



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES DERIVADOS
DE VEGETALES PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS**

TRABAJO ESCRITO VÍA CURSO DE EDUCACIÓN CONTINUA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

KARLA EUGENIA GOROZTIETA ROSALES



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: M. en C. Lucia Cornejo Barrera

VOCAL: Profesor: Q.F.B. María De Lourdes Gómez Ríos

SECRETARIO: Profesor: Q.F.B. Rodolfo Fonseca Larios

1er. SUPLENTE: Profesor: M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas

2do. SUPLENTE: Profesor: I.Q. Jorge Rafael Martínez Peniche

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Biblioteca central,
Hemeroteca y Facultad de Química UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. Rodolfo Fonseca Larios _____

SUSTENTANTE:

Karla Eugenia Goroztieta Rosales _____

Agradecimientos

A todos los docentes que me han acompañado durante el largo camino de mi formación, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y que de alguna manera forman parte de lo que ahora soy.

Igualmente a mi maestro asesor Q. F. B. Rodolfo Fonseca Larios quien me ha orientado, apoyado y dedicado su tiempo en todo momento para la realización de este proyecto que enmarca el último escalón hacia un futuro.

A las profesoras M. en C. Lucia Cornejo Barrera y Q.F.B. María De Lourdes Gómez Ríos que hicieron posible que esta tesis quedara terminada brindándome su apoyo, dedicación y tiempo ofrecido en la revisión de este trabajo.

A los profesores del Colegio de Ciencias y Humanidades del Plantel Naucalpan: Rosa Elba Pérez, Teresa Tepox, Antonio Rodríguez, Jesús Maza, y Arturo forcada por brindarme su apoyo académico y moral en todo momento.

*A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y en especial a la **Facultad de Química** por permitirme ser parte de una generación de profesionistas y gente productiva para el país.*

Dedicatoria

Principalmente a mis padres Carlos y Eugenia, por ser el motor en mi vida y haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha permitido llegar hasta aquí, pero más que nada, por su amor.

Para mis hermanos Leobardo, Guillermina y Monserrat que quiero y me han apoyado incondicionalmente en todo momento.

A mis tres pequeños, Anahi, Daniel y Emiliano que son lo más inocente que tengo en esta vida y que han llegado a alegrar mis días difíciles.

Para Osvaldo (Bicho), por enseñarme a creer en mí, por su paciencia, por su comprensión, por su apoyo incondicional y principalmente por su amor, por ser tal como es y conseguir un equilibrio en mi vida.

A todos mis tíos y primos que me han apoyado incondicionalmente y que siempre me han demostrado que somos una familia unida.

A mis amigos por su apoyo, por los grandes momentos que hemos compartido juntos, por consejos y correcciones pertinentes y por brindarme su amistad sincera.

***Todos los triunfos nacen
cuando nos atrevemos a
comenzarlos...***

Karla E. G. R.

Índice	Páginas
Símbolos y abreviaturas	
Resumen	1
Capítulo 1. Problemática	
1.1 Introducción	2
1.2 Objetivo	4
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1 Alteración de los alimentos	5
2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos	7
2.3 Principios de conservación de alimentos	9
2.4 Conservadores en alimentos	10
2.5 Métodos de conservación	11
2.6 Antimicrobianos alimentarios	12
2.6.1 Agentes Antimicrobianos químicos	12
2.6.1.1 Acción de los antimicrobianos químicos sobre los microorganismos	15
2.6.2 Agentes antimicrobianos naturales	18
2.6.2.1 Acción de los agentes antimicrobianos naturales sobre los microorganismos	22
Capítulo 3. Tipos de antimicrobianos naturales de origen vegetal	
3.1 Plantas, hierbas y especias	27
3.2 Oleorresinas	29
3.3 Aceites esenciales	31
3.3.1 Aceites esenciales derivados de plantas usados como antimicrobianos	34
Capítulo 4. Eficiencia de los agentes antimicrobianos	
4.1 Criterios para evaluar la eficiencia de los antimicrobianos naturales	40
4.2 Métodos de prueba para la eficiencia de los agentes antimicrobianos	42
4.3 Efecto de mezclas entre agentes antimicrobianos	44
4.4 Efecto de los antimicrobianos naturales sobre la salud	45
4.5 Futuro de los antimicrobianos de origen natural	46
4.6. Estudios que demuestran la efectividad de los antimicrobianos naturales	46
Capitulo 5. Conclusiones	50
6. Bibliografía	54

Índice de tablas	Páginas
Tabla 1. Ejemplos de antimicrobianos sintéticos	14
Tabla 2. Plantas con actividad antimicrobiana utilizadas en alimentos como saborizantes	20
Tabla 3. Lista de FDA de especias, aromatizantes y saborizantes naturales considerados GRAS	21
Tabla 4. Compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especias	27
Tabla 5. Ejemplos de especias que inhiben el crecimiento de microorganismos como bacterias gram-positivas	28
Tabla 6. Vegetales de donde se extraen oleorresinas	30
Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales probados "in vitro" contra microorganismos patógenos transmitidos por alimentos	33
Tabla 8. Métodos para evaluar la eficacia de los antimicrobianos naturales	43

Índice de figuras	Páginas
Figura 1. Principales causas de deterioro de los alimentos	5
Figura 2. Tendencia del recuento microbiano respecto a la presencia y concentración de sustancias antimicrobianas	15
Figura 3. Posibles puntos de ataque de las diferentes sustancias químicas antimicrobianas durante la germinación de las esporas bacterianas	16
Figura 4. Posibles puntos de ataque de las sustancias antimicrobianas en la célula de los microorganismos	17
Figura 5. Estructura general de los glucósidos cianogénicos	22
Figura 6. Estructuras químicas de: a) ácido cítrico, b) ácido málico, c) ácido tartárico, d) ácido benzoico	23
Figura 7. Estructuras de : a) ácido cafeico y b) ácido cinámico	24
Figura 8. Estructura del mentol (terpenoides)	24
Figura 9. Estructura general de los isoflavonoides	25
Figura 10. Estructura del eugenol	35
Figura 11. Compuestos de: a) timol, b) carvacrol, presentes en el tomillo	36
Figura 12. Estructura química de los principales componentes en orégano	37
Figura 13. Estructuras generales de flavonoides presentes en cebolla: a) antocianina, b) quercetina	38
Figura 14. Álicina, compuesto antimicrobiano del ajo	40

Símbolos y abreviaturas

°C	Grados Celsius
C₅	Hemiterpeno
C₁₅	Sesquiterpeno
α	Letra griega Alfa
β	Letra griega Beta
ρ	Letra griega Ro
γ	Letra griega Gamma
%	Porcentaje
μL	Microlitro
a.C.	Antes de Cristo
A.E.	Aceites esenciales
ATP	Adenosina Trifosfato, por sus siglas en inglés (Adenosine TriPhosphate)
CEE	Comunidad Económica Europea
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés (Deoxyribonucleic Acid)
EDTA	Ácido Etilen Diamin Tetracético, por sus siglas en inglés (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EEUU	Es un acrónimo de Estados Unidos de América
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
FDA	Administración de alimentos y farmacos, por sus siglas en inglés (Food and Drug Administration)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, por sus siglas en inglés (Food and Agriculture Organization)
F.P.M.	Fuerza protón motriz
GRAS	por sus siglas en inglés (Generally Recognized as Safe)
IFT	Institute of Food Technologists
kg	kilogramo
mg	miligramo
mL	Mililitro
P/P	Porcentaje en peso
PAC	Proantocianidina
pH	potencial de Hidrógeno
S-O-S	Azufre-Oxígeno-Azufre

Resumen

En las últimas décadas ha surgido la necesidad de buscar alternativas naturales para la conservación de los alimentos, debido a que se ha asociado el consumo de conservadores químicos con daños a la salud, además de que los consumidores están optando por alimentarse con alimentos naturales. La demanda de productos frescos mínimamente tratados sin aditivos sintéticos está aumentando, así como el interés por los agentes antimicrobianos de origen natural (derivados de vegetales), por esto en la actualidad se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, y permitiendo con esto, productos semejantes al producto fresco pero con una mínima adición de aditivos. Es por ello que el principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutrimentalmente adecuados y que cubran con las expectativas organolépticas deseadas. El uso de aditivos alimentarios de origen natural implica su aislamiento, purificación, estabilización e incorporación a los alimentos con fines antimicrobianos, sin que ello afecte negativamente las características sensoriales. Cada día se descubren más plantas que contienen antimicrobianos naturales en algunas de sus partes, por ejemplo los que incluyen compuestos glucosídicos, fenólicos, ácidos orgánicos, terpenos y fitoalexinas provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, producidas en plantas, por lo que se tendrá una buena seguridad y calidad en los alimentos, ya que este tipo de antimicrobianos se consideran como fuentes potencialmente seguras.

Palabras clave: aditivos, alimentos, antimicrobianos naturales, conservación.

Capítulo 1. Problemática

1.1 Introducción

Actualmente existe una tendencia mundial hacia un mayor consumo de alimentos frescos y saludables, motivado principalmente por una creciente preocupación por tener una alimentación más equilibrada, con una menor proporción de hidratos de carbono y grasas, un mayor contenido de fibra, vitaminas y minerales. Esto debido a las menores necesidades calóricas de la vida moderna del ser humano, caracterizadas por un mayor confort y sedentarismo. Por lo tanto la tendencia es consumir productos más frescos y sanos, y lo más parecido a su forma original, debido a que actualmente los consumidores demandan cada vez más alimentos sin sustancias conservadores o antimicrobianas sintetizadas químicamente, asociando a los alimentos sanos y seguros con alimentos frescos o mínimamente procesados. Esto conlleva a la búsqueda de nuevas formas de preservación y al análisis de sus efectos sobre la estabilidad microbiológica de los alimentos.

El uso de agentes antimicrobianos mejor conocidos como conservadores es una práctica común en la industria de los alimentos debido a las alteraciones microbianas de los alimentos que tienen implicaciones económicas, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo), es por eso que se utilizan conservadores, mayormente sintetizados químicamente para la seguridad de los alimentos, ya que estas sustancias al añadirse a los alimentos previenen la descomposición de los mismos, por la actividad metabólica microbiana; sin embargo, hoy en día existe una postura de rechazo por una gran parte de los consumidores hacia los productos procesados y aquellos adicionados con algún tipo de conservador químico ya que su consumo se ha relacionado con enfermedades de tipo cancerígeno, aunque no hay evidencia científica contundente que demuestre o compruebe este tipo de sospechas.

Entre los conservadores más polémicos destacan las sales de nitrato y nitrito, que al ser adicionados en productos cárnicos y sometidos a un tratamiento térmico, pueden generar la formación de un tipo de compuestos cancerígenos denominados nitrosaminas (Ibañez *et al.*, 2003), es por ello que ha surgido la necesidad de buscar otras opciones de conservadores, por lo que en este trabajo bibliográfico se enfocó a la búsqueda de agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los antimicrobianos químicos usados tradicionalmente.

Muchos compuestos naturales encontrados en plantas, hierbas y especias han demostrado poseer funciones antimicrobianas y fungir como agentes antimicrobianos contra los patógenos transmitidos por alimentos; sin embargo lo más difícil es extraer, purificar, estabilizar e incorporar dicho antimicrobiano al alimento sin que se afecte su calidad sensorial e inocuidad (Kotzekidou *et al.*, 2007).

La actividad antimicrobiana de hierbas, plantas y especias es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos, glucósidos, ácidos orgánicos, terpenos y fitoalexinas presentes en sus extractos o aceites esenciales (Anónimo 1, 2008). Los sitios de acción de estos compuestos antimicrobianos en la célula microbiana, se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes como la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteínas y en el sistema genético, todas estratégicas en la supervivencia y desarrollo de los microorganismos (Hernández, 2003).

Por lo tanto los antimicrobianos naturales forman parte de los aditivos alimentarios más importantes en la actualidad, debido a la demanda por parte del consumidor de productos frescos mínimamente tratados, por lo que está aumentando el interés por parte de la industria alimentaria para remplazar a los antimicrobianos sintéticos y enfocarse hacia el uso de los agentes antimicrobianos de origen natural para ser utilizados con el fin de prolongar la vida útil y la seguridad del consumidor.

1.2 Objetivo

Identificar a partir de una revisión bibliográfica el poder antimicrobiano que tienen algunos compuestos naturales derivados de algunos vegetales y su potencial y benéfica aplicación en la conservación de alimentos.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Alteración de los alimentos

La calidad de los alimentos es afectada por factores físicos, químicos, biológicos y ambientales que causan la alteración de los alimentos (Figura1). El control de dichos factores y en especial el microbiológico es esencial para la preservación de los alimentos. La aplicación de sustancias que causen estrés microbiológico es de gran utilidad para lograr la inhibición y/o muerte microbiana (Rojas, 2011). Las causas principales que afectan la sobrevivencia y el crecimiento microbiano se pueden clasificar de la siguiente forma (Alzamora, 1997):

- Factores implícitos y microbianos (microorganismos presentes, velocidades y fases log de crecimiento y efectos sinérgicos)
- Factores intrínsecos, aquellos factores químicos y físicos que actúan dentro del alimento (nutrimentos, pH, actividad de agua, presencia de conservadores y otras sustancias antimicrobianas)
- Factores extrínsecos (temperatura, humedad relativa, presión parcial de oxígeno, radiación solar, etc.).

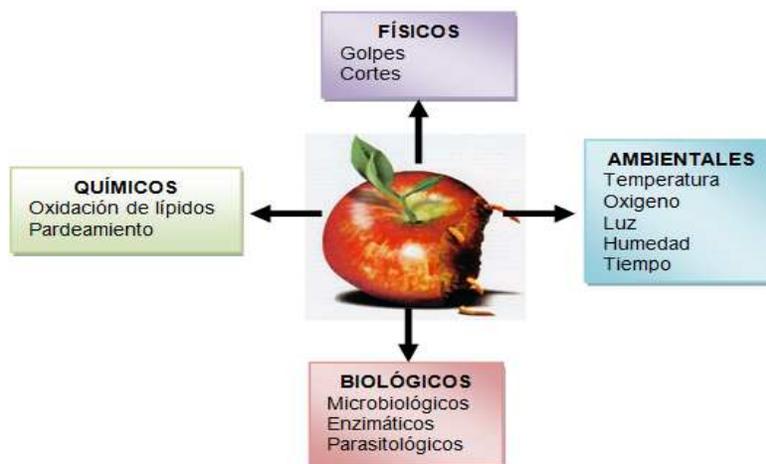


Figura 1. Principales causas de deterioro de los alimentos (Rojas, 2011)

Algunos de los factores más críticos que causan el deterioro de alimentos son los que a continuación se mencionan (Shafiur, 2003):

Actividad de agua: factor crítico que afecta la vida de anaquel de los productos alimenticios, siendo el más importante para el control del deterioro de un alimento. La mayoría de las bacterias patógenas pueden crecer en sustratos con una actividad de agua mayor a 0.91, mientras que los hongos, pueden crecer con una actividad de agua de 0.80. Así, mediante una medición de la actividad de agua de un producto es posible predecir qué tipo de microorganismos pueden ser causantes potenciales de deterioro. El crecimiento de microorganismos se ve favorecido mientras más agua tenga disponible para sus funciones metabólicas.

pH o potencial hidrógeno: factor que influye considerablemente en el tipo de microorganismo que puede crecer en un medio. Además puede alterar la velocidad de crecimiento de las colonias, así como la resistencia térmica y la actividad de los agentes antimicrobianos. Las bacterias capaces de causar enfermedades no pueden crecer a valores de pH por debajo de 3.9 a 4.0, pero si pueden crecer a pH de 6.5 a 7.5, tolerando rangos de pH 4 a 9. Cuando un microorganismo se encuentra en un medio con un pH diferente al óptimo para su crecimiento, utiliza su energía para mantener sus condiciones internas constantes, por lo que no tiene energía suficiente para crecer.

Temperatura: cada tipo de microorganismo tiene condiciones óptimas de crecimiento, ya que cada uno cuenta un tipo diferente de metabolismo con diferentes necesidades. La temperatura juega un papel muy importante en el crecimiento de microorganismos. Existe un amplio rango de temperaturas en donde pueden crecer, aunque según el tipo de microorganismo, es su intervalo de temperaturas. Los microorganismos psicrófilos por ejemplo pueden crecer a temperaturas incluso menores a las de congelación, como es el caso del *Enterobacter aerogenes*. En cambio los microorganismos termófilos pueden

crecer a temperaturas mayores a los 50°C, como sucede con el *Lactobacillus thermophilus*.

El problema ocasionado principalmente a causa del deterioro microbiano en los alimentos tiene implicaciones económicas evidentes, para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la calidad y deterioro a la imagen de marca, etc.) así como para consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo), por ejemplo, las pérdidas poscosecha de productos frescos varían entre 25 a 50% de la producción. Las mermas de esta magnitud representan una pérdida significativa de alimentos y un considerable daño económico para los productores. En los últimos diez años se han logrado escasas reducciones en las pérdidas poscosecha de granos básicos, carnes, productos lácteos, frutas y hortalizas frescas, debido a las tendencias que existen en los países en desarrollo de incrementos de la población junto con la rápida urbanización ocasionan que las infraestructuras y prácticas de mercadeo de alimentos frescos que antes eran inadecuadas, hoy en día lo son aún más (FAO, 1989).

2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (Huertas, 2008)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son uno de los mayores problemas de la salud mundial, pueden causar una enfermedad pasajera o pueden ser tan graves que pueden llegar a causar la muerte. Estas enfermedades resultan por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con agentes químicos (plaguicidas, fertilizantes, etc.) o por agentes biológicos (microorganismos, parásitos y/o algunas sustancias tóxicas que estos producen).

Las ETAs se clasifican en tres tipos:

- **Infecciones:** son aquellas enfermedades causadas por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos perjudiciales (patógenos) vivos (virus, bacterias, parásitos). Ejemplos: *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, el virus de la Hepatitis A.
- **Intoxicaciones:** son aquellas enfermedades causadas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional desde su producción hasta su consumo. Ocurren cuando estas toxinas de bacterias y mohos aun están presentes en lo alimentos ingeridos, estas toxinas no son detectadas por el consumidor pues no tienen olor, ni sabor y algunas pueden soportar los tratamientos térmicos realizados a los alimentos como por ejemplo la cocción. A estas toxinas se les llama toxinas termorresistentes. Entre los microorganismos que producen toxinas se encuentran: *Clostridium botulinum* (toxina botulínica) y la *Escherichia coli* (toxina shiga).
- **Toxi-infecciones:** son enfermedades causadas por la ingestión de una cierta concentración de microorganismos vivos que poseen la capacidad de producir, sintetizar o liberar toxinas una vez ingeridos, como ejemplo se encuentra *Vibrio cholerae* (cólera).

2.3 Principios de conservación de alimentos

Cualquier método de conservación de alimentos tiene como principio fundamental el de prevenir e impedir la alteración o descomposición de los mismos. Se dice que un alimento se descompone o se altera, cuando pierde sus características nutrimentales y sensoriales, por lo que cualquier método de conservación debe ser aquel que crea las condiciones bajo las cuales los microorganismos no puedan desarrollarse o sobrevivir (Orbe, 2004).

Las actuales tendencias de los consumidores indican su preferencia por alimentos de fácil preparación, naturales, buena calidad sensorial y seguros, que estén poco procesados, pero a la vez tengan una mayor vida útil, por lo que las tecnologías de conservación de alimentos tienen como reto, obtener productos más duraderos exponiendo al mínimo sus características nutrimentales y sensoriales de origen (Del Valle, 2003).

Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos. Por otra parte, los alimentos alterados pueden resultar muy perjudiciales para la salud del consumidor (Lück y Jager, 1999).

Las condiciones de uso de los conservadores están reglamentadas estrictamente en todos los países del mundo. Usualmente existen límites de la cantidad que se puede añadir de un conservador al alimento. Los conservadores alimenticios, a las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación. Por lo tanto, solo son útiles con materias primas de buena calidad (Shafiur, 2003)

Los organismos oficiales correspondientes, para autorizar el uso de determinado aditivo, tienen que tomar en cuenta que éste, sea un auxiliar del procesado correcto de los alimentos y no un agente para enmascarar condiciones de

manipulación sanitaria o tecnológicamente deficientes, ni un sistema para defraudar al consumidor engañándole respecto a la frescura real de un alimento (Shafiur, 2003)

2.4 Conservadores en alimentos

Los conservadores actúan prolongando la vida útil de los alimentos, manteniendo en el mayor grado y tiempo posible, sus atributos de calidad incluyendo color, textura, sabor y especialmente valor nutritivo, también permite prevenir o evitar el desarrollo de microorganismos nocivos y a la vez controlan los cambios químicos y bioquímicos que provocan deterioro (Moyano y Mujica, 2002).

Los alimentos son considerados como fuente de salud y bienestar, ya que proporcionan los requerimientos energéticos y demás nutrimentos que son indispensables para la vida. Sin embargo, como ya se había mencionado anteriormente, en algunas ocasiones se convierten en vectores de enfermedades agudas, graves o crónicas, producidas por microorganismos (ETAs). Lo que ha ocasionado un problema en la industria alimentaria, debido a la disminución de producción de alimentos, estas pérdidas importantes causadas por contaminación de microorganismos, degradan a los alimentos y los convierten en no aptos para el consumo humano; esto ocurre durante la cosecha, transporte, procesado y almacenamiento. (Gálvez y Buitimea, 2010).

Cuando se adquiere un alimento este puede ser procesado o no procesado (frutas, verduras, hortalizas, carnes, lácteos, etc.), y es posible que dicho alimento pueda haber sufrido alguna contaminación de manera no intencional o bien contener algún aditivo. Dentro de los contaminantes no intencionales se pueden encontrar componentes naturales del propio alimento, toxinas producidas por alguna bacteria, productos derivados del procesamiento del alimento y de la contaminación ambiental, contaminantes que resultan de la manipulación del alimento como pesticidas y fertilizantes entre otros. Por otro lado, los aditivos se

añaden de manera intencional para preservar y/o mejorar las características del alimento. Los conservadores químicos o naturales se adicionan con el propósito de controlar el crecimiento de microorganismos especialmente bacterias y hongos (Barboza *et al.*, 2004).

A pesar de que la mayor parte de los conservadores usados en alimentos son de origen químico, existen diversos productos de origen natural provenientes de plantas que también pueden ser usados como conservadores de alimentos. Se estima que del 1 al 10% de 500 000 especies de plantas que existen en el mundo tienen uso como alimento. (Barboza *et al.*, 2004).

2.5 Métodos de conservación

Desde tiempos antiguos se ha recurrido fundamentalmente a dos métodos de conservación, los físicos y químicos, donde no necesariamente se matan o destruyen totalmente a los microorganismos, sino que se crean condiciones que eviten que los microorganismos alteren los alimentos. Los métodos de conservación físicos son notables por que el alimento se somete a medidas físicas letales o inhibitoras del crecimiento microbiano. Los métodos físicos mejor conocidos son los de esterilización y pasteurización (tratamientos térmicos), refrigeración y congelación (enfriamiento o extracción de energía), la deshidratación y la irradiación (aporte de energía ionizante sin calentamiento) (Lück y Jager, 1999).

Los métodos químicos se caracterizan por la adición de sustancias químicas definidas para inhibir el desarrollo de los microorganismos o para destruirlos. Estas sustancias se conocen como conservadores o antimicrobianos y se usan en concentraciones promedio del 0.5-1.0%, aunque también pueden emplearse concentraciones menores al 0.5 % P/P por la gran potencia de su acción antimicrobiana (Lück y Jager, 1999).

En la actualidad, se busca la combinación de dos o más factores químicos o físicos que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, evitando la aplicación de un solo factor de conservación en forma severa, lo que mejora la calidad sensorial y nutrimental del alimento; permitiendo el procesamiento de productos semejantes al producto fresco, más sanos, con menos aditivos y listos para preparar. A esta combinación de factores se le ha denominado tecnología de obstáculos o factores combinados (Alzamora, 1997).

2.6 Antimicrobianos alimentarios

2.6.1 Agentes Antimicrobianos químicos

Los antimicrobianos químicos son sustancias que se añaden a los productos alimenticios para inhibir y/o disminuir el crecimiento de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias. Cabe mencionar que la velocidad de deterioro microbiológico no solo depende de los microorganismos presentes, sino también de la composición química del producto y del tipo de carga microbiana inicial (Badui, 2006).

No cualquier antimicrobiano es adecuado para todos los alimentos, por lo que hay métodos para medir su efectividad lo cual depende de varios factores (Badui, 2006). Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes como la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína y en el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos

- a) *Especificidad de acción*: algunos presentan un amplio espectro de acción mientras que otros, son específicamente efectivos contra un determinado tipo de microorganismos.

- b) *Composición del alimento*: el pH, la fuerza iónica, la actividad del agua, disponibilidad de nutrimentos para los microorganismos.
- c) *Nivel inicial de contaminación*: los productos altamente contaminados no pueden controlarse con la adición normal de antimicrobianos.
- d) *Manejo y distribución del producto terminado*: la conservación no solo debe recaer en los aditivos, sino que se requiere un manejo adecuado para evitar nuevas contaminaciones.

Los antimicrobianos químicos utilizados en alimentos deben reunir varias condiciones (Obelisco, 1995):

- No ser tóxicos ni perjudiciales en las dosis que son añadidos a los alimentos.
- No se deben utilizar para enmascarar ingredientes o alimentos en mal estado, ni procesos de fabricación fraudulentos.
- Deben ser de fácil identificación analítica.

Se sabe que el agente antimicrobiano del que se tiene el registro más antiguo es la sal de mesa, la cual se sigue utilizando en la actualidad para conservar productos cárnicos. Con la evolución de la ciencia de alimentos han surgido muchos compuestos químicos con actividad antimicrobiana. En el siglo XX se dieron grandes avances en la conservación de alimentos por medio de agentes químicos. Fue entonces cuando empezaron las revisiones de daños a la salud que cada agente podría causar (Acero, 2011).

Se dice que algunos agentes antimicrobianos gozan de la capacidad de combinarse con las proteínas y de su mezcla resultan nuevas proteínas anormales que el organismo humano no es capaz de identificar y así considerarlas como extrañas y por ende rechazar, o quizá al sobrepasar las dosis autorizadas de antimicrobianos, estos actúan como destructores de vitaminas y otros como inhibidores de enzimas ocasionan daños a la salud (Obelisco, 1995).

El uso de agentes antimicrobianos en la industria de alimentos en la actualidad, es una práctica muy común para extender la vida útil de diferentes productos. Estos antimicrobianos difieren según el país, ya que su uso está restringido por la ley alimentaria y normas de cada nación. La producción de antimicrobianos genera una fuente de ingresos económicos importante a nivel mundial, tan sólo en los Estados Unidos en 1991 se consumieron 37.5 millones de kilogramos de conservadores, y esta cifra ha aumentado año con año desde entonces. Se estima que a nivel mundial, el consumo de antimicrobianos aumenta 4.1% anualmente, siendo los más utilizados los sorbatos, los propionatos y los benzoatos (Anónimo 1, 2008).

La mayoría de agentes antimicrobianos usados en alimentos solo inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, más no eliminan su crecimiento, por lo que el producto tiene una vida de anaquel restringida, y es necesario el uso de otros factores de conservación que aumenten la vida media del producto. Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente reconocidos por la FDA (Food and Drug Administration) se muestran en la Tabla 1. (EUFIC, 2004)

Tabla 1. Ejemplos de antimicrobianos sintéticos (EUFIC, 2004)

Sustancia/clase	Microorganismos que atacan	Alimentos en los que se usan
Ácido sórbico y sorbatos	mohos	Queso, vino, fruta desecada, compotas, acompañamientos, etc.
Ácido benzoico y benzoatos	mohos y levaduras	Verduras en vinagre, mermeladas y gelatinas bajas en azúcar, frutas confitadas, semiconservas de pescado, salsas, etc.
Anhídrido sulfuroso y sulfitos	mohos, levaduras y bacterias	Fruta desecada, frutas en conserva, productos a base de patata, vino, etc.
Natamicina	bacterias ácido lácticas, clostridios	Tratamiento de la cubierta exterior del queso y los embutidos
Nitritos y nitratos	Bacterias, clostridios	Embutidos, jamón, queso, arenques en vinagre, etc.

2.6.1.1 Acción de los antimicrobianos químicos sobre los microorganismos (Lück y Jager, 1999)

Los antimicrobianos en los alimentos, no solo inhiben el metabolismo, sino también el crecimiento de bacterias, hongos, mohos y levaduras.

Los antimicrobianos pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo;

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular
- Daño a la integridad de las membranas
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales

Consecuentemente algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas (es decir, el que mata al microorganismo), o microbiostáticos (es decir, el que inhibe al microorganismo). A largo plazo el efecto del antimicrobiano añadido al alimento es destruir a los microorganismos o dejarlos sobrevivir sin actividad metabólica. Cabe mencionar que el factor más importante de esta acción inhibitor o letal es la dosis del antimicrobiano (Figura 2).

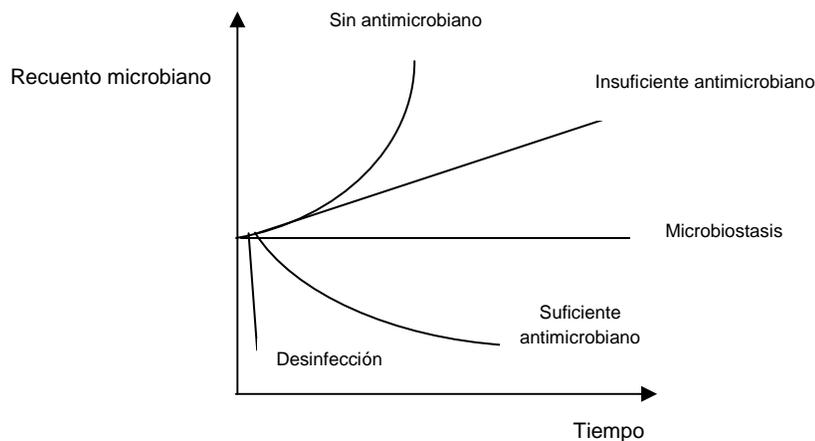


Figura 2. Tendencia del recuento microbiano respecto a la presencia y concentración de sustancias antimicrobianas Lück y Jager, 1999)

La acción de los antimicrobianos sobre las células de los microorganismos se basa en una diversidad de influencias individuales. Estas incluyen no solo mecanismos físicos o físico-químicos, sino también reacciones bioquímicas de la célula microbiana. Con frecuencia, diversos factores individuales pueden producir un efecto acumulativo, aunque a veces solo se bloquea una fase de una reacción clave de la célula microbiana.

En el caso de las bacterias que forman esporas, diferentes antimicrobianos ejercen su acción inhibitoria, en las diferentes fases de la germinación de las esporas (Figura 3).

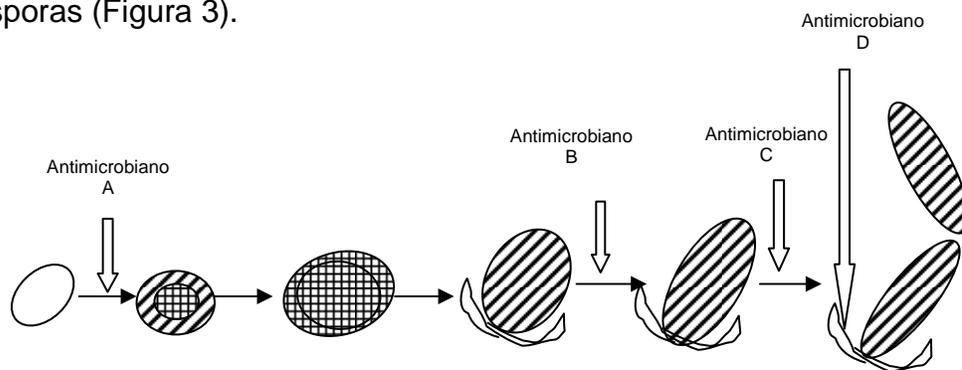


Figura 3. Posibles puntos de ataque de las diferentes sustancias químicas antimicrobianas durante la germinación de las esporas bacterianas Lück y Jager, 1999)

En esencia la acción antimicrobiana puede explicarse por los siguientes fenómenos (Figura 4):

1. Influencia sobre el DNA
2. influencia sobre la síntesis de proteínas
3. influencia sobre la actividad enzimática
4. influencia sobre la membrana celular
5. influencia sobre la pared celular
6. influencia sobre los mecanismos de transporte de nutrimentos

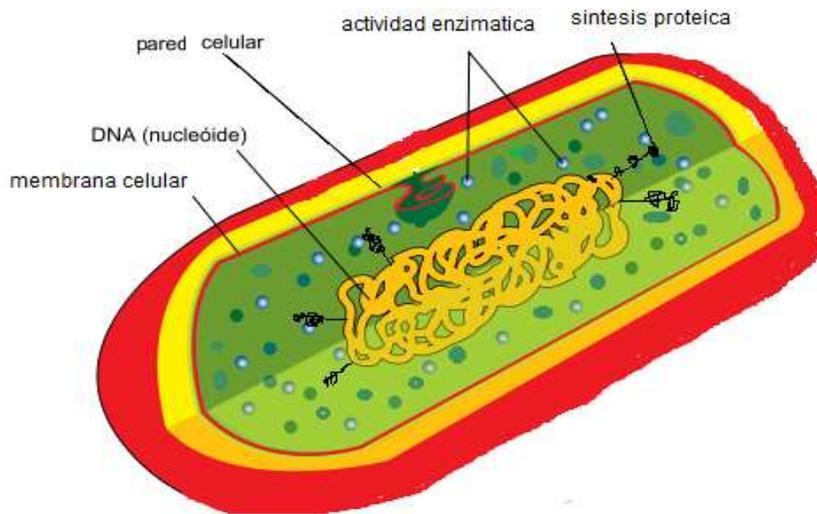


Figura 4. Posibles puntos de ataque de las sustancias antimicrobianas en la célula de los microorganismos (Lück y Jager, 1999)

En la actualidad se ha ido admitiendo, cada vez más, que los antimicrobianos actúan sobre la pared celular y sobre la membrana celular, su estructura y los mecanismos de transporte de nutrientes, tales como aminoácidos a la célula.

Las sustancias lipofílicas, al igual que la mayoría de los antimicrobianos de alimentos, atacan a la membrana celular, destruyéndola. Esto aumenta el flujo de protones hacia la célula. La célula entonces, tiene que utilizar más energía para compensar la penetración del antimicrobiano, que entra en el interior neutro de la célula, así como las diferencias de potencial que ocurren.

La acción antimicrobiana de los conservadores requiere cierto grado tanto de solubilidad en el agua como en los lípidos. El crecimiento microbiano ocurre solamente en la fase acuosa de los alimentos y el conservante tiene que ser capaz de difundirse en el agua. También tiene que ser capaz de penetrar en la pared celular hidrofóbica. Entonces la eficiencia de los antimicrobianos está regida por una estricta relación dosis- efecto.

2.6.2 Agentes antimicrobianos naturales

El principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, nutricionalmente adecuados y cubrir las expectativas de sabor, aroma, apariencia y calidad. Es por esto el deseo de la sociedad moderna de consumir alimentos frescos, por lo que ha incrementado la popularidad de los alimentos “mínimamente o parcialmente procesados”. Este tipo de alimentos siguen los pasos mínimos de preparación, tratando de cambiar lo menos posible las cualidades de “alimento fresco” en la medida que sea posible, pero al mismo tiempo haciéndolo un alimento seguro y con una vida de anaquel suficiente para su transporte hasta el consumidor.

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. En estado natural, estos compuestos pueden desempeñar el papel de prolongadores de la vida útil de los alimentos. (Raybaudi *et al.*, 2006)

El uso de antimicrobianos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con el fin de alargar su vida de anaquel, sin que ello afecte negativamente sus características sensoriales y nutritivas. Esto tiene que lograrse manteniendo los costos de formulación, procesamiento y comercialización.

Los antimicrobianos naturales pueden clasificarse de acuerdo a su origen en (Raybaudi *et al.*, 2006 y Hernández, 2003):

1. **Origen animal:** proteínas, enzimas hidrolíticas como glucanasas y citinasas, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosán. Actúan principalmente sobre las membranas de los microorganismos.

2. **Origen vegetal:** compuestos fenólicos, terpenos, glucósidos, ácidos orgánicos, y fitoalexinas, son identificados como metabolitos secundarios derivados de cortezas, tallos, hojas, flores, plantas y especias.

3. **Origen microbiano:** son compuestos producidos por microorganismos nisina, pediocina y otros bacteriocinas; pimaricina, subtilina y natamicina. (Welti y Bermúdez, 2012)

En este trabajo solo se mencionarán los antimicrobianos naturales de origen vegetal ya que solo son los que interesan para esta revisión bibliográfica.

Los antimicrobianos naturales de origen vegetal van ganando adeptos en el ámbito de la «conservación natural», sobre todo en las actividades antimicrobiana procedente de extractos de varios tipos y partes de plantas, así como de sus aceites esenciales, que contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos (Tabla 2).

Los compuestos antimicrobianos de las plantas, se encuentran generalmente en el aceite esencial obtenido a partir de hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos. Los aceites se pueden obtener con destilación por arrastre de vapor entre otros métodos. (Hernández, 2003)

Tabla 2. Plantas con actividad antimicrobiana utilizadas en alimentos como saborizantes (Hernández, 2003)

NOMBRE COMÚN	GENERO Y ESPECIE
Ajedrea	<i>Satureja hortensis</i>
Ajo	<i>Allium sativum</i>
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>
Alcaravea	<i>Carum carvi</i>
Anís	<i>Pimpinella anisum</i>
Azafrán	<i>Crocus sativus</i>
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
Cardamomo	<i>Elletaria cardamomum</i>
Cebollín	<i>Allium schoenoprasum</i>
Cilantro	<i>Coriandum sativum</i>
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>
Comino	<i>Cuminum cyminum</i>
Cúrcuma	<i>Curcuma longa</i>
Eneldo	<i>Anetum graveolens</i>
Hinojo	<i>Foeniculum vulgare</i>
Jengibre	<i>Zingiber officinale</i>
Laurel	<i>Laurus nobilis</i>
Macis	<i>Myristica fragans</i>
Mejorana	<i>Origamum majorana</i>
Menta	<i>Mentha vulgaris</i>
Mostaza	<i>Brassica hirta</i>
Nuez moscada	<i>Myristica fragans</i>
Perejil	<i>Petroselinum crispian</i>
Perifollo	<i>Anthriscus cerefolium</i>
Pimienta de Cayenne	<i>Capsicum frutescens</i>
Pimienta de Jamaica	<i>Pimienta dioica</i>
Pimentón	<i>Capsicum annun</i>
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>
Semilla de Apio	<i>Appium graveolens</i>
Té Limón	<i>Cymbopogon citratus</i>
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>
Vainilla	<i>Vainilla planifolia</i>

Wilkins y Board (1989), reportaron más de 1340 plantas como potenciales fuentes de antimicrobianos (Hernández, 2003). En general, cada vez se descubren más plantas o partes de éstas que contienen antimicrobianos naturales, por lo que ya no solo se tendrá mayor seguridad, sino mejor calidad de los alimentos (Blanchard, 2000).

La FDA, considera a los agentes antimicrobianos de origen natural , como sustancias del tipo GRAS, en la Tabla 3, figuran productos vegetales de los que se obtienen aceites esenciales, oleorresinas, y extractos naturales incluyendo a sus destilados para su uso como agentes antimicrobianos (Hernández, 2003).

Tabla 3. Lista de FDA de especias, aromatizantes, y saborizantes naturales considerados GRAS (Hernández, 2003).

PRODUCTO VEGETAL	
Ajo	Glicirrizza
Ajonjolí	Hinojo
Albahaca	Jengibre
Alcaparra	Manzanilla
Alfalfa	Mejorana
Anís	Menta
Apio	Mostaza
Azafrán	Nuez moscada
Caléndula	Orégano
Canela	Perejil
Cardamomo	Pimentón
Cebolla	Pimienta
Cilantro	Pimienta de Cayena
Clavo	Pimienta de Jamaica
Comino	Pimiento
Cúrcuma	Rábano
Geranio	Vainilla

2.6.2.1 Acción de los agentes antimicrobianos naturales sobre los microorganismos

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana se lleva a cabo en partes y/o funciones importantes como la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína y en el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos (Hernández, 2003).

Existen diferentes compuestos metabólicos secundarios sintetizados de origen vegetal con acción antimicrobiana, que se les ha agrupado en clases de acuerdo a su estructura química. Los grupos más comunes son:

- **Glucósidos cianogénicos:** Son sustancias orgánicas, con principios activos de diferentes familias botánicas (*Rosaceae*, *Linaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, etc.) Químicamente, corresponden a estructuras heterosídicas., formadas por un grupo nitrilo, unido a un carbono que tiene unido a su vez un molécula de azúcar (glucosa) mediante un enlace glucosídico y dos grupos distintos que varían dependiendo de cuál sea el glucósido. (Figura 5). Ciertas plantas tienen enzimas que hidrolizan y separan el azúcar liberando cianuro, éste actúa directamente sobre las mitocondrias inhibiendo la producción de energía a la célula microbiana (Calvo, 2009).

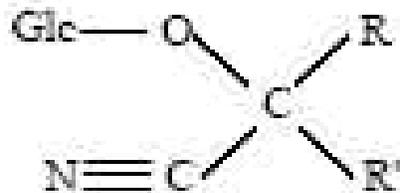


Figura 5. Estructura general de los glucósidos cianogénicos (Calvo, 2009).

- **Ácidos orgánicos** Los ácidos cítrico, málico, tartárico y benzoico (Figura 6), se encuentran comúnmente en las frutas (cítricos, uva, piña) y en los vegetales (brócoli, zanahoria) además de su uso como acidulantes o antioxidantes proporcionan, además, propiedades antimicrobianas ya que son capaces de inhibir bacterias y levaduras (Shafiur, 2003).

El modo de acción de los ácidos orgánicos tiene como objetivo la pared celular, la membrana celular, las enzimas metabólicas, el sistema de síntesis de proteínas y el material genético (Shafiur, 2003). Debido a que estos ácidos orgánicos pueden ser alterados estructuralmente por los cambios de pH. (Raybaudi *et al.*, 2006). De tal forma, los ácidos son activos contra una gama amplia de microorganismos.

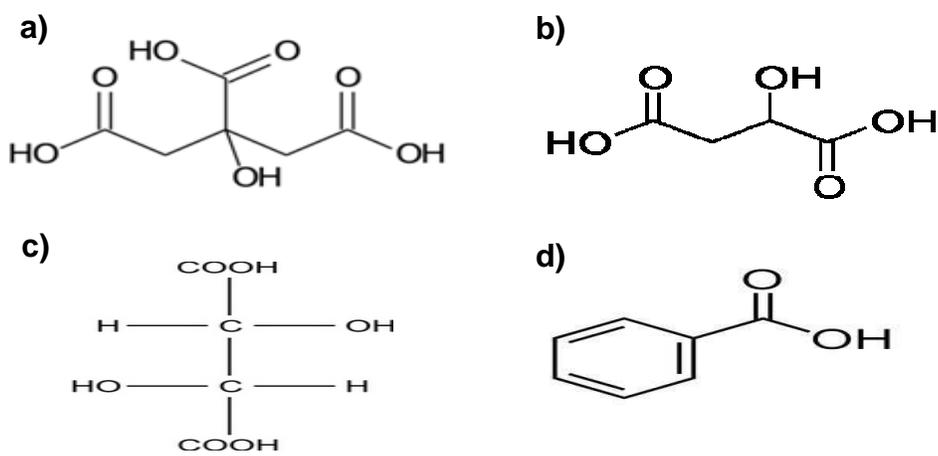


Figura 6. Estructuras químicas de: a) ácido cítrico, b) ácido málico, c) ácido tartárico, d) ácido benzoico (Shafiur, 2003)

- **Compuestos fenólicos:** Definidos químicamente como anillos bencénicos con uno o más grupos hidroxilo, existen más de veinticinco mil estructuras llamadas fenólicas. Los representantes comunes de este grupo son el ácido cinámico y el ácido cafeico (Figura 7) pues son efectivos contra bacterias y hongos, además de que son usados frecuentemente como conservadores por su acción antioxidante, Los grupos hidroxilo en los fenoles se cree que está relacionado

con la toxicidad contra los microorganismos. Al parecer los fenoles presentan una capacidad de acomplejar proteínas extracelulares y de la pared celular bacteriana, pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionan con la membrana celular y alteran la función del material genético. Se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afecta la actividad antimicrobiana de estos compuestos. (Barranco, 2004).

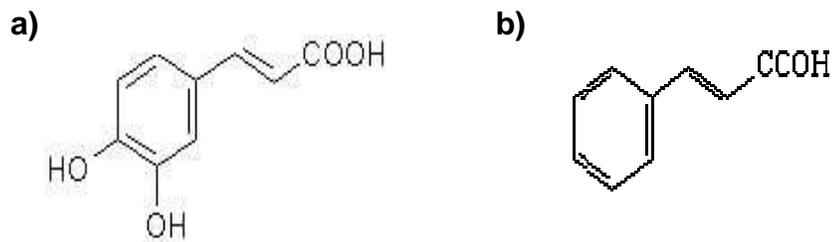


Figura 7. Estructuras de: a) ácido cafeico y b) ácido cinámico (Barranco, 2004)

- **Terpenos:** compuestos secundarios basados en la estructura del isopreno, pueden ser diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, hemiterpenos (C_5) y sesquiterpenos (C_{15}). Son llamados terpenoides cuando contienen elementos adicionales usualmente oxígeno (Figura 8), y son derivados de ácidos. La mayoría son volátiles e imparten el olor típico a coníferas, mentas y muchas otras especies herbáceas y arbustivas.

Los triterpenoides, un subgrupo, incluyen muchos compuestos extremadamente amargos, como la curcubitacina de las calabazas y pepinos. Se especula que involucra la ruptura de la membrana por los compuestos lipofílicos (Barranco, 2004)

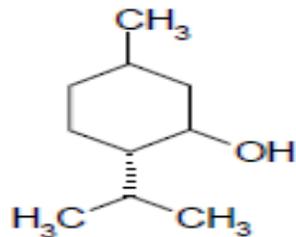


Figura 8. Estructura del mentol (terpenoides) (Barranco, 2004)

- **Fitoalexinas:** Son compuestos antimicrobianos sintetizados en el hospedador, de bajo peso molecular y amplio espectro, su síntesis es inducida en las plantas como respuesta a la infección microbiana. Hasta el momento se han identificado más de 200 fitoalexinas distintas en más de 20 familias de plantas. Las fitoalexinas son antibióticos de amplio espectro generalmente contra hongos y bacterias gram positivas. Los isoflavonoides (Figura 9), representan uno de los tipos más importantes de fitoalexinas. En el caso de compuestos relacionados estructuralmente con el grupo de fitoalexinas isoflavonoides en las células de las plantas se ha encontrado que un aumento de lipofilicidad se correlaciona positivamente con un aumento de la actividad antifúngica. Cabe mencionar que las fitoalexinas muestran efectos antimicrobianos adecuados a concentraciones relativamente altas (Shafiur, 2003).

Aunque el uso de las fitoalexinas en la conservación de alimentos se ha sugerido en muchas revisiones bibliográficas, todavía hay muy pocos ejemplos sobre su uso y el modo de acción contra los microorganismos.

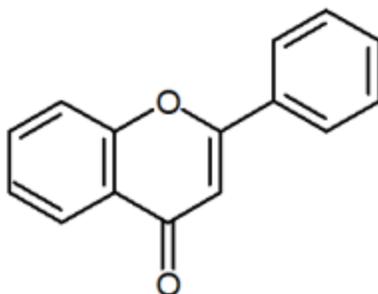


Figura 9. Estructura general de los isoflavonoides (Shafiur, 2003)

En muchos casos los antimicrobianos pueden no tener ningún efecto hasta que se rebasa una concentración crítica. Juven *et al.* (1994), utilizaron extractos de tomillo a diferentes concentraciones para tratar de inhibir *Salmonella typhimurium* y encontraron que había una concentración crítica donde el extracto tenía efecto, y a concentraciones menores no había actividad antimicrobiana. La interpretación de estos investigadores a este fenómeno fue que los compuestos fenólicos

sensibilizan la membrana celular, y al saturarse los sitios de acción, la célula sufre un daño grave, provocando que se colapse la membrana (Raybaudi, *et al.*, 2006).

Eklund (1989) mencionó que los compuestos utilizados como antimicrobianos tienen varios sitios de ataque dentro de las células microbianas y que dependiendo de las concentraciones utilizadas en los alimentos pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos (Hernández, 2003).

Capítulo 3. Tipos de antimicrobianos naturales de origen vegetal

3.1 Plantas, hierbas y especias

Las plantas, hierbas y especias han sido utilizadas desde la antigüedad para conservar los alimentos debido a su actividad antimicrobiana. Matamoros (1998), menciona la existencia de una gran cantidad de plantas, hierbas y especias como recurso potencial de compuestos antimicrobianos, éstos incluyen numerosas sustancias de bajo peso molecular, como compuestos derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente, son los más predominantes (Tabla 4), particularmente se ha encontrado en diversas plantas compuestos con actividad antifúngica pertenecientes a grupos químicamente diversos como flavonoides, fenoles, cumarinas y terpenos (Velázquez, 2010).

Tabla 4. Compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especias (Acero, 2011)

Planta, hierba o especia	Compuestos principales	Otros compuestos
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Dialil disulfuro, Dialil trisulfuro	Dietil sulfuro, alicina
Albahaca (<i>Ocimum Basilicum</i>)	d-linalol, metil cavicol	Eugenol, cineol, geraniol
Canela (<i>Cinnamomun zeylanicum</i>)	Aldehído cinámico	l-linalol, p-cimeno, eugenol
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	d-n-propil disulfuro	
Cilantro (<i>Coriandum sativum</i>)	d-linalol	d- α -pineno, β -pineno
Clavo de olor (<i>Syzygum aromaticum</i>)	Eugenol	Cariofileno
Comino (<i>Cuminum cyminum</i>)	Cuminaldehido	p-cimeno
Estragón (<i>Artemisia dracunculus</i>)	Metil cavicol	Anetol
Limonaria (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Citral	Geraniol
Mejorana (<i>Origanum marjorana</i>)	Linalol, cineol, eugenol	Metil cavicol
Mostaza (<i>Brassica hirta</i>)	Alil isotiocianato	
Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	Timol, cravacol	α -pineno, p-cimeno
Perejil (<i>Petroselinum crispum</i>)	α -pineno, fenol-eter-apiol	
Pimienta negra (<i>Pipper nigrum</i>)	Monoterpenos, sesquiterpenos	Compuestos oxigenados
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Borneol, cienol	Canfor, α -pineno
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	Timol	Carvacrol. l-linalol, geraniol
Vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>)	Vainillina	Ácidos p-hidroxibenzóicos

Las especias son raíces, cortezas, semillas, hojas o frutos de plantas aromáticas que se añaden a los alimentos como agentes saborizantes. Sin embargo, se sabe desde tiempos antiguos que las especias y sus aceites esenciales tienen diferentes grados de actividad antimicrobiana. El primer reporte del uso de las especias como conservadores se remonta a unos 1,550 años a.C., cuando los antiguos egipcios las empleaban para conservar alimentos y embalsamar a los muertos. Muchas partes de plantas y sus extractos usados como especias y hierbas han mostrado efectos antimicrobianos contra bacterias y hongos. Dentro de las bacterias patógenas adversamente afectadas por un amplio rango de compuestos presentes en esos condimentos se incluyen: *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*. El crecimiento de mohos micotoxigénicos, tales como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium urticae* y *Penicillium roquefortii* es retardado o inhibido, así como también el de mohos, levaduras y bacterias causantes del deterioro de alimentos (Raybaudi *et al.*, 2006).

La mayoría de las especias (Tabla 5), tienen una función conservadora debido a los aceites esenciales que poseen, en cuya composición tienen compuestos tipo eugenol o aldehído cinámico con poder antimicrobiano. También presentan actividad antimicrobiana las oleorresinas de estas especias (Petroni, 2006).

Tabla 5. Ejemplos de especias que inhiben el crecimiento de microorganismos como bacterias gram-positivas (Petroni, 2006)

Especias	Niveles de poder de conservación
Canela, clavo y mostaza	Alto
Pimienta negra/roja, jengibre	Débil
Laurel, cilantro, comino, orégano, romero, salvia y tomillo	Bajo
Anís, menta, hinojo, apio, eneldo, cúrcuma	Sin identificar

Muchas plantas, hierbas y especias han sido reportadas por poseer propiedades antimicrobianas, sin embargo, existe una gran desventaja en su uso como antimicrobiano debido a que se tiene que usar una alta concentración para obtener un efecto de preservación, ocasionando alteraciones en el sabor del alimento. Por lo tanto el uso de hierbas, plantas y especias como agentes antimicrobianos está limitado hacia los alimentos en los cuales el cambio en el sabor es considerado como indeseable (Hernández, 2003).

3.2 Oleorresinas

Las oleorresinas son extractos de naturaleza oleosa extraídas de especias o diferentes plantas que proporcionan a los productos color, sabor y aroma. De acuerdo con la comunidad económica europea (CEE) son “extractos de especias de los que se ha evaporado el disolvente de extracción dejando una mezcla de aceite volátil y el material resinoso de la especia”. Considerando su carácter oleoso, las técnicas más apropiadas para extraer las oleorresinas son aquellas que emplean solventes, como la lixiviación con solventes orgánicos como el hexano, acetato de etilo y acetona (Restrepo, 2006).

La aplicación de estos extractos como antimicrobianos naturales está relacionada con estructuras químicas específicas presentes en los vegetales de origen. Como ejemplo se puede mencionar al carvacrol y el timol en el orégano, el ácido carnósico en el romero, la capsaicina en los ajíes picantes, la curcumina en la cúrcuma, el eugenol en el clavo de olor, en el laurel y en la albahaca, así como otros compuestos presentes en vegetales (Tabla 6). Algunos de estos compuestos poseen actividad antibacteriana, otros muestran una actividad antifúngica y algunos con actividad antioxidante. Además, algunos de estos compuestos se

encuentran en la fracción volátil, como el carvacrol, el timol y el eugenol, y otros en la fracción no volátil, como la curcumina, la capsaicina y el ácido carnósico.

Es decir, los componentes con actividad antimicrobiana y/o antioxidante de diferentes vegetales se encuentran presentes en diferentes fracciones (Moyano, 2007).

Tabla 6. Vegetales de donde se extraen oleorresinas (Moyano, 2007).

Pimienta negra	Semilla de apio	Curry	Ajo	Nuez moscada
Jengibre	Semilla de hinojo	Capullo de clavo	Cápsicum	Resinoide olibanum
Cardamomo	Semilla de cilantro	Fenugreco	Enebro	Hierbas cítricas
Cassia	Semilla de comino	Jengibre rojo	Semilla de perejil	Cebolla

Las oleorresinas presentan ciertas ventajas con respecto a otros antimicrobianos en el mercado tales como (Restrepo, 2006):

- *Economía.* Puede darse un remplazo de hasta 100 Kg del producto en polvo, por 1-2 Kg de oleorresina, dependiendo de la concentración de esta última.
- *Uniformidad.* Los ingredientes activos color, sabor, aroma y propiedades físicas son estandarizadas.
- *Natural.* Es un producto 100% natural libre de residuos de solventes orgánico.
- *Pureza.* Son productos libres de impurezas y materia extraña.
- *Esterilidad.* No presenta contaminación microbiana.
- *Cumplimiento de las especificaciones:* La FDA la ha clasificado como GRAS, lo que permite su libre adición dentro de las formulaciones.
- *Mayor vida de anaquel.* La alta concentración de las oleorresinas y el estar prácticamente libres de agua, asegura esta condición debido a la baja degradación por oxidación o pérdida de sabor.

- *Posibilidad de dilución.* El extracto concentrado puede ser diluido para obtener diferentes concentraciones a fin de adecuar el producto a las necesidades del consumidor.

3.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (A.E.) son compuestos líquidos aceitosos muy olorosos obtenidos a partir de diferentes partes de plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces. De acuerdo a sus características químicas estos aceites están compuestos por mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además son compuestos muy solubles en alcohol y poco solubles en agua. Para la extracción de estos compuestos se pueden utilizar distintos solventes (acetato, etanol, y cloruro de etileno) en conjunto con métodos como la destilación. Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos (Huertas, 2005., Raybaudi *et al.*, 2006)

De los millones de plantas existentes en nuestro planeta se conocen alrededor de 4000 aceites esenciales distintos, de los cuales las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de esencias (Velázquez, 2010).

La actividad de un aceite esencial está relacionada con sus constituyentes principales y (estos pueden contribuir hasta un 85% del total, mientras que el resto se presentan como trazas), la configuración estructural y grupos funcionales de sus compuestos con posibles sinergia entre éstos (Huertas, 2008).

Cabe mencionar que los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar por sus propiedades determinadas genéticamente, diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Raybaudi *et al.*, 2006).

Por lo tanto el mecanismo de acción de los aceites esenciales se debe a que presentan normalmente un gran número de compuestos volátiles, hidrofóbicos y muy lábiles, por lo que su acción antimicrobiana se atribuye a varios mecanismos como la desestabilización de la membrana citoplasmática, la interrupción en la fuerza protón motriz (FPM), el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación de componentes celulares, también pueden actuar sobre las proteínas de la membrana citoplasmática, así como los hidrocarburos lipofílicos pueden acumularse en la bicapa lipídica e interferir en la interacción lípido-proteína, además, también es posible una interacción directa entre los compuestos lipofílicos con la parte hidrofóbica de la proteína. Como consecuencia, pueden modificar la actividad de las enzimas que regulan la producción de energía o la síntesis de compuestos estructurales. Una característica importante de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, característica que les permite unirse a los lípidos de la membrana celular desestabilizando su estructura y aumentando su permeabilidad, generando la salida de iones, metabolitos y demás moléculas. La mayoría de las propiedades antibacterianas frente a microorganismos patógenos por parte de los aceites esenciales se debe a que estos contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el timol, el carvacrol y el eugenol (Huertas, 2008).

Por todo lo mencionado con anterioridad, el interés en la aplicación de aceites esenciales para el control de patógenos se ha incrementado en años recientes, debido a que poseen características especiales y presentan un gran potencial en la conservación de alimentos. Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias y hongos. Por lo que los estudios “in vitro” realizados con aceites esenciales han demostrado que la actividad antimicrobiana está influida por el medio de cultivo, la temperatura de incubación y el tamaño del inóculo utilizado, así mismo las características de los microorganismos son también importantes sobre la efectividad de los aceites esenciales. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias de diferentes aceites esenciales probados contra distintos microorganismos patógenos transmitidos por alimentos (Raybaudi *et al.*, 2006).

Tabla 7. Concentraciones mínimas inhibitorias de aceites esenciales probados “in vitro” contra microorganismos patógenos transmitidos por alimentos (Raybaudi et al., 2006).

Planta de la cual se deriva el A.E	Especie bacteriana	CMI rango aproximado ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
Romero	<i>Escherichia coli</i>	4.5 \geq 10
	<i>Salmonella typhimurium</i>	> 20
	<i>Bacillus cereus</i>	0.2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.4 - 10
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.2
Orégano	<i>Escherichia coli</i>	0.5 - 1.2
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1.2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5 - 1.2
	<i>Escherichia coli</i>	0.6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	2.5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.6
	<i>Escherichia coli</i>	3.5 - 5
	<i>Salmonella typhimurium</i>	10 - 20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.75 - 10
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.2
	<i>Escherichia coli</i>	0.4 – 2.5
	<i>Salmonella typhimurium</i>	> 20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.4 – 2.5
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.3
	<i>Escherichia coli</i>	0.45 – 1.25
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.450 > 20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2 – 0.25
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.156 - 0.45
	<i>Escherichia coli</i>	>0.2
	<i>Bacillus cereus</i>	0.2
	<i>Escherichia coli</i>	2.5 - 80
	<i>Shigella dysenteria</i>	5 - >80
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.6 - 40
	<i>Bacillus cereus</i>	5 - 10

CMI = Concentración mínima inhibitoria
A.E.= Aceite esencial

3.3.1 Aceites esenciales derivados de plantas usados como antimicrobianos.

Recientemente, en la industria alimentaria existe un considerable interés en los extractos y aceites esenciales derivados de las plantas debido a su propiedad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Rhizopus spp.*, que han sido reportados como agentes causantes de enfermedades producidas por los alimentos y/o descomposición de los mismos (Acero, 2011).

Los compuestos antimicrobianos en las plantas están comúnmente contenidos en la fracción del aceite esencial de las hojas (romero, cilantro), flores y brotes de flores (clavo, tomillo, orégano), bulbos (cebolla, ajo), frutas (pimiento) u otras partes de la planta (Acero, 2011). La efectividad de tales aceites se ha visto confirmada inhibiendo el crecimiento de diversos hongos y bacterias.

A continuación se mencionan solo algunos ejemplos de las numerosas plantas que contienen compuestos antimicrobianos.

- **Clavo (*Syzygium aromaticum*)**, es una planta comúnmente utilizada como especia, ha sido usada desde tiempos antiguos en la medicina tradicional, teniendo usos de expectorante, estimulante, analgésico y en la odontología como antiséptico. El aceite esencial proveniente del clavo está constituido por 36 componentes predominando principalmente el eugenol, siguiendo el β -cariofileno, α -humuleno, epóxido de humuleno, etil hexanoato, 2-heptanona, humulenol, calacoreno y calameneno. (Huertas, 2008).

El eugenol (Figura 10) pertenece al grupo de los fenilpropanos que son sustancias ampliamente distribuidas entre los vegetales y se caracterizan por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikímico 2-metoxi-4-(2-peopenil) fenol, donde los

compuestos con estructura fenólica demostraron tener una actividad antimicrobiana superior debido a su carácter hidrofóbico. Se cree que el grupo hidroxilo localizado en la estructura fenólica le da una mayor capacidad antimicrobiana debido a la posible interacción del grupo hidroxilo con proteínas inhibiendo su acción. Estudios han comprobado la eficacia del aceite esencial del clavo como antimicrobiano pero todavía no se conoce muy bien su forma de acción, pero se sabe que el componente responsable de esta actividad antimicrobiana es el eugenol. Kamel y col. 2007, determinaron la acción antibacteriana del eugenol extraído del clavo sobre *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Micrococcus luteus* (Huertas, 2008).

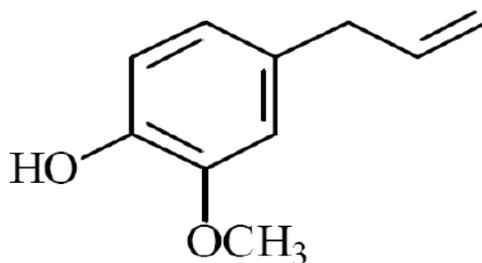


Figura 10. Estructura del eugenol (Huertas, 2008)

- **Tomillo (*Thymus vulgaris*)**, es una planta a la cual se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, expectorantes, antisépticas, antiinflamatorias y otras más. El tomillo es usado en la industria alimentaria como agente saborizante y aromático y en las preparaciones farmacológicas su aceite esencial esta en el ranking de los 10 aceites esenciales más usados en el mundo. Se sugiere que la presencia y el número de grupos hidroxilo sobre el grupo fenol está relacionado con su toxicidad ya que una mayor hidroxilación es responsable de una mayor capacidad bactericida. La presencia del grupo hidroxilo en la molécula de carvacrol, al igual que en el timol, provoca la entrada y el escape de iones potasio, que conlleva a la disminución del pH, el aumento en el gasto de energía (ATP) y, finalmente, la muerte celular del

patógeno. El aceite esencial que se obtiene del tomillo está compuesto por 60 componentes de los cuales el timol y el carvacrol se les atribuye la capacidad antibacteriana y se da alguna responsabilidad pequeña a los componente minoritarios como lo son el p-cimeno, γ -terpineno y β -cariofileno los cuales pueden actuar de manera sinérgica con el timol y el carvacrol aumentando su capacidad antimicrobiana. Autores como Burt (2004), en su revisión afirma que el timol está entre un 10 a un 64%, el carvacrol está entre un 2 a 11%, por otro lado Bounatirou *et al.*, (2007), comentan que el p-cimeno está en mayores cantidades cuando el carvacrol está en menores cantidades y esto se presenta cuando la parte de la planta que se usa para la extracción del aceite esencial es muy joven, y aseveran que este aceite es el precursor del carvacrol (Huertas, 2008).

El timol y el carvacrol (Figura 11), son compuestos fenólicos que son similares estructuralmente difiriendo en la posición del grupo hidroxilo. Como ya se menciono anteriormente, los compuestos con estructura fenólica poseen una mayor actividad antimicrobiana que los que no la poseen y la presencia y localización del grupo hidroxilo es un factor importante en esta actividad. (Huertas, 2008).

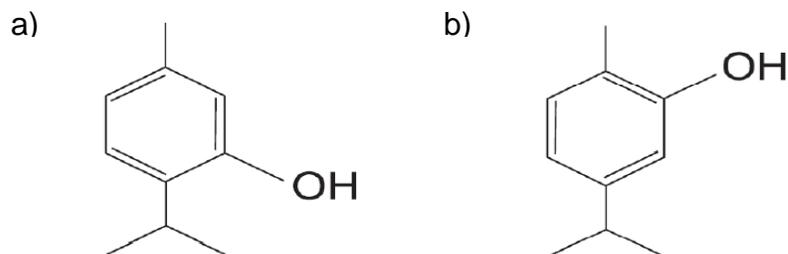


Figura 11. Compuestos de: a) timol, b) carvacrol, presentes en el tomillo (Huertas, 2008)

- **Orégano (*Origanum vulgare*)**, comprende varias especies de plantas que son utilizadas con fines culinarios. Entre los aceites esenciales del orégano se encuentran como componentes principales el limoneno, el β -cariofileno, el p-cimeno, el canfor, el linalol, α -pineno, el carvacrol y el timol (Figura 12).

Algunas propiedades de los extractos del orégano han sido estudiadas debido al creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos. El orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Presentan además capacidad antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida .tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*. Los fenoles (carvacrol y timol) poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *Pseudomona aeruginosa*, siendo el timol más activo. Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales de orégano se han establecido entre 0.28-1.27 mg mL⁻¹ para bacterias, y de 0.65-1.27 mg mL⁻¹ para hongos (Arcila *et al.*, 2004)

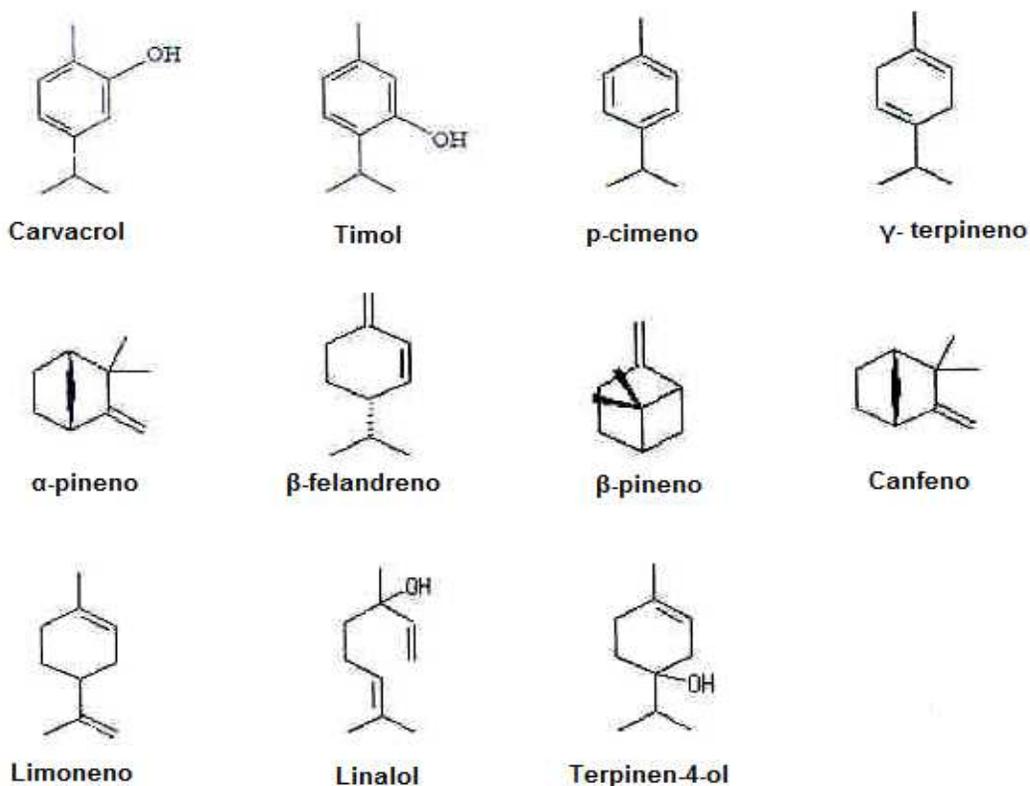


Figura 12. Estructura química de los principales componentes en orégano (Arcila *et al.*, 2004).

- Cebolla (*Allium cepa*)**, pertenece a la familia de las *Liliáceas*, es la parte subterránea en forma de bulbo (amarillo o rojo violáceo) de una pequeña planta. La cebolla es uno de los alimentos ricos en flavonoides como antocianos y quercetina (Figura 13), y en compuestos azufrados como sulfóxido, alquil y cisteína, por lo tanto la cebolla, goza de diferentes propiedades como: digestiva, anticancerígena, antioxidante y antimicrobiana (antifúngica y bactericida), estas dos últimas propiedades la hacen una candidata perfecta para usarse como antimicrobiano natural. Además, estos compuestos tienen funciones tales que confieren color a los alimentos y destacan por tener la capacidad para fijar metales como el hierro en el organismo. Expertos han realizado un análisis de las diferentes variedades de cebolla y han determinado que los compuestos fenólicos que contienen son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos. El estudio ha sido efectivo contra el desarrollo de bacterias como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes*, cuatro de los patógenos más habituales en el deterioro de los alimentos. (Santas *et al.*, 2010).

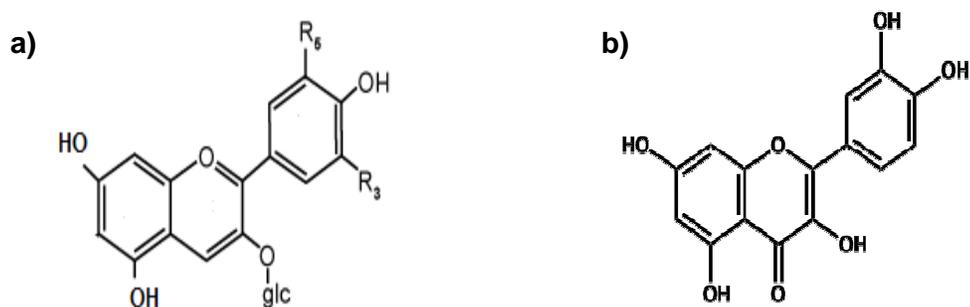


Figura 13. Estructuras generales de flavonoides presentes en cebolla: a) antocianina, b) quercetina (Cano *et al.*, 2006)

- **Ajo (*Allium savitum*)**, es una planta comúnmente utilizada como agente saborizante y condimento en los alimentos, pertenece a la familia de las *liláceas* junto con la cebolla y el puerro. Es probablemente el alimento con potencial antimicrobiano más consumido. Las propiedades medicinales del ajo, han sido estudiadas desde hace siglos. Sin embargo, hasta los años cuarentas, que aparece evidencia científica de sus propiedades antimicrobianas: Cavallito y Bailey en 1994, fueron los primeros en aislar el componente antimicrobiano del ajo a partir de bulbos frescos, utilizando destilación por arrastre con vapor. Identificaron al compuesto obtenido como *alicina* o *ácido dialiltiosulfónico* (Figura 14). Este compuesto, se describe como un aceite altamente aromático, incoloro y el responsable del olor característico en el ajo y la cebolla. En pruebas de laboratorio, la *alicina* se muestra como bactericida con un amplio espectro para microorganismos Gram positivos (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*) y gram negativos. En los tejidos frescos de ajo, se encuentra la *alinalina* (S- alil-L- cisteína-S-óxido), la cual por medio de hidrólisis se convierte en *alicina*, *piruvato* y *amonio*. Por lo tanto el mecanismo de la actividad antimicrobiana del ajo, se basa en la inhibición de la actividad de enzimas como: *fosfatasa alcalina*, *invertasa*, *ureasa* y *papaína*, así como de enzimas *sulfhídricas*. La *alicina* inhibe la actividad de enzimas *sulfhídricas* debido a la presencia de los grupos químicos S-O-S. La mayoría de estas enzimas son inhibidas a concentraciones 0.0005 molar de *alicina*. Esto incluye a *ureasa*, *papaína*, *colina estereasa*, *hexocinasa*, *trisfosfatodeshidrogenasa*, *carboxilasas*, *adenosin trifosfato* y *beta amilasa*. Igualmente, muestra inhibición para enzimas no *sulfhídricas* como *lactodeshidrogenasa*, *tirosinasa*, *fosfatasa alcalina*. Trabajos realizados sobre la actividad antimicrobiana del ajo, hacen referencia a su acción sobre bacterias patógenas, mohos micotoxigénicos y microorganismos deteriorativos, organismos que tienen en común las enzimas *sulfhídricas*. Además un gran número de levaduras y mohos son susceptibles a la acción inhibitoria del ajo. El jugo de ajo resulta efectivo para atacar a

Candida albicans, esto debido a la habilidad de inactivar a las proteínas por oxidación de los tioles (Hernández, 2003).

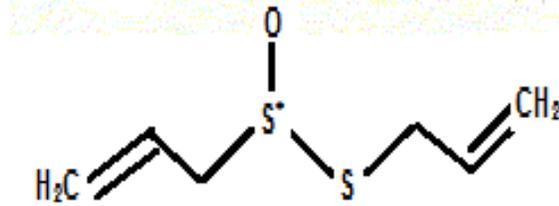


Figura 14. Álicina, compuesto antimicrobiano del ajo (Hernández, 2003).

Capítulo 4. Eficiencia de los agentes antimicrobianos

4.1 Criterios para evaluar la eficiencia de los antimicrobianos naturales (Hernández, 2003)

Existe un número importante de reportes acerca de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas, aceites, especias y condimentos, por lo que es difícil obtener estimaciones cuantitativas y hacer comparaciones de su efecto debido entre muchos otros factores, a la gran variedad de métodos que se han utilizado para evaluar su efectividad.

Criterios para poder evaluar la eficiencia de los agentes antimicrobianos:

- Es importante para la aplicación de los antimicrobianos de origen natural, comprobar su eficacia “in vitro”, en medios microbiológicos y en productos alimenticios. Las pruebas “in vitro” proporcionan información valiosa acerca de la efectividad de un compuesto, y pueden ser evaluados de igual manera, las variables que afectan a la actividad antimicrobiana, depende de cómo se ha observado, del tipo, género, especie, y microorganismos a probar.
- Una variable asociada a la efectividad de un agente antimicrobiano en los alimentos, es el número inicial de microorganismos en el sistema. Debido a que la mayoría de los antimicrobianos son bacteriostáticos más que bactericidas.
- Algunos factores intrínsecos y extrínsecos o variables asociados a la aplicación de los agentes antimicrobianos a los alimentos se determinan en las pruebas “in vitro”. Estas incluyen temperatura, atmósfera, pH, potencial de óxido-reducción y actividad de agua. Para el éxito de estas pruebas, se requiere que estos factores sean controlados.
- Las variaciones en la preparación del antimicrobiano se debe a la pureza del método de extracción y esterilización (calor, filtración por membrana).

- El tiempo de exposición del antimicrobiano sobre el producto debe ser cuidadosamente controlado para establecer resultados significativos.
- El número inicial de microorganismos, debe ser consistente para obtener resultados reproducibles.
- El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación y la exposición debido a que en la mayoría de los casos, el incremento de la temperatura de exposición incrementa la actividad del antimicrobiano. Por lo que la temperatura de incubación debe ser la óptima para el microorganismo a probar.
- La composición de la atmósfera, juega un rol muy importante, es necesario definir si el microorganismo es anaerobio o no.

Estas pruebas mencionadas muestran los problemas potenciales que se pueden encontrar en los sistemas alimenticios. Para el éxito de dichas pruebas, es necesario que las propiedades del agente antimicrobiano, se especifiquen dentro de un esquema de aplicación para conocer los propósitos del mismo.

4.2 Métodos de prueba para la eficiencia de los agentes antimicrobianos (Hernández, 2003).

Los métodos que se utilizan para evaluar la actividad de los antimicrobianos (Tabla 7), se pueden dividir en: pruebas “in vitro” y pruebas de aplicación. Estas últimas, también se conocen como “métodos de barrido” y pueden incluir cualquier prueba en la que el compuesto no se aplica de manera directa al sistema alimenticio; generalmente, este tipo de pruebas, proveen información preliminar para determinar la eficacia del compuesto. Las pruebas “in vitro”, incluyen pruebas en las que el agente antimicrobiano se aplica directamente al producto.

Tabla 8. Métodos para evaluar la eficacia de los antimicrobianos naturales (Hernández, 2003).

Métodos exploratorios	
a)	Métodos de evaluación de punto final
	▪ Difusión en agar
	▪ Dilución en agar y caldo
	▪ Pruebas para desinfectantes
	▪ Gradiente en placa
b)	Métodos descriptivos
	▪ Ensayos turbidimétricos
	▪ Curvas de inhibición o muerte
c)	Métodos aplicados
	▪ Curvas de inhibición o muerte
	▪ Punto final
d)	Métodos para evaluar mezclas de sustancias

Davidson y Parish (1989) mencionan que para la aplicación de cualquiera de éstos métodos deben controlarse los demás factores que puedan intervenir en la respuesta del microorganismo (temperatura, pH, actividad de agua, nutrientes) y señalan que uno de los factores es el propio microorganismo, es decir, depende del tipo, género, especie y cepa del organismo de prueba. El número inicial de células o esporas utilizadas durante los ensayos con el antimicrobiano debe ser consistente para asegurar que los resultados son reproducibles.

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

4.3 Efecto de mezclas entre agentes antimicrobianos

Se ha observado que las concentraciones en que se requieren los antimicrobianos naturales son más altas en alimentos que en medios de cultivo, dañando significativamente el sabor de los alimentos, por lo que su efectividad puede reforzarse con el uso de otros aditivos o combinaciones sinérgicas con otros compuestos, reduciendo así las concentraciones necesarias para lograr la eficacia deseada, evitando cambios en las características organolépticas del producto original.

Por lo tanto es necesario realizar evaluaciones de mezclas de agentes antimicrobianos por lo ya mencionado, además, de que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un solo agente antimicrobiano, pero al exponerlo a una mezcla estos pueden aumentar su actividad antimicrobiana. Algunas de las razones por las que se utilizan mezclas de antimicrobianos para la inhibición de microorganismos se deben a que:

- La probabilidad de que algunas colonias desarrollen resistencia al agente antimicrobiano cuando se use cotidianamente.
- Se limita la concentración permitida de ciertos agentes antimicrobianos ya que a altas dosis tienen efectos tóxicos, impidiendo la inhibición o eliminación de microorganismos.
- En el caso de la medicina se usan combinaciones porque existen infecciones en las que más de un microorganismo está presente. En estos casos se emplean agentes que tengan acción contra los principales patógenos.

Cuando se combinan dos o más antimicrobianos, pueden suceder tres efectos.

- 1) Puede haber un efecto aditivo, lo que significa que es igual a la suma de los efectos observados con los agentes probados individualmente o igual al

agente más activo en la combinación”. El efecto aditivo ocurre cuando la actividad microbiana del compuesto no aumenta ni disminuye con la presencia de otro agente.

- 2) Sinergismo, “el efecto que se observa con una combinación es mayor que la suma de los efectos observados de los agentes probados individualmente”. El sinergismo se refiere al incremento de la actividad antimicrobiana de un compuesto con la presencia de un segundo agente antimicrobiano.
- 3) El efecto antagónico ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto es reducida con la presencia de un segundo agente antimicrobiano.

4.4 Efecto de los Antimicrobianos naturales sobre la salud (Raybaudi *et al.*, 2006).

En contraste a lo que normalmente se pensaba sobre el efecto negativo que podría tener el uso de compuestos fenólicos sobre la nutrición y la salud en humanos, se ha encontrado que muchos de estos compuestos tienen efectos protectores. Específicamente en las áreas de nutrición y cáncer se ha demostrado que esos compuestos protegen los tejidos contra los efectos tóxicos y neoplásicos de un amplio rango de carcinógenos.

Sin duda, el aspecto más importante del uso de compuestos antimicrobianos es el toxicológico. Se tiende a pensar que los compuestos naturales que tienen actividad antimicrobiana son menos tóxicos que los sintéticos, sin embargo no siempre es así. Para que un compuesto con actividad antimicrobiana se considere apropiado para ser utilizado en alimentos se debe demostrar que no tiene efectos tóxicos a través de estudios con animales o que no es responsable de alteraciones de la salud al ser consumido con regularidad en alimentos como las especias.

El problema está en que las concentraciones necesarias de especias o compuestos extraídos de ellas, para lograr la inhibición del crecimiento microbiano normalmente son mayores que las consumidas con regularidad, por lo que determinar la toxicidad de un compuesto derivado de una especie por consumo en humanos es sumamente difícil.

Por otra parte, es importante que se demuestre que esas sustancias son metabolizadas, excretadas, que no dejan residuos en el organismo y que no destruyen nutrimentos importantes presentes en los alimentos, para que el efecto de los antimicrobianos sea realmente seguro para la salud del consumidor

4.5 Futuro de los antimicrobianos de origen natural

El futuro de los antimicrobianos de origen natural, se encuentra determinado por la actitud del consumidor actual ante los conservadores químicos. Los antimicrobianos de origen natural, se consideran como fuentes potencialmente seguras, pero su uso real en los productos alimenticios, se ha establecido para pocos casos. Cualquiera de estos extractos, obtenidos de productos vegetales deberá ser sometido a rigurosos estudios toxicológicos. (Hernández, 2003).

4.6 Estudios que demuestran la efectividad de los antimicrobianos naturales

Estudios realizados por Gill *et al.* (2006), dedujeron aparentemente que los componentes de los aceites esenciales de origen vegetal interaccionan con las ATPasas que están presentes en la membrana citoplasmática, en su investigación determinaron que el eugenol, el carvacrol, y el cinamaldehído, componentes de aceites esenciales, inhibían la actividad de la ATPasa de la membrana de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Las membranas bacterianas contienen

un alto número de diferentes enzimas con función ATPasa incluyendo aquellas involucradas en el transporte activo de proteínas, como la ATPasa F_1F_0 que es la encargada de la regulación del pH celular. La inhibición de estas funciones puede afectar la sobrevivencia celular, las concentraciones para inhibir la actividad de las ATPasas es la misma que se necesita para la desestabilización de la membrana celular, lo que sugiere que la interrupción de las funciones de estas enzimas es una causa secundaria más que una primaria de la muerte celular. (Huertas, 2008)

Otra investigación de Gill *et al.* (2005), permitió evidenciar que el carvacrol y el eugenol presentes en orégano, tomillo y clavo aumentan la permeabilidad de la membrana afectando la movilidad de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* ofreciendo gran evidencia que la desestabilización de la membrana es la causa primaria de la muerte celular por acción de estos compuestos. El flagelo de estas bacterias esta estructuralmente integrado a la membrana y el cual recibe energía proveniente del gradiente de protones más que por los intermediarios fosforilados del ATP (Huertas, 2008).

En la edición de febrero de la revista Trends in Food Science and Technology, se publica un artículo en el cual sus autores proponen el uso de los aceites esenciales de citrus que ya se utilizan en alimentos, específicamente, los de naranja, limón, lima y pomelo, que han demostrado tener un efecto inhibitor del crecimiento de bacterias tanto gram (+) como gram (-), además de ser seguras. El uso de estos aceites podría constituir una limitación o condicionar su uso en cualquier tipo de alimento por sus características organolépticas.

El mecanismo de acción de los aceites esenciales del citrus es aún desconocido. Algunas teorías indicarían que podrían inducir cambios morfológicos a nivel de la membrana celular, lo cual estaría sustentado por algunos estudios que demostraron la desintegración de la membrana celular externa; otros observaron un engrosamiento y disfunción en la pared celular.

Hasta el momento se ha investigado la utilización de estos aceites esenciales en algunos alimentos, tales como pescados, carnes y lácteos.

Pescado: La aplicación de citral y linalool redujo la microflora en piel, intestinos y branquias de pescado (carpas) conservada a 20°C por 48 horas.

Carne: Se aplicó esencia de limón y naranja en polvo a albóndigas empleando una concentración del 5%, demostrando su efectividad ante microorganismos más frecuentes de la carne durante 12 días.

Lácteos: Los paneles de degustación indicaron que solamente sería aceptable el uso de las esencias de limón, naranja y pomelo en leche. Sin embargo solo el terpineol resultó ser efectivo contra la *Salmonella senftenberg*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas spp.* (Fisher y Philips, 2008).

Según un estudio realizado por expertos del Institute of Food Technologists (IFT) de EEUU, el apio, la almendra, el café y el arándano son algunos de los alimentos que contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana. Los estudios han demostrado que los arándanos son una manera natural de garantizar la seguridad de la carne, ya que sus propiedades ocasionan la reducción del desarrollo de *Salmonella*, *Escherichia coli* y otros tipos de bacterias. Tras aplicar un concentrado de arándano sobre carne picada cruda con varios tipos de bacterias, los expertos concluyen que se reduce de forma considerable el crecimiento de patógenos. Por lo tanto el arándano constituye una herramienta natural y eficaz en la lucha contra patógenos en alimentos. El responsable de que ocurra esta acción es el compuesto denominado proantocianidina (PAC), que obstaculiza la adherencia de las bacterias, sobre todo las de *Escherichia coli*. Los expertos confían en que el arándano constituya, en un futuro, una manera natural de reducir la contaminación de los alimentos (Chavarrías, 2006).

Por otro lado, estudios realizados también por expertos del Institute of Food Technologists (IFT) de EEUU, determinaron que la vainillina, componente cristalino de la vaina de la vainilla, se perfila como un sustituto, total o parcial, del ácido sórbico y de los sulfitos en la conservación de alimentos. Este compuesto ha demostrado ser especialmente eficaz en frutas como la manzana, las fresas o el mango (Chavarrías, 2006).

Xie *et al.* (2003), realizaron estudios con extractos de hojas de *Ginkgo biloba* y demostraron su efecto antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes*, observaron que los extractos de las hojas de esta planta redujeron los niveles de población de *Listeria monocytogenes*, tomando en cuenta que este efecto se hizo más pronunciado a bajas temperaturas (4°C). Además demostraron que la adición de EDTA (1.6 mg/ml) aumentó la actividad antimicrobiana (Raybaudi *et al.*, 2006).

Lanciotti, *et al.* (1999), en estudios realizados ha demostrado que en algunos aldehídos como el hexanal y su derivado trans-2-hexanal, que son moléculas naturalmente presentes en manzanas (compuestos volátiles característicos del aroma) han mostrado tener efectos antimicrobianos al aplicarlos en manzanas frescas, logrando aumentar su vida útil (Raybaudi *et al.*, 2006).

Roller y Seedhar (2002), En frutas específicamente, estudiaron el efecto de diferentes aceites esenciales sobre la extensión de la fase de latencia de crecimiento y la reducción en el nivel de la población final de la flora naturalmente presente en melón y kiwi (Raybaudi *et al.*, 2006).

Nychas (1995) demostró el efecto del extracto fenólico del té negro, el cual puede ser catalogado como un agente bacteriostático o bactericida contra microorganismos como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* (Hernández, 2003).

Capítulo 5. Conclusiones

Esta investigación bibliográfica menciona que se han identificado más de 1340 plantas como potenciales fuentes de antimicrobianos naturales, estos son procedentes de extractos, aceites esenciales y oleorresinas de hojas, flores, bulbos, rizomas y frutos de una planta, que contienen un gran número de compuestos glucosídicos, fenólicos, ácidos orgánicos, terpenos y fitoalexinas, con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos, a través de sus sitios de acción de la célula microbiana tales como la pared celular, membrana celular, la síntesis de proteína y en el sistema genético, todos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos.

De las sustancias mencionadas anteriormente los compuestos glucosídicos actúan directamente sobre las mitocondrias inhibiendo la producción de energía a la célula microbiana.

Otros de los compuestos que inhiben la actividad metabólica de los microorganismos son los ácidos orgánicos cuya acción tiene como objetivo la pared celular, la membrana celular, las enzimas metabólicas, el sistema de síntesis de las proteínas y el material genético, estos ácidos son activos contra una gama amplia de microorganismos debido a que pueden ser alterados estructuralmente por los cambios de pH.

En el caso de los compuestos fenólicos se cree que los grupos hidroxilo presentes en éstos, son los que tienen la capacidad de acomplejar proteínas extracelulares y de la pared celular bacteriana, pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionan con la membrana celular y alteran la función del material genético. Y se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura afecta su actividad antimicrobiana.

Así mismo los terpenos son compuestos que no han sido tan estudiados como antimicrobianos, pero se especula que éstos se involucran en la ruptura de la membrana celular por los compuestos lipofílicos que presentan.

El uso de las fitoalexinas en la conservación de alimentos se ha sugerido en muchas revisiones bibliográficas, pero todavía hay muy pocos ejemplos sobre su uso y el modo de acción contra los microorganismos. Las fitoalexinas son compuestos que actúan como antibióticos de amplio espectro generalmente contra hongos y bacterias gram positivas y se ha encontrado que un aumento de lipofilidad se correlaciona positivamente con un aumento de la actividad antifúngica.

La búsqueda de alternativas para el uso de agentes antimicrobianas de origen natural se debe en gran parte a que las legislaciones de muchos países, han restringido y/o modificada el uso de antimicrobianos de origen químico debido que han causado ciertas alteraciones en la salud a los consumidores, es por ello que se ha generado la necesidad de buscar otros tipos de conservación que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y que tengan una compatibilidad con el alimento.

La FDA propone el uso de antimicrobianos naturales de origen vegetal como sustancias del tipo GRAS, por lo que considero que es una alternativa para la disminución en la utilización de antimicrobianos químicos tradicionales, lo que significa una opción viable y productiva para pequeñas, medianas y grandes empresas, debido a que nuevas tendencias en el procesamiento de alimentos proponen tener un producto lo más cercano a un alimento fresco y natural, permitiéndole al consumidor tener alimentos con una vida de anaquel amplia, inocuos y que puedan ser consumidos con toda seguridad.

Cabe mencionar que últimamente la cuestión sobre inocuidad y seguridad alimentaria ha recibido gran atención por parte de los consumidores, por lo que hay que cuidar el uso de términos como "tóxico", "nocivo" o "seguro". Cualquiera

sustancia si no se usa o aplica correctamente puede ser dañina, el factor de seguridad radica por tanto en la cantidad ingerida. Todo lo consumido en cantidades excesivas es tóxico, incluso las sustancias más "inofensivas", de ahí la importancia de tener en cuenta el refrán según el cual "solo la dosis hace el veneno".

En la actualidad se usan los agentes antimicrobianos naturales de aceites esenciales de citrus (naranja, limón, lima y pomelo) que son aplicados en pescado reduciendo la microflora en piel, intestinos y branquias de pescado (carpas). En carne se aplican esencias de limón y naranja en polvo demostrándose su efectividad contra microorganismos patógenos como *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. botulinum*. En lácteos solamente es aceptable el uso de las esencias de limón, naranja y pomelo en leche resultando ser efectivo contra la *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* y *Pseudomonas* spp. También se han usado de aceites esenciales de orégano, tomillo y citrus (mandarina, limón y lima), como agentes antimicrobianos naturales para la reducción de la flora microbiana naturalmente presente en frutas frescas y frescas cortadas estas últimas envasadas bajo diferentes atmósferas y refrigeradas, con el fin de prolongar su vida útil.

Las hierbas, plantas y las especias por ejemplo canela, clavo, ajo, cebolla, orégano, tomillo, romero y clavo siempre han sido utilizados en la elaboración de alimentos como condimentos y en la conservación de alimentos elaborados de forma artesanal o casera.

Otro tipo de antimicrobiano natural es la oleoresina de pimentón que es un extracto de los frutos del *Cápsicum* (chile rojo indio), y se aplica principalmente como colorante, aromatizante y antimicrobiano, en alimentos como queso, jugo de naranja salsas, dulces y carnes procesadas.

Para finalizar, en general el uso de antimicrobianos naturales derivados de productos vegetales en alimentos es muy reducido debido a que la mayoría de las

aplicaciones de estos conservadores han sido en fase experimental dentro de un laboratorio o de tipo casero como se ha practicado desde la antigüedad, pero su aplicación en productos alimenticios comerciales es muy reducida debido a que el uso de estos aceites esenciales, hierbas, plantas, especias y oleorresinas podría constituir una limitación o condicionar su uso en cualquier tipo de alimento, por sus características organolépticas. Por lo tanto el reto que existe en este tipo de aditivos alimentarios con propiedades antimicrobianas de origen natural, implica su aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de estos compuestos en alimentos, sin que ello afecte sus atributos sensoriales y cualidades nutrimentales.

6. Bibliografía

- Acero C., (2011). **Antimicrobianos naturales: conservando los alimentos de forma natural**. Universidad Gastronómica en Latinoamérica. México. Disponible en: <http://sgastronomia.blogspot.com/2011/12/antimicrobianos-naturales-conservando.html> [Consultado: 26 /Dic./2011]
- Alzamora S.M., (1997). **Alimentos conservados por factores combinados**. J.M. Aguilera (Ed.). Temas en tecnologías de Alimentos1. México. CYTED.IPN. Pág. 45-48.
- Arcila C. C., Loarca G., Lecona, S., *et al.*, (2004). **El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). vol.54. N°1. Pag.100-111. ISSN 0004-0622.
- Badui S., (2006). **Química de Alimentos**. 4ª edición. Pearson Educación (Ed.). México. Pág. 510,511
- Barranco S.L., (2004). **Búsqueda de compuestos antimicrobianos en *Heterotheca inuloides*, *Gnaphalium oxyphyllum*, *Passiflora incarnata*, *Rosmarinus officinalis* y *Ruta graveolens***. Tesis de licenciatura. Universidad de las Américas. Puebla. (UDLAP). Puebla, México.
- Barboza J.E., Velazquez H., Salcedo R., Bautista M., (2004). **Probióticos y conservadores naturales en alimentos**. Acta universitaria, septiembre-diciembre, año/vol. 14, N° 003. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. Pág. 32-38.
- Blanchard J., (2000). **Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos**. Disponible en: <http://www.directopaladar.com/2006/10/28-los-antimicrobianos-naturales-refuerzan-la-seguridad-en-los-alimentos>. [Consultado: 15 /Enero /2012]
- Calvo M., (2009). **Glucósidos cianogénicos, bioquímica de los alimentos**. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/toxico/glucoSIDOScn.html> [Consultado: 13 /Nov./2011]
- Cano M., Pardo F., López J. M., Gómez E., (2006). **La técnica de micro-oxigenación en vinos tintos**. XII Congreso nacional de enólogos. Universidad de Murcia. Murcia, España.

- Chavarrías M., (2006). **Antimicrobianos naturales y conservación de alimentos**. Revista Eroski consumer, 19 de octubre de 2006. Vizcaya, España.
- Chavarrías M., (2011). **Alternativas naturales a los conservadores artificiales**. Revista Eroski consumer. Año XXXVI - Época IV - Nº 150 febrero 2011. Vizcaya, España.
- Del Valle, E. M., (2003). **Preservación de frutas y hortalizas, mediante métodos artesanales**. Disponible en: <http://www.ocetif.org/buenaspracticass.html> [Consultado: 26 /Sept. /2011]
- FAO (1989). **Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas**. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/x5056S/x5056S07.htm#Importanciadelaspérdidasdeposcosech> [Consultado: 2 /Oct./2011]
- EUFIC European Food Information Council, (2004). Conservadores para aumentar la seguridad y la duración de los alimentos. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/es/seguridad-alimentaria-calidad/aditivos-alimenticios/artid/conservadores-seguridad-duracion-alimentos/> [Consultado: 4 /Dic./2011].
- Fisher K., Philips C., (2008). **Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?** Magazine Trends in Food Science & Technology. Vol. 19, Nº3, pág. 156-164
- Gálvez J., Buitimea G., (2010). **Usos de la radiación en la conservación de alimentos**. Revista Nº 22 de la Universidad de Sonora (USON). 207:29-3., Sonora, México.
- Hernández L. C., (2003). **Actividad inhibitoria y letal de los extractos de ajo para E. coli y L. innocua**. Tesis de licenciatura. Escuela de Ingeniería. Universidad de las Américas Puebla. (UDLAP). Puebla, México.
- Huerta J.P., (2008). **Efecto de tratamientos térmicos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro en una sopa comercial**. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad javeriana. Cartagena, España.
- Ibáñez F., Torre P., Irigoyen A., (2003). **Aditivos alimentarios**. Universidad Pública de Navarra. Navarra, España. Disponible en: <http://www.nutricion.org/publicaciones/re>. [Consultado: 22 /Sept. /2011]

- Kotzekidou P., Giannakidis P., Boulamatsis A., (2007). **Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food born, e pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate.** Laboratory of food microbiology and hygiene. Department of food science and technology. Faculty of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki. Thessaloniki, Greece. Pág. 41, 119-127.
- López A., (2000). **La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavius*.** Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Lück E., Jager M., (1999). **Conservación química de los alimentos, características, usos y efectos.** 2ª edición. ACRIBIA (Ed.). Zaragoza, España. Pág. 3-6
- Moyano C., Mujica M.F., (2002). **Agroindustria rural como estrategia productiva, estación experimental agropecuaria (INTA).** Buenos Aires, Argentina.
- Moyano S., (2007). **Oleorresinas: ingredientes naturales.** Buenos Aires, Argentina. Disponible en: http://alimentacion.org.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=1626:oleorresinas-ingredientes-naturales&catid=38:publicaciones-especializadas&Itemid=56 [Consultado: 7 /Oct./2011]
- Nychas, G.J.E., (1995). **Natural Antimicrobials from plants: New Methods of food preservation.** G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia y Professional. Glasgow. Pág. 1-21.
- Orbe M., (2004). **Conservación de Frutas y hortalizas.** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/extension/prohuerta/info/carpetas/conservaliment/Conservacion%20de%20Frutas%20-%20Santa%20Fe.pdf> [Consultado: 10 /Dic./2011]
- Obelisco Ediciones, (1995). **Aditivos, Conservadores y Colorantes.** Barcelona, España. Pág.13-19
- Petrone P.V., (2006). **La principal causa de deterioro de los alimentos es el ataque por diferentes tipos de microorganismos.** Disponible en: <http://es.geocities.com/picodelobo/con> [Consultado: 19 /Nov./2011]

- Rojas N. Y., (2011). **Principales causas de deterioro de los alimentos.** Disponible en: <http://www.slideshare.net/alimentosnorma/principales-causas-de-deterioro-de-los-alimentos> [Consultado: 18 /Oct. /2011]
- Raybaudi R. M., Soliva R., Martín O., (2006). **Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas.** I Simposio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados, SP Brasil, Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad de Lleida. Lleida, España. Pág. 15-21
- Restrepo M., (2006) **Oleorresinas de capsicum en la industria alimentaria.** Revista lasallista de investigación julio-diciembre. Vol. 3., N° 002. Corporación universitaria lasallista Pág. 43-47. Antioquia, Colombia.
- Shafiur M., (2003) **Manual de conservación de los alimentos.** ACRIBIA (Ed.). Zaragoza, España Pág. 20-25, 311-320
- Velázquez M.J., (2010). **Acción antifúngica del aceite esencial de cáscara aplicado por adición directa o por generación de vapores.** Tesis de licenciatura. Universidad de las Américas Puebla (UDLAP). Puebla, México.
- Welt J., Bermúdez D., (2012). **Nuevas tendencias en el procesamiento de alimentos.** Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. (UDLAP). Puebla, México.