lincoln Food Processing Center. En línea: Obtenido el 15 de febrero de 2009 desde: <http://www.honey.com/foodindustry/resourcedb/chocolatemilk.htm>
- Raats, M. M. y Shepherd, R. (1992). «Free-choice profiling of milks and other products prepared with milks of different fat contents». *Journal of Sensory Studies*, 7, 179-203.
- Saxelin, M., Korpela, R. y Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). «Introduction: classifying functional dairy products. En: T. Mattila-Sandholm y M. Saarela». *Functional dairy products*. Finlandia: Valio Ltd.
- Shchipunov, A. Y. y Chesnokov, A. V. (2003). «Carrageenan gels in skim milk: formation and rheological properties». *Colloid Journal*, 65(1), 114-123.
- Silverson. (2009). *Food. Production of flavored milk drinks*. Aplicación report. En línea: Obtenido el 1 de marzo de 2009 desde: <http://www.silverson.com/USA/SearchResults.cfm>
- Tárrega, A., Vélez-Ruiz, J. F. y Costell, E. (2005). «Influence of milk on the rheological behaviour of crosslinked waxy maize and tapioca starch dispersions». *Food Research International*, 38(7), 759-768.
- Tijssen, R. L., Canabady-Rochelle L. S. y Mellema, M. (2007). «Gelation upon long storage of milk drinks with carrageenan». *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2604-2611.
- Tungland, B. C. y Meyer, D. (2002). «Non-digestible oligosaccharides (dietary fibre): their physiology and role in human health and food». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 73-92.

- Vega, C., Andrew, R.A. y Goff, H.D. (2004). «Serum separation in soft serve ice cream mixes». *Milchwissenschaft*, 59, 284-287.
- Vélez-Ruiz, J. F. y Barbosa-Cánovas, G. V. (1997). «Rheological properties of selected dairy products». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 311-359.
- Villegas, B. (2008). *Efecto de la adición de inulina en las características físicas y sensoriales de batidos lácteos*. (Tesis doctoral). España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Villegas, B. y Costell, E. (2007). «Flow behaviour of inulin-milk beverages. Influence of inulin chain length and of milk fat content». *International Dairy Journal*, 17(7), 776-781.
- Wada, T., Sugatani, J., Terada, E., Ohguchi, M. y Miwa, M. (2005). «Physico-chemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1246-1253.
- Yanes, M., Durán, L. y Costell, E. (2002). «Rheological and optical properties of commercial chocolate milk beverages». *Journal of Food Engineering*, 51, 229-234.

RESEÑA BIOGRÁFICA

Los autores de los artículos recopilados en esta obra son profesores, alumnos y exalumnos de los posgrados en Ciencia de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla. El área de alimentos en nuestra institución tiene una tradición de más de 40 años, primero formando licenciados en Ingeniería de Alimentos y posteriormente también maestros y doctores en Ciencia de Alimentos. Los profesores de esta área realizaron sus estudios de posgrado en instituciones de reconocido prestigio tanto nacional como internacional (Washington State University, École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Universidad Politécnica de Valencia, Universidad de Buenos Aires), son miembros del Sistema Nacional de Investigadores y cuentan con una experiencia de entre 15 y 35 años como docentes a nivel universitario. Los artículos que incluye esta obra abordan temas relacionados con las líneas de investigación desarrolladas por los profesores, y han sido revisados y recopilados por el comité editorial de la revista *TSIA: Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*.

EDITORIAL UDLAP

Izraim Marrufo Fernández

Director

Rosa Quintanilla Martínez

Jefa editorial

Angélica González Flores

Guillermo Pelayo Olmos

Coordinadores de diseño

Andrea Garza Carbajal

Aldo Chiquini Zamora

Coordinadores de corrección

Carolina Tepetla Briones

Coordinadora administrativa

Andrea Monserrat Flores Santaella

Coordinadora de pre prensa

Guadalupe Salinas Martínez

Coordinadora de producción

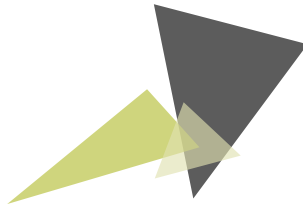
José de Jesús López Castillo

José Enrique Ortega Oliver

Impresores

María del Rosario Montiel Sánchez

Encuadernadora



TENDENCIAS EN LA CIENCIA DE ALIMENTOS

TEMAS SELECTOS

fue preparado por el Departamento de Publicaciones
de la Universidad de las Américas Puebla para su publicación
electrónica en diciembre de 2019.

Tendencias en la ciencia de alimentos: Temas selectos es un libro de avances en la disciplina cuyo propósito es contribuir a la difusión de conocimientos actualizados. Al considerar los alimentos de manera global, desde los nutrientes que ofrecen y su relación con la salud, hasta cuestiones de higiene y seguridad en los procesos de producción, los estudios reunidos en esta obra ofrecen aportes relacionados no sólo con los individuos sino también con la sociedad y la economía.

Los artículos presentan diversos ángulos de la ciencia de alimentos: unos tienen que ver con alimentos específicos, sus características, transformación y conservación; otros examinan componentes de los alimentos que han despertado interés por sus posibles efectos benéficos en la salud del consumidor, o bien, por su capacidad de inhibir el desarrollo microbiano, ayudando a lograr tanto la conservación de un alimento como su inocuidad.

UDLAP[®]

