Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos

© INSTITUTO TOMÁS PASCUAL SANZ
para la nutrición y la salud
Pº de la Castellana 178 - 3º Dcha. 28046 Madrid
Tel.: 91 703 04 97. Fax: 91 350 92 18
webmasterinstituto@institutotomaspascual.es • www.institutotomaspascual.es

© Universidad de Burgos
Hospital del Rey s/n. 09001 Burgos

Coordinación editorial: IM&C International Marketing & Communication, S.A.

Alberto Alcocer, 13, 1º D. 28036 Madrid
Tel.: 91 353 33 70. Fax: 91 353 33 73. imc@imc-sa.es

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo las fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin permiso escrito del titular del copyright.

ISBN: 978-84-7867-055-0
ISBN: 978-84-92681-14-3
Depósito Legal: M-18349-2010

Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos

Autores

Dr. Carlos Alonso Calleja
Facultad de Veterinaria, Universidad de León. España.

Dr. Ignacio Álvarez Lanzarote
Grupo de Nuevas Tecnologías de Conservación e Higienización de los Alimentos. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. España.

Dra. Johanna Björkroth
Profesora del Department of Food and Environmental Hygiene. Universidad de Helsinki. Finlandia.

Dra. Rosa Capita González
Facultad de Veterinaria, Universidad de León. España.

Dr. Ramón Catalá Moragrega
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia. España.

Dra. M.ª José Cocero Alonso
Grupo de Investigación Ingeniería de Procesos a Presión. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid. España.

Dr. Luca S. Cocolin
Di.Va.P.R.A., University of Turin. Italia.

Dra. Ana M.ª Diez Maté
Área de Tecnología de los Alimentos. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos. España.

Dr. Rafael Gavara Clemente
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia. España.

Dr. Joaquín Gómez Estaca
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. Valencia. España.

Dr. Buenaventura Guamis López
Director del Centro Especial de Investigacón Planta de Tecnología de los Alimentos (CERPTA). Universidad de Barcelona. España.

INSTITUTO TOMÁS PASCUAL
para la nutrición y la salud
CÁTEDRA TOMÁS PASCUAL SANZ
Universidad de Burgos

UNIVERSIDAD DE BURGOS

Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos

Dra. Liesbeth Jacxsens
Department of Food Safety and Food Quality. University of Gante. Bélgica.

Dra. Isabel Jaime Moreno
Área de Tecnología de los Alimentos. Dpto. de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos. España.

Dr. Mark Linton
Food Microbiology Branch, Agriculture, Food & Environmental Science Division, Agri-Food and Biosciencies Institute. Belfast, Reino Unido.

Dr. Tomás López Pedemonte
CERPTA-UAB. Malta Consolider. TECNIO. XaRTA

Dra. Pieternel A. Luning
Product Design and Quality Management Group. University of Wageningen. Netherlands.

Dr. Ángel Martín Martínez
Grupo de Investigación Ingeniería de Procesos a Presión. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid. España.

Dra. Margaret F. Patterson
Food Microbiology Branch, Agriculture, Food & Environmental Science Division, Agri-Food and Biosciencies Institute. Belfast, Reino Unido.

Dr. Pierre A. Picouet
Unidad de Ingeniería y Procesado de Alimentos IRTA-TA. Monells, Girona. España.

Dr. Miguel Prieto Maradona
Facultad de Veterinaria, Universidad de León. España.

Dra. Kalliopi Rantsiou
Di.Va.P.R.A., University of Turin. Italia.

Dr. Javier Raso Pueyo
Grupo de Nuevas Tecnologías de Conservación e Higienización de los Alimentos. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Zaragoza. España.

Dra. Soraya Rodríguez Rojo
Grupo de Investigación Ingeniería de Procesos a Presión. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid. España.

Dr. Alfredo C. Rodríguez Zendejas
Director de Ingeniería. National Center for Food Safety and Technology (NCFST). Illinois Institute of Technology. EE.UU.

Dr. Jordi Rovira Carballido
Área de Tecnología de los Alimentos. Dpto. de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos. España.

Índice

7 **Prólogo**
D. Ricardo Martí Fluxá

9 **Prólogo**
Dra. Isabel Jaime Moreno
Dra. Sagrario Beltrán Calvo

13 **Seguridad alimentaria, hoy**
Dr. Jordi Rovira Carballido
Dra. Ana M.ª Diez Maté
Dra. Pieternel A. Luning
Dra. Liesbeth Jacxsens

27 ***Leuconostoc gasicomitatum*, un organismo deteriorante específico**
Dra. Johanna Björkroth

35 **Nuevos enfoques en la definición y descripción de poblaciones microbianas deteriorantes de alimentos: los métodos moleculares directos aplicados a nivel de ADN y ARN**
Dr. Luca S. Cocolin
Dra. Kalliopi Rantsiou

45 **Aplicación de métodos combinados de conservación. Experiencias en la Universidad de Burgos**
Dra. Ana M.ª Diez Maté
Dra. Isabel Jaime Moreno
Dr. Jordi Rovira Carballido

59 **"Pasteurización" de alimentos por altas presiones**
Dra. Margaret F. Patterson
Dr. Mark Linton

73 **Esterilización de alimentos por alta presión y aplicación del enfoque del objetivo de seguridad alimentaria (FSO) para desarrollar procesos de esterilización**
Dr. Alfredo C. Rodríguez Zendejas

81 **Homogenización a altas presiones. Tecnología y aplicaciones**
Dr. Buenaventura Guamis López
Dr. Tomás López Pedemonte

93 **Aplicaciones de los pulsos eléctricos de alto voltaje en la industria alimentaria**
Dr. Ignacio Álvarez Lanzarote
Dr. Javier Raso Pueyo

111 **Altas frecuencias como proceso de descontaminación alternativo y tomografía computerizada como herramienta de seguimiento de procesos**
Dr. Pierre A. Picouet

123 **La tecnología de fluidos supercríticos en la industria. Formulación de aditivos alimentarios**
Dra. M.ª José Cocero Alonso
Dr. Ángel Martín Martínez
Dra. Soraya Rodríguez Rojo

141 **Innovaciones en el envasado de los alimentos. Envasado activo y envasado inteligente**
Dr. Joaquín Gómez Estaca
Dr. Rafael Gavara Clemente
Dr. Ramón Catalá Moragrega

153 **Evaluación de riesgos emergentes en seguridad alimentaria**
Dr. Miguel Prieto Maradona
Dra. Rosa Capita González
Dr. Carlos Alonso Calleja

Prólogo

Bienvenidos a la lectura de este libro, primer resultado de la colaboración entre la Universidad de Burgos y el Instituto Tomás Pascual Sanz. El libro recoge las conferencias impartidas durante el Curso de Verano "Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de alimentos", celebrado en julio del 2009.

Este Curso de Verano, dirigido por las doctoras Sagrario Beltrán e Isabel Jaime, tuvo por objetivos actualizar los conocimientos sobre los riesgos existentes en la industria alimentaria y las posibilidades de control en la misma, acercar a estudiantes y profesionales las últimas tecnologías e innovaciones aplicables en la industria alimentaria y presentarles los aspectos prácticos de las investigaciones relacionadas con la mejora de la seguridad alimentaria.

Estos objetivos se recogen perfectamente en el programa del Curso, dividido en tres módulos: "Seguridad alimentaria y deterioro de alimentos", en el que se describieron nuevos microorganismos deterioradores de alimentos consecuencia de los nuevos envases y menos agresivas técnicas de procesado, las tecnologías más avanzadas en la detección de dichos microorganismos y sus ecosistemas y la combinación sinérgica de ellas para estudiar casos particularmente difíciles; las nuevas tecnologías de conservación, tales como las altas presiones y sus diferentes combinaciones con otros procesos de conservación, que ya se están aplicando con éxito en ciertas empresas agroalimentarias, fueron temas del segundo módulo. Por último se trataron las tecnologías más novedosas, a las que se han dedicado varias ponencias: fluidos supercríticos, el envasado inteligente, las altas frecuencias, los pulsos luminosos, los pulsos eléctricos o los ultrasonidos se reservaron para el tercer módulo. El curso se completó con visitas a dos destacadas empresas castellano-leonesas.

En el Curso hemos disfrutado de conferencias impartidas por especialistas procedentes de varios países, resultado de los trabajos en colaboración que la Universidad de Burgos viene realizando desde sus comienzos con centros extranjeros de investigación. Su participación sin duda ha enriquecido este libro que le presentamos ya que han aportado nuevas experiencias y conocimiento en problemas reales y técnicas actuales.

El Instituto Tomás Pascual Sanz agradece al Rectorado y personal de la Universidad de Burgos, y en particular a las Directoras de la Cátedra Tomás Pascual – Universidad de Burgos, el esfuerzo que ha supuesto la organización

y desarrollo de este Curso. A nuestros lectores, esperamos que disfruten de este libro llamado a convertirse en un libro de consulta para aquellas personas que trabajan en el ámbito de la tecnología alimentaria.

D. Ricardo Martí Fluxá

Presidente Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud

Prólogo

La seguridad de los alimentos es una preocupación constante en todo el mundo. Aunque las crisis alimentarias y las intoxicaciones causadas por alimentos que afectan a un gran número de consumidores lógicamente generan alarma, el esfuerzo que se está realizando para conocer y controlar los diferentes factores que pueden comprometer la seguridad de nuestros alimentos es enorme. Las herramientas disponibles para hacer frente a la amenaza de los peligros biológicos, que tienen por objeto proteger al consumidor, reduciendo el riesgo de los mismos en los alimentos, cada vez son más numerosas y eficaces. La necesidad de aumentar la seguridad de los alimentos, unida a la demanda de los consumidores de alimentos para que éstos sean más "naturales", más "frescos", con menor tratamiento tecnológico y mejor calidad nutricional y con una vida útil relativamente larga está determinando que se modifique la forma de aplicar algunas de las técnicas de conservación tradicionales y que progresivamente surjan nuevas tecnologías.

Están adquiriendo importancia los procesos combinados y el procesado mínimo. En casi todos los países las tecnologías basadas en la utilización conjunta de distintos factores inhibidores para conseguir la estabilidad microbiológica final se denominan "tecnologías barrera o de obstáculos"; en España generalmente se conocen como "métodos combinados de conservación". Se definen como la combinación de barreras o técnicas, insuficientes por separado para proteger el alimento, pero que en conjunto pueden llegar a impedir o retrasar la actuación de los factores de alteración. Se han identificado muchos factores u obstáculos. Algunas de las técnicas utilizadas son tradicionales y conocidas desde hace mucho tiempo, pero en otros casos se trata de técnicas bastante nuevas en la industria alimentaria como calentamiento óhmico, altas presiones, pulsos eléctricos, pulsos luminosos, campos magnéticos oscilantes, ultrasonidos, sustancias antimicrobianas naturales y diversas técnicas de envasado. El procesado mínimo incluye gran número de tecnologías y métodos que permiten una modificación mínima de las características del alimento, pero al mismo tiempo le confieren una vida útil suficientemente amplia. Este término tiene amplias connotaciones, puesto que también incluye aspectos sobre la calidad nutricional y lo saludables que sean los alimentos, así como aspectos de ahorro energético y respeto al medioambiente. Las estrategias son variadas, en muchos casos se utilizan los métodos combinados, pero también otras como modificación de ingredientes, mayor

higiene, salas blancas, eliminación de microorganismos patógenos de los alimentos y de las materias primas más habitualmente contaminadas para poder reducir la intensidad de los métodos de conservación, etc.

Ante el interés que consideramos que tienen los temas mencionados se organizó el Curso de Verano "Nuevas Tecnologías en la Conservación y Transformación de los Alimentos", que se celebró en Burgos en julio de 2009 y cuyas ponencias se recogen en este libro. Se revisan los aspectos más destacados en cuanto a la seguridad alimentaria y la situación planteada ante la aparición nuevos peligros biológicos que pueden afectar a los alimentos, como son los patógenos emergentes. Se describen, asimismo, las últimas investigaciones en deterioro de alimentos y las metodologías más actuales para la detección de bacterias alterantes y patógenas en alimentos. Con respecto a los métodos de conservación, se incluyen temas relativos a altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos, pulsos luminosos, ultrasonidos, altas frecuencias, tratamiento con dióxido de carbono supercrítico, envasado activo y envasado inteligente, entre otros. En relación con las nuevas tecnologías de transformación de alimentos, se tratan aspectos relacionados con la utilización de ingredientes naturales, técnicas novedosas de extracción y transformación de los mismos, como los fluidos supercríticos, homogeneización mediante altas presiones, etc.

Este curso de verano, que se encuadra dentro de las actividades de la Cátedra Tomás Pascual Sanz – Universidad de Burgos, ha constituido una oportunidad excepcional para reunir a expertos de prestigio internacional, que realizaron las interesantísimas ponencias que se recogen en el libro sobre los aspectos más novedosos de cada uno de los temas tratados.

Para que este proyecto, en sus dos facetas: curso y libro que ahora se presenta, se hiciera realidad, se ha contado con la implicación, la dedicación y el trabajo de diversas personas e instituciones a los que queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento. Al Instituto Tomás Pascual para la nutrición y la salud, impulsor y financiador, tanto del curso como de la edición de este libro, por su apoyo imprescindible, pero especialmente por su compromiso con la investigación en el campo de la Tecnología de los Alimentos y la divulgación de la misma. A la Universidad de Burgos por su implicación, facilitando todos los aspectos organizativos que tanto esfuerzo requieren y al Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, al que está vinculada la citada Cátedra, por su apoyo.

Las instituciones no son impersonales, y por eso, terminamos con la parte más importante para que este libro haya podido ser editado, que son las personas a las que directamente hay que agradecérselo. A cada uno de los ponentes que han participado porque ha sido su trabajo de años el que se plasma en cada uno de los capítulos que constituyen el libro. A Marco Antonio Delgado y Alfonso Perote, del Instituto Tomás Pascual, por su disponibilidad en todo momento y por su gran trabajo; aunque suena a frase hecha, sin ellos realmente no tendríamos este libro. A Jordi Rovira, Vicerrector de Investigación de la Universidad de Burgos, por su entusiasmo contagioso en este proyecto y su apoyo incondicional.

Dra. Isabel Jaime Moreno
Profesora de Tecnología de los Alimentos.
Universidad de Burgos

Dra. Sagrario Beltrán Calvo
Profesora de Ingeniería Química.
Universidad de Burgos

Seguridad alimentaria, hoy

Dr. Jordi Rovira Carballido, Dra. Ana M.ª Diez Maté, Dra. Pieternel A. Luning y Dra. Liesbeth Jacxsens

Resumen

En el presente capítulo se tratarán diferentes aspectos relativos a la seguridad alimentaria en el contexto actual. Primeramente, se explicará el concepto de calidad alimentaria y su relación con la vida útil de los alimentos y la propia seguridad alimentaria, ya que ambos aspectos van a ser objeto del desarrollo del presente libro. A continuación, se describirán brevemente los diferentes peligros que comprometen la seguridad de nuestros alimentos, se introducirá también el concepto de riesgo y se analizarán de manera sucinta qué alimentos son más susceptibles de entrañar peligro. De los diferentes peligros que pueden contaminar los alimentos, en este capítulo nos centraremos en los peligros biológicos. Seguidamente, se procederá a hacer una descripción de la situación actual, basada en datos estadísticos de las principales Agencias de Seguridad Alimentaria, tanto americana como europea, analizando con detalle las diferentes causas que pueden favorecer la presencia de peligros biológicos en los alimentos. La cuarta sección estará destinada a una breve descripción de las diferentes herramientas disponibles para hacer frente a la amenaza de los peligros biológicos, que tienen por objeto proteger al consumidor, intentando reducir el riego de los mismos en los alimentos. En esta sección, se mencionarán las diferentes estrategias que tienen como objetivo final aumentar la seguridad alimentaria de un producto alimentario. Finalmente, se procederá a explicar algunas de las nuevas iniciativas desarrolladas en el seno del proyecto PathogenCombat. En este apartado se introducirán y explicarán dos nuevas metodologías: un instrumento de diagnóstico para evaluar los diferentes sistemas de gestión de la seguridad alimentaria (FSMS; Food Safety Management System) independientemente del sistema utilizado por cada operador alimentario, y un plan de evaluación de la calidad microbiológica (MAS; Microbial Assessment Scheme), aplicable a cualquier eslabón de la cadena alimentaria. Por último, se proponen una serie de conclusiones.

Hay que resaltar que el objetivo de este capítulo no es hacer una revisión profunda del tema, sino más bien una somera introducción a los demás capítulos del libro, en los que se profundizará en algunos de los aspectos aquí tratados.

Calidad alimentaria y seguridad alimentaria

El objetivo principal de este libro es describir, a través de las valiosas contribuciones realizadas por los diferentes autores, cómo es posible obtener alimentos de mayor calidad. Es por ello que parece relevante que se dediquen unas líneas que ayuden a comprender al lector el alcance del concepto de calidad alimentaria. Hay muchas definiciones que intentan expli-

car con más o menos éxito qué se entiende por calidad de un producto, pero sin duda alguna las definiciones que han conseguido tener más éxito son las que definen a la calidad de un producto, como la adecuación al uso del mismo, y se puede concretar en que el objetivo de la calidad es cumplir o exceder las expectativas del consumidor. Esta misma definición se puede aplicar también a los productos alimenticios. Sin embargo, y más allá del concepto o definición de calidad, hay que tener en cuenta que un producto alimenticio no se comporta igual que otro tipo de productos de consumo. Los alimentos son en sí mismos productos complejos (*Luning y Marcelis, 2006*), elaborados a partir de materias primas perecederas, sometidas a diferentes procesos que alteran en ocasiones profundamente la estructura de las materias primas de partida, y con una vida útil muy limitada en función del producto del que se trate. Así pues, la calidad alimentaria viene definida por una serie de dimensiones o características intrínsecas (que afectan físicamente al producto) y extrínsecas (sistemas de producción, aspectos medioambientales, etc.) del producto. Entre estas dimensiones se pueden citar la vida útil, la comodidad, la calidad nutricional, el precio, la calidad sensorial y los aspectos saludables, entre otras, y por supuesto la seguridad alimentaria (figura 1). Además, el concepto de calidad alimentaria puede variar en función

Figura 1. Relación entre seguridad alimentaria y calidad del producto y política de calidad de la empresa, y cobertura de los diferentes aspectos de la calidad por sistemas de gestión de la misma en cada ámbito. En verde aparecen los llamados sistemas de aseguramiento de la calidad integrados.
QA: Quality Assurance System; BRC: British Retail Consortium; BPF: Buenas Prácticas de Fabricación; PPRs: Programas Pre-Requisitos; APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control; TQM: Total Quality Management.

de las expectativas de cada consumidor, a pesar de que las dimensiones (características) de calidad de los alimentos puedan ser las mismas. Así pues, la vida útil y la seguridad alimentaria de un alimento son aspectos o dimensiones de un concepto más amplio que es la calidad alimentaria.

Como se ha comentado anteriormente, los alimentos son perecederos y por lo tanto, se acaban alterando y deteriorando, hasta que dejan de ser adecuados para su uso, o no cumplen ya con las expectativas del consumidor en ese momento. Por tanto, se puede definir la vida útil de un alimento, como el tiempo en el que las características globales de los alimentos se mantienen óptimas para satisfacer las expectativas del consumidor. Los alimentos se pueden alterar por agentes alterantes físicos, como pueden ser golpes, aplastamientos, roturas, fluctuaciones de temperatura, quemaduras por frío, pérdidas de humedad que implican desecaciones, o la retrogradación del almidón que produce modificaciones severas de textura; agentes químicos, que implican reacciones químicas que cambian las características de los alimentos, como pueden ser reacciones químicas no catalizadas por enzimas, como las reacciones de Maillard que producen pardeamiento no enzimático, o formación de compuestos amargos, alteraciones mediadas por reacciones enzimáticas como el pardeamiento que sufren algunos vegetales debido a la presencia de polifenol oxidasas, o la aparición de sustancias amargas por efecto de lipasas en quesos, etc. Finalmente, los agentes microbiológicos pueden alterar los alimentos cuando crecen de manera abundante sobre ellos, de tal manera que se considera que un alimento está alterado y no se puede consumir cuando la población bacteriana alterante sobrepasa una cantidad de 10^7 ó 10^8 ufc/g (*Diez et al*, 2008).

Por seguridad alimentaria se entiende al conjunto de medidas que habría que tomar para minimizar el riesgo de ingerir productos alimenticios que presenten algún peligro que pueda causar un efecto adverso en la salud del consumidor, a corto o a largo plazo.

Tipos de peligros que comprometen la seguridad alimentaria

Se entiende por peligros aquellos agentes biológicos, químicos o físicos que contaminan a un alimento haciendo que éste no sea seguro para el consumo. Así pues, existen tres tipos de peligros en función de los agentes contaminantes antes mencionados: peligros físicos, químicos y biológicos.

Los peligros físicos pueden llegar a los alimentos en cualquier fase de la cadena alimentaria. Son sustancias extrañas a los mismos, como pueden ser trozos de metal, vidrio, madera, plástico, piedras… que suponen un riesgo para la salud. Actúan a corto plazo y las principales consecuencias son la asfixia y lesiones en la boca, y además constituyen un foco de contaminación microbiana.

Los peligros químicos también pueden llegar a los alimentos en cualquier fase de su proceso de elaboración. Pueden actuar a corto plazo provocando episodios agudos, como es el caso de alérgenos o la ingestión de productos tóxicos, o a largo

plazo (efecto crónico), como es el caso de compuestos que ejercen su efecto de manera acumulativa, como pueden ser sustancias carcinogénicas. Entre los peligros químicos se encuentran los productos de limpieza, pesticidas, alérgenos, metales tóxicos y nitrosaminas, bifenilos policlorados (PCBs), sustancias que pueden migrar del envase al producto, residuos de drogas veterinarias, aditivos químicos o productos generados por un mal proceso de elaboración. Uno de los casos más dramáticos ocasionado por un contaminante químico, en nuestro país, fue el protagonizado por el denominado "síndrome tóxico" causado por el consumo de aceite de colza contaminado con anilinas, debido a una práctica fraudulenta, a principios de la década de los 80, en el siglo pasado. Dicho síndrome afectó a más de 20.000 personas, con más de 11.000 hospitalizaciones y alrededor de 1.100 muertos, dejando en los afectados secuelas de diversa consideración.

Los peligros biológicos también pueden contaminar a los alimentos en cualquier momento a lo largo de la cadena alimentaria. Generalmente actúan a corto plazo ocasionando episodios agudos. Entre los peligros biológicos se encuentran los siguientes: infectaciones por invertebrados como ácaros, gorgojos, gusanos, moscas, parásitos como la *Triquina, Toxoplasma, Giardia, Taenia*, hongos productores de micotoxinas, bacterias como *Salmonella, Listeria, Clostridium*, virus como calicivirus tipo Norwalk, hepatitis A o priones, que ocasionaron la crisis de las vacas locas (EEB/BSE).

Las bacterias pueden actuar de dos formas diferentes, ya sea de manera directa, es decir, infección por crecimiento bacteriano, cuyos síntomas suelen aparecer en pocas horas, como es el caso de *Salmonella, Campylobacter, E. coli*, o de manera indirecta, mediante la producción de toxinas, apareciendo en este caso los síntomas al cabo de días o semanas, como ocurre con algunas cepas de *S. aureus, B. cereus y Clostridium*. Las principales fuentes de contaminación por microorganismos en alimentos suelen ser: contaminación de la materia prima, inadecuado control de la temperatura durante el cocinado, refrigerado y almacenamiento, contaminación cruzada entre productos crudos y preparados, deficiente higiene personal y mala manipulación de los alimentos (*CDC, 2006*). Según una declaración de la Organización Mundial de la Salud, la contaminación microbiana es el mayor riesgo para la seguridad alimentaria en la actualidad (*WHO, 2002*). Por ello, a partir de ahora nos centraremos en dichos peligros.

Situación actual

Contrariamente a lo que en principio se puede pensar, la realidad es que el número de afectados por alimentos contaminados por agentes biológicos, no sólo no disminuye, sino que en ocasiones incluso aumenta, tanto en países en vías de desarrollo, como en países desarrollados. En este sentido, la frecuencia de desórdenes gastrointestinales severos en Estados Unidos es en la actualidad un 34% más que en 1948, y cada año se ven afectadas 76.000.000 personas, de las cuales requieren hospitalización 325.000, ocasionando la muerte a alrededor de 5.000 personas (*CDC, 2006*). Datos publicados por el Centro Europeo de Prevención de Enfermedades y Control (*ECDC, 2008*) re-

feridos a la situación en Europa apuntan la misma tendencia. En este sentido, no se consigue rebajar la incidencia de afectados por bacterias de transmisión alimentaria como *Salmonella, Campylobacter, Listeria y E.coli STEC*, o al menos no tanto como sería deseable.

Se define riesgo como la probabilidad de que un peligro ocurra y por lo tanto desencadene un brote. Hay que dejar claro que, por la propia naturaleza compleja de los alimentos, tal y como se ha comentado antes, no es posible alcanzar el riesgo cero en seguridad alimentaria.

Sobre las causas por las que no se consigue reducir sustancialmente la incidencia de casos relacionados con brotes alimentarios, no es fácil encontrar una respuesta sencilla, y parece que puede ser debido a un efecto multicausa. Es evidente que en los últimos años se han mejorado las técnicas analíticas capaces de detectar con mayor precisión la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, aflorando un mayor número de casos de personas afectadas. Asimismo, se han producido grandes cambios en los sistemas de aprovisionamiento de comida, que implican la producción de mayores cantidades de comida, la implantación de un sistema de agricultura y ganadería intensivos, aumento del comercio internacional y por lo tanto del movimiento de grandes cantidades de comida de una a otra parte del planeta, lo que ha hecho que la distancia entre las zonas de producción y consumo aumente; cambios profundos en el estilo de vida, que llevan consigo un aumento de las comidas fuera del hogar, o la preferencia por comidas de fácil preparación en casa, cambiando los hábitos culinarios tradicionales que implicaban largos tiempos de cocción; un aumento de la esperanza de vida y un paulatino deterioro del sistema inmunitario de la población con mayor edad; una pasión por lo "natural", que hace que se reduzca la adición de conservantes en los alimentos y se empleen cada vez más técnicas de conservación menos agresivas y que sean capaces de mantener las características sensoriales de los alimentos, así como la aparición cada vez más frecuente de microorganismos resistentes; finalmente, la calidad y seguridad alimentarias se ven muy comprometidas por el estrés de reducir los costes de producción y aumentar la productividad, especialmente en épocas de crisis económica, como la actual.

Herramientas que garantizan la seguridad alimentaria

A pesar de que el problema no es menor, hay que reconocer que se dispone de una serie de herramientas que ayudan a mantener los brotes de intoxicaciones alimentarias en cifras razonables; imaginemos por un momento qué podría ocurrir si no se dispusiera de las herramientas que se emplean actualmente.

Entre estas herramientas se pueden distinguir aquellas que forman los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria (FSMS). Estos sistemas son las denominadas Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), de Higiene (BPH) y el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC). Las BPF/BPH son un paquete de requerimientos y procedimientos, propuestos por primera vez por el *Codex Alimentarius*, que aseguran una elabora-

ción de los alimentos en condiciones de higiene y seguridad alimentaria, con el objetivo de tratar de limitar al máximo la contaminación de los alimentos (*CAC, 2003*). En realidad se trata de aplicar el sentido común a la elaboración de los alimentos. Cuando estas BPF/BPH se ponen por escrito y se establece un registro formal de su seguimiento y cumplimiento podemos hablar de los Programas Pre-Requisito (PPR). La correcta aplicación de los PPR es imprescindible para poder ejecutar con efectividad otro FSMS como es el sistema APPCC, el cual se basa en el cumplimiento de siete principios básicos que implican el análisis de peligros de un proceso de elaboración concreto, para los que se definen una serie de puntos de control, que son críticos para garantizar la seguridad del producto. También se establecen unos límites de control críticos y una serie de medidas preventivas, unos procedimientos de control, unas medidas correctoras en caso de sobrepasar los límites críticos, y finalmente el establecimiento de un sistema de registro y de unos procedimientos de verificación del sistema (*CAC, 2003*). La implantación y seguimiento actualizado del sistema APPCC es obligatorio desde el año 1996. Estos sistemas descritos son sin embargo específicos de cada industria alimentaria.

Tal y como se aprecia en la figura 1 los sistemas descritos en el párrafo anterior (FSMS) sólo afectan a la gestión de la seguridad alimentaria, pero ésta a su vez es sólo una parte, una dimensión de la calidad del producto, y es por ello que para garantizar que un producto alimentario se produce siempre de la misma manera y sea constante en todas sus dimensiones de calidad, es necesario aplicar los denominados Sistemas de Gestión de la Calidad, para dirigir e implementar la política de calidad de la empresa y así alcanzar los objetivos de calidad propuestos (ISO 9001, 2008).

Más recientemente, y con la idea de integrar los beneficios de los FSMS y de los Sistemas de Gestión de la Calidad, y así facilitar su aplicación conjunta, han surgido una serie de iniciativas, que podemos agrupar con los términos de Sistemas Integrados de Gestión de la Calidad o Quality Assurance Standards (QA), que lo que intentan es integrar directamente los aspectos de los FSMS con los Sistemas de Gestión de la Calidad (ver figura 1). En este sentido muchas asociaciones de minoristas o de empresas de distribución han creado sus propios estándares como es el caso de los BRC (British Retail Consortium), o más recientemente los ISO 22000: 2005.

Además de los FSMS, de los Sistemas de Gestión de la Calidad, y de los QA estándares, las empresas disponen de otra herramienta, que si bien no ayuda directamente a incrementar la seguridad alimentaria de una empresa, sí que ayuda a minimizar el impacto sobre la población en caso de contingencia o de aparición de una sospecha sobre la seguridad de un lote producido, esta herramienta es la trazabilidad o rastreabilidad. Se puede definir la trazabilidad como la capacidad para seguir el movimiento de un alimento a través de etapas especificadas de la producción, transformación y distribución, es decir, en cualquier momento de la cadena alimentaria, facilitando la retirada y recuperación de los alimentos sospechosos de presentar un peligro para la salud de los consumidores.

Hasta este momento se han descrito las herramientas de las que disponen las empresas para garantizar la seguridad de sus productos. Sin embargo, parece que para garantizar la seguridad alimentaria de la población en general, no basta con la acción aislada de las empresas, aun siendo esta acción muy importante, por lo que las autoridades gubernamentales tienen que jugar también un papel activo en el sistema. En este sentido, es responsabilidad de los gobiernos o instituciones supragubernamentales clarificar algunos aspectos claves, así como utilizar las metodologías adecuadas para garantizar la Salud Pública. Por ello, se ha desarrollado el concepto de Nivel Adecuado de Protección (ALOP; Appropiate Level of Protection) (figura 2). Los ALOP son los niveles de riesgo que una sociedad está dispuesta a asumir frente a un peligro, en este caso, un peligro microbiológico relacionado con el consumo de alimentos, por ejemplo la incidencia de salmonelosis en Europa está, según la ECDC, en torno a los 39 casos por 100.000 habitantes, pero un ALOP por parte de la UE, podría ser rebajar la incidencia a la mitad en un plazo de cinco años. En este caso debería instrumentar una serie de políticas encaminadas a alcanzar este objetivo, que pueden plasmarse en leyes, recomendaciones e iniciativas. El establecimiento de un ALOP es por tanto una decisión política. Sin embargo, estas decisiones políticas no pueden ser tomadas en general sin ningún tipo de criterio, y normalmente se basan o deberían basarse en criterios puramente científicos. Así está recogido en la llamada Ley General de Alimentación de la UE (CE 172/2002), en la que se especifica que el instrumento utilizado para este fin será la Evaluación de Riesgos. La evaluación de riesgos es una metodología que se basa en tres acciones importantes que son: el análisis de ries-

Figura 2. Sistemas de Gestión de la Seguridad Alimentaria a nivel de empresa y su relación con herramientas que sirven para establecer Niveles Adecuados de Protección (ALOP) en base a un análisis de riesgos, y que se comunican al nivel industrial a través de los Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO). Adaptado de Gorris, 2005.

gos, la gestión de riesgos y la comunicación de riesgos. El análisis de riesgos es una actividad propia del ámbito científico y consta a su vez de cuatro actividades: análisis de peligros, caracterización de los peligros, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo; en la UE esta acción es desarrollada por la EFSA (European Food Safety Autority) y la ECDC (European Center for Diseases Prevention and Control), y a nivel de cada Estado las correspondientes Agencias de Seguridad Alimentaria. La gestión del riesgo corresponde, en Europa, a la Comisión Europea, y la comunicación a las propias agencias antes mencionadas.

Con el fin de vincular los ALOP basados en la Evaluación de Riesgos con la actividad de las empresas alimentarias se ha buscado la figura de los objetivos de seguridad alimentaria (FSO, Food Safety Objectives), y los objetivos de actuación (PO, Performance Objectives) (ver figura 3). Se puede definir un FSO como la máxima frecuencia o concentración de un peligro en un alimento en el momento de su consumo, que contribuye a alcanzar un ALOP. Por lo tanto, su misión es transformar un objetivo de Salud Pública establecido por un Gobierno a una concentración o frecuencia de dicho peligro en un alimento (*ICMSF, 2005; Gorris, 2005)*. Pero una cadena alimentaria está constituida por diferentes eslabones, los cuales necesitan tener una serie de referencias para poder conseguir el FSO, es por ello que se necesitan los PO que determinan los niveles o concentraciones del peligro en los diferentes eslabones de dicha cadena (ver figura 3).

Nuevas aportaciones desde PathogenCombat

PathogenCombat es un proyecto europeo financiado por el Sexto Programa Marco de la Unión Europea, cuyo principal objetivo es el de generar nuevos co-

Figura 3. Posición de los FSO y de los PO a lo largo de la cadena alimentaria (ICMSF, 2005).

nocimientos y desarrollar nuevas estrategias para aumentar la seguridad alimentaria de los alimentos que se consumen (PathogenCombat, www.pathogencombat.com).

En el apartado anterior se ha hecho un breve resumen de las herramientas disponibles en la actualidad para garantizar la seguridad alimentaria, sin embargo, como se ha visto en otro apartado, parece que se requieren de nuevas herramientas, que puedan aportar un plus de efectividad a las que existen actualmente. En este sentido, dentro de PathogenCombat se han desarrollado varias herramientas, de las cuales en este capítulo se describirán dos que son complementarias: un Instrumento de Diagnóstico para evaluar a los FSMS empleados por las empresas (FSMS-DI) y un Plan de Evaluación de la Contaminación Microbiana de la empresa (MAS, Microbial Assessment Scheme). En este apartado sólo se expondrán de manera muy resumida los fundamentos de estas herramientas, pero para mayor información se pueden consultar las referencias (*Luning et al, 2008; Luning et al, 2009 y Jacxsens et al, 2009*).

Se puede definir un Sistema de Gestión de la Seguridad Alimentaria (FSMS, Food Safety Management System), como un sistema específico de cada empresa que engloba actividades de control y aseguramiento con el fin de garantizar la seguridad alimentaria. Las actividades de control tienen como objetivo el mantener las condiciones del producto y del proceso dentro de unos límites aceptables para alcanzar la inocuidad del producto, mientras que las actividades de aseguramiento se relacionan más con aspectos relacionados con el funcionamiento del sistema y con aportar evidencia y confianza a todas las partes interesadas (*stakeholders*) acerca de los requerimientos del sistema (figura 4) (*Luning et al, 2009*).

Figura 4. Modelo conceptual del instrumento de diagnóstico de los FSMS (FSMS-DI) (Luning et al, 2008, 2009).

El FSMS-DI distingue tres estrategias de control diferentes: medidas preventivas, intervenciones y sistemas de control; para todas estas actividades se consideran aproximaciones tanto tecnológicas como de gestión (*Luning y Marcelis, 2006 y 2007*). Se hace también especial hincapié en el diseño de las estrategias y en el funcionamiento de las medidas de control.

Las medidas preventivas son actividades diseñadas para evitar y mantener el número de microorganismos en los alimentos, mientras que las estrategias de intervención están diseñadas para reducir el número de microorganismos presentes en los mismos. Las estrategias de control del sistema van encaminadas a aquellas actividades que suministran información acerca del "status" del producto o de las condiciones del proceso, que permiten correcciones en el proceso, retirada de productos de la línea de producción, y mejora, si es necesario, de los requerimientos del sistema (*Luning et al, 2008*).

Aparte del diseño de las estrategias de control, es muy importante el modo en que éstas actúan en la práctica para conseguir el nivel deseado de seguridad alimentaria. Ejemplos típicos de deficiencias en el correcto funcionamiento de las estrategias de control son el exceder las capacidades de enfriamiento o de calor existentes, fluctuaciones en operaciones de enfriado (abrir muchas veces el refrigerador, apagar los arcones frigoríficos de noche, etc.), malas prácticas higiénicas, o desidia en la cumplimentación de formularios de control.

Junto con las actividades de control, un FSMS dispone también de actividades que garantizan y aseguran que el sistema está controlado y que suministran garantías a las diferentes partes interesadas externas a la empresa (*stakeholders*). En el FSMS-DI se han destacado las siguientes actividades de aseguramiento: establecimiento de los requerimientos del sistema, validación, verificación y organización y custodia de la documentación del sistema. Las actividades relacionadas con el proceso de validación implican una comprobación "a priori" de la efectividad de las medidas de control diseñadas, mientras que las actividades de verificación suponen una comprobación "a posteriori" sobre si las actividades de control están funcionando tal como fueron diseñadas (*Luning et al, 2009*).

Es evidente que la presión que hay que hacer sobre un FSMS es diferente en función de los productos que se estén elaborando en una empresa, y de la diferente tecnología o proceso realizado por la misma, así como de su organización en los aspectos relativos a la calidad y a la seguridad alimentaria, o en función de la posición y postura que tome la empresa dentro de la cadena alimentaria, frente a sus proveedores y a sus clientes y la capacidad de influencia que tenga sobre ambos. Es por eso que el FSMS de una empresa se verá claramente influido por estos factores contextuales (figura 4), y éstos pueden hacer que la presión sobre el FSMS de la empresa sea más o menos grande, para conseguir un nivel determinado de seguridad alimentaria final.

En el FSMS-DI se han identificado diferentes actividades relacionadas con el diseño de las estrategias de control, con su funcionamiento real, así como unas actividades típicas de aseguramiento del sistema y unos factores contextuales que

influyen en el FSMS. Con el fin de evaluar todas estas actividades se han determinado una serie de indicadores que aparecen en la figura 5 para las principales actividades de control y en la figura 6 para las principales actividades que garantizan (aseguran) el control del sistema. Asimismo, se han identificado otros indicadores para los factores contextuales.

El FSMS-DI consiste en un cuestionario que realizan las personas encargadas de la gestión de la calidad de la empresa, con lo que se consigue evaluar el funcionamiento real del FSMS de la empresa, independientemente del sistema empleado y de su complejidad, y que aflora los puntos débiles del sistema y que, por tanto, hay que mejorar. El cuestionario no es al uso, y se presenta una hipótesis para un determinado indicador de una actividad, en la que se presentan tres niveles de cumplimiento y complejidad del sistema para dicha actividad, y el encuestado tiene que seleccionar la que represente mejor la situación de su sistema. Para más información se pueden consultar los trabajos de *Luning et al, 2008 y 2009*.

El MAS se puede utilizar de manera complementaria al FSMS-DI para hacer una evaluación sistemática de los recuentos microbiológicos con el fin de evaluar la acción de las principales actividades de control de un FSMS implementado sobre la actividad microbiana *(Jacxsens et al,*

ACTIVIDADES DE CONTROL

Diseño de medidas preventivas
- Adecuación de las medidas preventivas a las especificidades del producto (materia prima).
- Sofisticación en el diseño higiénico de equipos e instalaciones.
- Especificidad del programa de saneamiento.
- Alcance de los requisitos de higiene personal.
- Control de la materia prima.

Diseño de los procesos de intervención
- Idoneidad de los equipos de intervención.
- Especificidad del programa de mantenimiento.
- Efectividad de los métodos de intervención.

Diseño del sistema de control
- Adecuación del análisis de Puntos Críticos de Control (CCP).
- Adecuación de los equipos analíticos.
- Especificidad del programa de calibrado para equipos de medida y equipos analíticos.
- Especificidad del plan de muestreo y medidas. Existencia de medidas correctoras.

Operación de las estrategias de control
- Adecuación y cumplimiento de los procedimientos.
- Rendimiento real de la refrigeración, de las estrategias de intervención, de los equipos de medición, etc.

Figura 5. Principales actividades de control de la seguridad alimentaria (FSC, Food Safety Control) y estrategias de control de las mismas, junto con los indicadores empleados para evaluar cada una de ellas. (Luning et al, 2008).

Figura 6. Principales actividades de aseguramiento de la seguridad alimentaria (FSA, Food Assurance Control) y estrategias de control de las mismas, junto con los indicadores empleados para evaluar cada una de ellas (Luning et al, 2009).

2009). El MAS incluye una serie de pasos que están recogidos de modo esquemático, con su objetivo, en la figura 7. Así pues, el primer objetivo del MAS es el de obtener una fotografía del estado microbiológico real dado por las diferentes principales actividades de control de un FSMS, así como de su eficacia real. Hay que clarificar que, en este sentido, la aplicación del MAS no pretende obtener un plan de muestreo estadístico de las diferentes etapas de un proceso, ni establecer controles microbiológicos que puedan aceptar o rechazar un producto, sino que se busca conocer el nivel real de variación en los recuentos microbiológicos en una CSL (Critical Sampling Location). Mayores niveles de variación indican una mayor variabilidad y por tanto una situación poco controlada. Así pues, los resultados del MAS se expresan de dos formas diferentes: la primera muestra, tal y como se ha comentado anteriormente, la variación de los recuentos microbiológicos elegidos en cada CSL, y la segunda muestra el perfil de seguridad microbiológica del proceso analizado *(Luning et al, 2009)*. Este perfil permite comparaciones entre empresas que elaboran un mismo producto o comparar entre diferentes etapas de un mismo proceso.

Conclusiones

A pesar de los datos estadísticos que indican un estancamiento en la mejora de la seguridad de nuestros alimentos, jamás se ha disfrutado de una variedad tan grande de alimentos en nuestros su-

Figura 7. Procedimiento para la realización del plan de evaluación microbiológica (MAS).

permercados, ni jamás el nivel sanitario global de la población de los países occidentales ha estado mejor. No obstante, no se puede bajar la guardia, y aunque sea imposible alcanzar el riesgo 0 en alimentación, hay que tender a aproximarse al máximo a él. En la actualidad se dispone de buenas herramientas para conseguirlo, pero se necesitan otras que nos permitan bajar todavía más el riesgo. En este capítulo se han presentado de manera muy sucinta dos herramientas nuevas desarrolladas en el seno del proyecto europeo PathogenCombat, que son el FSMS-DI y el MAS, y que tienen como objetivo conocer mejor e identificar ineficiencias de los FSMS actuales que emplean las empresas independientemente de los mismos.

Bibliografía

CDC. Center for Disease Control and Prevention USA. 2009. Food Safety Office. Disponible en http://www.cdc.gov/foodsafety

Codex Alimentarius Commission (CAC). Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system and guidelines for its application. ANNEX to recommended international code of practice/general principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev 4. FAO/WHO *Codex Alimentarius* Commission. 2003.

Codex Alimentarius Commission (CAC). Principios Prácticos sobre el Análisis de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos Aplicables por los Gobiernos. CAC/GL 62-2007. FAO/WHO *Codex Alimentarius* Commission. 2007.

Diez AM, Santos EM, Jaime I, Rovira J. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. Food Microbiology. 2008; 25:154-61.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control: Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2008.

Gorris LGM. Food safety objective: an integral part of food chain management. Food Control. 2005; 16:801-9.

ICMSF. A simplified guide to understanding and using Food Safety Objectives and Performance Objectives. 2005. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (available in: www.icmsf.org).

ISO 9001:2008. 2008. Quality management systems-requirements. 27 pp. ISO 9001:2008 TC176/SC 2 quality management sytems requirements (http://www.iso.org/iso).

Jacxsens L, Kussaga J, Luning PA, Van der Spiegel M, Uyttendaele M, Devlieghere F. A Microbial Assessment Scheme to measure microbial performance of Food Safety Management Systems. International Journal of Food Microbiology (in press). 2009. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.018.

Luning PA, Marcelis WJ. A food quality management functions model from a techno-managerial perspective. Trends in Food Science & Technology. 2007; 18:159-66.

Luning PA, Marcelis WJ. A techno-managerial approach in food quality management research. Trends in Food Science & Technology. 2006; 17:378-85.

Luning PA, Marcelis WJ, Rovira J, Van der Spiegel M, Uyttendaele M, Jacxsens L. Systematic assessment of core activities in a company specific food safety management system. Trends in Food Science & Technology. 2009; 20:300-12.

WHO. Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. Organización Mundial de la Salud. 2002. Disponible en: http://www.who.int/fsf

Leuconostoc gasicomitatum, un organismo deteriorante específico

Dra. Johanna Björkroth

Resumen

Leuconostoc gasicomitatum es una bacteria ácido-láctica (en inglés, LAB) psicrotrofa que origina el deterioro de alimentos refrigerados y envasados en atmósfera modificada (en inglés, MAP) derivados de carne, pescado o vegetales. Fue detectado por primera vez en 1997 en una muestra deteriorada de un alimento a base de pollo marinado y envasado en MA. La muestra, a menos de la mitad de su fecha de consumo preferente, presentaba formación de gas. En el año 2000, la especie fue descrita y su nombre validado. Durante años se consideró un organismo deteriorante específico de alimentos a base de aves, marinados y envasados en MA. Sin embargo, más tarde se detectó en diversos tipos de alimentos deteriorados: pescado, buey, cerdo y vegetales. Su genoma (aproximadamente dos millones de pares de bases, Mbp) ha sido secuenciado, completamente ensamblado y registrado y será publicado este año. Hoy, *L. gasicomitatum* es nuestro organismo modelo en el estudio del deterioro microbiano de los alimentos. Actualmente estamos investigando su potencial como bacteria deteriorante y sus interacciones con otras bacterias. Estas investigaciones aumentarán nuestro conocimiento sobre el crecimiento y metabolismo de este organismo deteriorante específico y también el de otras LAB psicrotrofas.

Introducción

Las bacterias ácido-lácticas (LAB) son organismos deteriorantes específicos de alimentos refrigerados, ricos en nutrientes y envasados en atmósfera rica en CO_2. Típicamente causan deterioros en cárnicos y pescados, bebidas alcohólicas y alimentos acidificados como salsas para ensaladas y conservas vegetales (1). Los géneros más frecuentemente asociados al deterioro de alimentos son *Carnobacterium, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus y Pediococus*. Dentro de los géneros *Carnobacterium, Lactobacillus, Lactococus y Leuconostoc* existen especies psicrotrofas. Estas especies son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración y por tanto capaces de deteriorar alimentos refrigerados.

Concepto de organismo deteriorante específico

El deterioro de los alimentos es un tema complejo. Por organismo deteriorante específico nos referimos a aquella bacteria que produce en un alimento cambios sensoriales típicos del deterioro (2). No todas las bacterias presentes en los alimentos deteriorados causan deterioro sensorial. Generalmente, el grupo microbiano mayoritario es el responsable, pero no siempre es así. Poco se conoce sobre las interacciones microbiológicas en un alimento en deterioro. Para comprenderlas

mejor, actualmente los científicos estudian los mecanismos de señalización entre bacterias, caracterizan sustancias inhibidoras como las bacteriocinas, aplican modelos matemáticos predictivos y usan diversas técnicas dependientes e independientes de cultivo para la caracterización de la microbiota.

El deterioro por bacterias lácticas deteriorantes específicas de alimentos cocinados

En los últimos 10 años han surgido algunos "nuevos problemas" de deterioro en productos cárnicos finlandeses. Otros problemas se han resuelto con la ayuda de investigación científica. En los años 80 nos enfrentamos con problemas de contaminación post-cocinado de embutidos en rodajas (3-5). Cepas de *Lactobacillus sakei* productoras de mucosidad estaban causando problemas en varios productos cárnicos en toda Finlandia. Este problema se resolvió aislando el área de cortado y envasado de los productos cocinados del área de manejo de embutidos fermentados. Hoy la separación es una práctica común.

La siguiente LAB psicotrofa que estudiamos intensamente fue *Leuconostoc carnosum* que causaba el deterioro del jamón cocido y envasado al vacío, a finales de los años 90. Identificamos este organismo como una LAB deteriorante específica del jamón (6) y también seguimos el origen y progreso de la contaminación en el procesado del jamón (7). Pudimos demostrar lugares específicos de contaminación y ayudamos a desarrollar mejoras prácticas en la fabricación de estos productos. Ha sido ampliamente descrito que *L. carnosum* causa el deterioro del jamón cocido (8-11) y existen indicios de su resistencia a las temperaturas de cocción (8). En Finlandia los problemas de contaminación asociados con *L. carnosum* se evitaron separando los productos cocinados de los crudos y especialmente instalando hornos con entradas y salidas separadas. Todo ello permitió la descarga de los productos cocinados en áreas separadas y limpias.

Descripción de *Leuconostoc gasicomitatum*

Las modernas líneas de producción permiten una buena separación de los alimentos cocinados de los crudos y ello ha permitido a los fabricantes alcanzar una vida comercial mejor que la posible en los años 80. Pero no por eso desaparece la necesidad de futuras investigaciones. En lugar de los productos cárnicos cocinados, hoy día estudiamos los crudos. Se detectaron nuevos problemas con el desarrollo de nuevos productos como las carnes marinadas. A finales de los años 90 encontramos un rápido deterioro con producción de gas en carne de ave marinada y envasada en MA (12). El producto se deterioró en menos de una semana aunque su vida comercial eran dos semanas. Caracterizando la microbiota de los alimentos alterados, nos sorprendimos al encontrar que en la población deteriorante predominaban dos nuevas especies de LAB con propiedades metabólicas muy diferentes. *Leuconostoc gasicomitatum* fue descrita en el año 2000 (12) y *Lactobacillus oligofermentans* en el año 2005 (13). *L. gasicomitatum* utiliza con efectividad muchas fuentes de carbono mientras que *L. oligo-*

fermentans prefiere xilosa y arabinosa a la glucosa.

Leucosnostoc carnosum y *Leuconostoc gelidum* han estado asociados con el deterioro de alimentos desde el año 2000 (14). En el verano de 1997 ocurrió una extraña alteración de tiras de pollo crudas, marinadas en tomate y envasadas en MA. Este alimento se fabricaba a gran escala en una moderna planta de procesado. Normalmente, durante 10 días a 6 °C, que se había establecido como vida comercial, se mantenía una buena calidad del producto. Durante un periodo de problemas en la fabricación, muchos envases comenzaron a hincharse a los cinco días de envasado. Antes de la caducidad, los envases estaban muy hinchados. El fabricante realizó análisis microbiológicos que cubrían los principales grupos de bacterias patógenas, deteriorantes y levaduras. El único hallazgo significativo fue un gran número, hasta 10^{10} UFC/g de LAB en el producto. La población LAB fue caracterizada inicialmente mediante análisis numérico basado en el uso de una base de datos de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (en inglés, RFLP) de los genes ARNr 16+23S. El resultado fue la caracterización de un conjunto amplio de microorganismos aislados. La caracterización de los microorganismos se llevó a cabo por fenotipado clásico, análisis de pared celular y proteínas celulares junto con caracterización genotípica, análisis de fragmentos de restricción, secuenciación del ADNr 16S y determinación de homologías ADN-ADN. Sobre la base de estos resultados, la especie dominante en la población se consideró una nueva especie, para la que se propuso el nombre de *Leuconostoc gasicomitatum* (12).

Leuconostoc gasicomitatum como un organismo deteriorante específico

Siguiendo la descripción de las especies, *L. gasicomitatum*, primero fue considerado un organismo deteriorante específico de tiras de carne aviar marinadas. Este hallazgo fue confirmado por Susiluoto y colaboradores (15). *L. gasicomitatum* fue identificado en lotes de tiras de pollo marinadas y envasadas MA, procedentes de varios fabricantes. Sin embargo, *L. gasicomitatum* fue detectado también en una conserva de arenque báltico (*Culpea haerengus membras*) en vinagre, deteriorada después de unas cuantas semanas de conservación a 0-6 °C (16). El deterioro se manifestaba por la formación de gas y una limosidad espesa que afectaba a varios lotes producidos. El análisis microbiológico del producto deteriorado mostró altos recuentos de bacterias LAB, entre $4{,}5.10^{8}$ y $2{,}4.10^{9}$ UFC/g. En este caso, se consideró que las rodajas de zanahoria usadas para marinar el pescado fueron probablemente el origen de la contaminación por estos organismos. Recientemente en Finlandia (17), algunos productos preparados a base de filetes de buey inyectados resultaron inusualmente susceptibles al deterioro microbiológico y sensorial durante su vida comercial. El deterioro se caracterizaba por una decoloración verde y mal olor como a mantequilla. Las bacterias LAB prevalentes detectadas a niveles superiores a 10^{8} UFC/g fueron *Lactobacillus algidus, Lactobacillus sakei y Carnobacterium divergens*. La capacidad de estas bacterias para deteriorar los filetes inyectados fue estudiada en un experimento de inoculación realizado con cepas LAB y mezclas de cepas procedentes de los productos dete-

riorados. El estudio demostró el potencial de las cepas aisladas de *Leuconostoc gasicomitatum y Leuconostoc gelidum* para deteriorar este tipo de alimentos. Las dos especies produjeron decoloración verde y mal olor tipo mantequilla similares a los detectados en los productos comerciales con problemas.

Después de establecer el papel de *L. gasicomitatum* en productos cárnicos y de pescado, fue detectado en salchichas vegetales envasadas al vacío (18). Se estudió este problema de deterioro, caracterizado por la formación de gas y limosidad, que limitaba la vida comercial del producto. El estudio reveló que *Leuconostoc gelidum, Leuconostoc gasicomitatum y Leuconostoc mesenteroides* eran las bacterias LAB dominantes en las salchichas vegetales deterioradas. Ya en el estudio sobre el deterioro de arenques (16), *L. gasicomitatum* demostró crecer bien sobre rodajas de zanahoria. Por tanto, no era sorprendente que tuviera buen crecimiento sobre este tipo de salchicha vegetal.

Estudios de contaminación por LAB basados en técnicas moleculares

La contaminación de instalaciones de procesado cárnico con LAB psicotrofas ha sido estudiada mediante técnicas moleculares. Los orígenes y puntos de colonización de *L. sakei*, productor de limosidad, fueron identificados en las salas de corte y envasado de productos cárnicos cocidos (19). Este estudio se diseñó para distinguir la cepa productora de limosidad de otras LAB y especialmente del cultivo iniciador de *L. sakei* usado por el fabricante. Un estudio más detallado y amplio (7) fue llevado a cabo en una planta de jamón cocido y envasado al vacío, contaminada por *L. carnosum* (6). Se descubrió que el jamón cocido se contaminaba antes de ser loncheado y envasado. El vector de transmisión fue el aire, especialmente durante el manejo de los moldes de cocción. En estos estudios se utilizaron técnicas de ribotipado y electroforesis de campo pulsado.

Cuando *L. gasicomitatum* fue detectado en carne de pollo, se sospechó que pertenecía a la microbiota normal de esta matriz. Vihavainen y colaboradores (20) cultivaron piel y mucosa de aves en medios de crecimiento LAB y *Leuconostoc* para identificar las especies existentes. *L. gasicomitatum* no fue detectada en ninguna muestra de aves recién sacrificadas. Sin embargo, fue detectado, junto con otras bacterias LAB deterioradoras importantes, en muestras de aire de la planta de procesado. Consideramos que *L. gasicomitatum* y muchas otras LAB deteriorantes psicrotrofas son contaminantes ambientales que llegan a las plantas de procesado por diversos caminos. Los animales de sangre caliente no son fuentes importantes de estas bacterias psicrotrofas.

El genoma de *L. gasicomitatum* LMG18811^T

Hoy día *L. gasicomitatum* es nuestro organismo modelo en estudios de deterioro de alimentos. Hemos secuenciado su genoma completo y actualmente estamos investigando su potencial como organismo deteriorante y sus interacciones con otras bacterias. El genoma completo de *L. gasicomitatum* LMG1881^T está formado por 1.954.080 nucleótidos y fue secuenciado con un factor de repetición de 8,5

usando el método de secuenciación de Sanger y librerías basadas en cósmidos y fásmidos. El contenido promedio en G-C es 36,67%. La cepa tiene cuatro operones para ARNr y 67 genes ARNt, cubriendo todos los aminoácidos. Usando los programas de predicción Glimmer y EasyGene1.2 se detectaron 1.913 posibles genes codificadores de proteínas. La figura 1 muestra la clasificación COG (Grupos Ortólogos) de los genes. Se encuentran dos profagos y entre 5-10 transposones. La cepa LMG18811^T no tiene plásmidos.

La figura 2 muestra los factores que facilitan que un alimento sea deteriorado por *L. gasicomitatum*. Hemos demostrado cómo sus rutas metabólicas están asociadas con diferentes fenómenos de deterioro. Este hallazgo y la secuencia del genoma serán publicados durante el año 2009. Ahora es el momento de estudiar los factores asociados con el rápido crecimiento

Figura 1. Clusters de los grupos ortólogos de proteínas de Leuconostoc gasicomitatum *18811^T.*

Figura 2. Marcados en rojo se muestran los factores asociados a la detección de Leuconostoc gasicomitatum.

y competitividad de esta especie en circunstancias diversas. Hemos preparado herramientas de sobreexpresión y destrucción de genes para *L. gasicomitatum* y otras LAB deteriorantes. Estas herramientas serán usadas en el análisis del transcriptoma de *L. gasicomitatum*. Nuestra intención es comprender cómo está regulada la expresión génica en el *L. gasicomitatum* y qué papel juegan las interacciones bacterianas en el desarrollo de las poblaciones deteriorantes psicrotrofas y en el deterioro de los alimentos.

Bibliografía

1. Schillinger U, Holzapfel WH, Björkroth KJ. Lactic acid bacteria. In: de W Blackburn C, editor. Food spoilage microorganisms. 1st ed. Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing Limited. 2006. p. 541-78.

2. Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. 2002/9/15; 78(1-2):79-97.

3. Mäkelä P. Lactic acid bacterial contamination at meat processing plants with special reference to ropy slime producing lactic acid bacteria. 1993.

4. Mäkelä P, Korkeala H. Lactobacillus contamination of cooked ring sausages at sausage processing plants. Int J Food Microbiol. 1987 12/31; 5(4):323-30.

5. Mäkelä PM, Korkeala HJ, Laine JJ. Ropy slime-producing lactic acid bacteria contamination at meat processing plants. International Journal of Food Microbiology. 1992/9; 17(1):27-35.

6. Björkroth KJ, Vandamme P, Korkeala HJ. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. Appl. Environ. Microbiol. 1998 Sep; 64(9):3313-9.

7. Björkroth KJ, Korkeala HJ. Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. Appl Environ Microbiol. 1997 Feb; 63(2):448-53.

8. Samelis J, Bjorkroth J, Kakouri A, Rementzis J. *Leuconostoc carnosum* associated with spoilage of refrigerated whole cooked hams in Greece. J Food Prot. 2006 Sep; 69(9):2268-73.

9. Samelis J, Kakouri A, Rementzis J. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. Int J Food Microbiol. 2000 Jun 1; 56(2-3):133-43.

10. Samelis J. Managing microbial spoilage in the meat industry. In: Clackburn CdW, editor. Food spoilage microorganisms. 1st ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. 2006. p. 213-86.

11. Samelis J, Kakouri A, Rementzis J. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 °C. Food Microbiol. 2000; 17:329-40.

12. Björkroth KJ, Geisen R, Schillinger U, Weiss N, De Vos P, Holzapfel WH, et al. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. Appl Environ Microbiol. 2000 Sep; 66(9):3764-72.

13. Koort J, Anna Murros, Tom Coenye, Susanna Eerola, Peter Vandamme, Antti Sukura, and Johanna Björkroth. *Lactobacillus oligofermentans* sp. nov., associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged poultry products. Appl Environ Microbiol. 2005 August; 71(8):4400-6.

14. Björkroth J, Holzapfel W. Genera *Leuconostoc, Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin M, editor. The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. 3rd edition, release 3.12 ed. New York, http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/: Springer-Verlag. March 28, 2003.

15. Susiluoto T, Korkeala H, Björkroth KJ. *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating

lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. Int J Food Microbiol. 2003 Jan 15; 80(1):89-97.

16. Lyhs U, Koort JM, Lundstrom HS, Björkroth KJ. *Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve. Int J Food Microbiol. 2004 Jan 15; 90(2):207-18.

17. Vihavainen E, Björkroth J. Spoilage of value-added, high-oxygen modified-atmosphere packaged raw, beef steaks by *Leuconostoc gasicomitatum* and *Leuconostoc gelidum*. Int J Food Microbiol. 2007; 119:340-5.

18. Vihavainen EJ, Murros AE, Björkroth KJ. *Leuconostoc* spoilage of vacuum-packaged vegetable sausages. J Food Prot. 2008 Nov; 71(11):2.312-5.

19. Björkroth KJ, Korkeala H. Evaluation of *Lactobacillus* sake contamination in vacuum-packaged sliced cooked meat products by ribotyping. J Food Protect. 1996; 59:398-401.

20. Vihavainen E, Lundström H, Susiluoto T, Koort J, Paulin L, Auvinen P, *et al*. Role of Broiler Carcasses and Processing Plant Air in Contamination of Modified-Atmosphere-Packaged Broiler Products with Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria. Appl Environ Microbiol. 2007 February 15; 73(4):1136-45.

Nuevos enfoques en la definición y descripción de poblaciones microbianas deteriorantes de alimentos: los métodos moleculares directos aplicados a nivel de ADN y ARN

Dr. Luca S. Cocolin y Dra. Kalliopi Rantsiou

Introducción

En los últimos 10 años, el enfoque para estudiar la biodiversidad microbiana ha cambiado dramáticamente. Con el avance de la biología molecular y la invención de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se han desarrollado una nueva gama de técnicas que contribuyen al conocimiento de la complejidad microbiana en los ecosistemas naturales. Como consecuencia, las técnicas microbiológicas tradicionales, basadas en el cultivo en placa, el aislamiento y la identificación bioquímica, se han visto reforzados por nuevos métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos útiles para la detección, identificación y caracterización de los microorganismos. En este contexto, varios grupos de investigadores en alimentos comenzaron a aplicar métodos moleculares para el estudio de la ecología microbiana durante fermentaciones alimentarias, así como para seguir los cambios de la microflora durante el deterioro microbiano de los alimentos. Este capítulo trata sobre los métodos moleculares usados hasta el momento para identificar, caracterizar y describir la diversidad microbiana.

Enfoques usados para estudiar la diversidad microbiana

La comunidad científica reconoce que el uso de métodos basados en el cultivo de microorganismos (técnicas dependientes de cultivo, TDC) no describe apropiadamente la diversidad microbiana presente en un ecosistema específico (1). De hecho, poblaciones numéricamente limitadas, microorganismos estresados o en un estado subletal no pueden ser recuperados y por lo tanto no son tenidos en cuenta. Además, células no viables pero cultivables (VNC), que no son capaces de formar colonias sobre placas de agar pero que tienen actividad metabólica, no son detectables por las TDC. Los métodos que no dependen del cultivo (técnicas independientes del cultivo, en adelante TIC) han atraído la atención de muchos científicos de diferentes campos de la investigación, que van desde el medioambiente a la microbiología de los alimentos. Generalmente se basan en el análisis del ADN y ARN extraídos directamente de una muestra sin ningún tipo de cultivo. Los ácidos nucleicos son posteriormente amplificados mediante PCR y sometidos bien a técnicas de clonación y secuencia-

ción o bien a técnicas descriptivas tales como electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP). Más aún, en los últimos años la posibilidad de cuantificar directamente en las muestras poblaciones específicas por PCR cuantitativa (qPCR), ha permitido un mejor conocimiento del comportamiento de los microorganismos en las matrices alimentarias. La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) es un enfoque alternativo, también independiente de cultivo y no basado en la extracción de ácidos nucleicos procedentes de la matriz de la muestra. En este caso no sólo es posible identificar los microorganismos usando sondas específicas sino que también es posible ubicarlos espacialmente en la muestra investigada. En la figura 1 se muestran los métodos dependientes y no dependientes de cultivo. Además, el desarrollo extensivo de los métodos moleculares ha hecho posible la creación de nuevas herramientas que podrían ser usadas para la caracterización molecular de cepas aisladas mediante cultivo. La amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)-PCR, de elementos repetitivos del ADN bacteriano (Rep)-PCR, o la amplificación de secuencias ERIC (secuencias consenso comunes a varios géneros de Enterobacterias) mediante PCR son prácticas comunes en casi todos los laboratorios que estudian la ecología y

Figura 1. Métodos dependientes e independientes de cultivo usados para estudiar la ecología microbiana de alimentos [adaptada de (3)].

diversidad bacteriana. Hoy en día es ampliamente aceptado que son necesarios varios métodos complementarios para la identificación y caracterización de especies bacterianas en ecosistemas específicos. Esta combinación se define como enfoque polifásico (2).

Técnicas independientes de cultivo

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos independientes de cultivo pueden describir las poblaciones microbianas en ecosistemas microbianos complejos, sin necesidad de cultivo. La estrategia en la que se basan estos métodos es el análisis de los ácidos nucleicos extraídos directamente de la matriz. Una vez que están disponibles, el ADN y ARN pueden ser sometidos a varios análisis precedidos o no por una etapa de amplificación por PCR. Los métodos independientes de cultivo se han aplicado extensamente para el seguimiento de fermentaciones alimentarias, pero también para definir poblaciones microbianas durante los procesos de deterioro de los alimentos. La técnica más utilizada para este propósito es la DGGE. Como se dijo anteriormente, este método es capaz de diferenciar moléculas de ADN según su comportamiento en condiciones de desnaturalización. Cuando el método se usa para la descripción microbiana, la PCR se ejecuta con iniciadores universales capaces de amplificar todos los microorganismos presentes en la muestra. Tras este paso, se obtiene una mezcla compleja de moléculas de ADN que puede ser diferenciada y caracterizada por separación en geles con gradiente de desnaturalización. Cada banda individual visible en los geles D/TGGE representa un componente de la microbiota. Cuantas más bandas sean visibles más complejo es el ecosistema. A través del uso de estos métodos es posible, no sólo la descripción de las poblaciones microbianas, sino también seguir en el tiempo sus dinámicas. Sin embargo, estos métodos no son cuantitativos. El análisis por DGGE se ha aplicado varias veces en el estudio de fermentaciones alimentarias (4, 5) así como durante el deterioro de la carne y productos cárnicos (6, 7).

Otro método independiente de cultivo consiste en amplificar por PCR el ADN extraído de la muestra pero usando iniciadores específicos para una especie. Este enfoque se ha utilizado hasta el momento para la identificación de bacterias ácido-lácticas (LAB) y estafilococos coagulasa-negativos (CNC) en embutidos españoles fermentados (8) y también para identificar microorganismos deteriorantes. De hecho, se ha desarrollado un ensayo por PCR múltiple utilizando varios iniciadores específicos de especie para la identificación y diferenciación simultánea de *Pseudomonas fragi, P. lundensis y P. putida* y basado en la coamplificación de diferentes partes del gen de la subunidad pequeña de la carbamil fosfato sintetasa (carA).

La PCR carA múltiple se usó para detectar la presencia de estas tres Pseudomonas en muestras de cordero, cerdo y pollo probando ser efectiva para mostrar la evolución de estos organismos durante el almacenamiento de la carne (9). Además, con las últimas mejoras tecnológicas que permiten a la PCR convertirse en un método cuantitativo, se puede conseguir la enumeración directa de importantes especies tecnológicas y alterantes (deteriorantes).

Esta posibilidad fue descrita por primera vez por Martin *et al* (10), quien optimizó un protocolo cuantitativo PCR (qPCR) para la detección rápida de *Lactobacillus sakei* en embutidos fermentados.

Por último, la técnica de fluorescencia con hibridación *in situ* (FISH) es una TIC prometedora que, desafortunadamente, no ha sido nunca explotada eficientemente para el estudio de la diversidad microbiana durante el deterioro de los alimentos. Esta técnica usa una serie de sondas específicas para localizar diferentes microorganismos directamente en la muestra. Las sondas están marcadas con diferentes fluoróforos, permitiendo por lo tanto la detección de varias especies simultáneamente. Ya que las sondas son diseñadas generalmente para el ARN ribosomal, la técnica FISH sólo detecta células vivas (11). Una de las características más fascinantes de la técnica FISH es la posibilidad de localizar los microorganismos directamente en la matriz del alimento. Sin embargo, esta característica ha sido explotada sólo en productos lácteos (12). También ha sido usada recientemente para describir poblaciones microbianas en diferentes alimentos de origen cárnico y lácteo (13). Como se muestra en la figura 2, la técnica FISH puede ser usada de forma fiable para monitorizar el proceso de deterioro de los alimentos.

Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización

En años recientes se ha reforzado el estudio de la ecología microbiana en los ecosistemas alimentarios gracias a la introducción en este campo de los métodos directos independientes de cultivo. Estos métodos están basados en la extracción

Figura 2. Aplicación de la técnica FISH para seguir el deterioro microbiológico de carne picada después de 2 (panel A) y 11 (panel B) días de almacenamiento a 4 °C. Cortesía de Vermicon AG. Alemania.

de los ácidos nucleicos totales de una muestra dada y la descripción de los grupos de microorganismos presentes en los alimentos (con identificación de sus miembros individuales), de acuerdo con sus secuencias de ADN y/o ARN.

El análisis de los ácidos nucleicos puede ser llevado a cabo por hibridación con sondas específicas, por PCR especie-específica o universal, separación de las cadenas según su secuencia e identificación de los productos de PCR. La desventaja de la PCR especie-específica es que hay un límite para el número de especies que pueden ser detectadas/identificadas en una muestra. Además, hay que saber qué microorganismos se han de buscar en la muestra. Alternativamente, con el uso de iniciadores universales teóricamente todas las especies de los grandes grupos son amplificados. Posteriormente, se efectúa por D/TGGE la separación e identificación de las especies según las secuencias. La D/TGGE fue desarrollada en principio para el estudio de la ecología microbiana en muestras ambientales (14) pero pronto encontró aplicación en la microbiología de los alimentos (15).

Las principales ventajas de las técnicas directas son: (i) no tiene lugar el cultivo y por lo tanto no tiene lugar el sesgo asociado al uso de medios microbiológicos convencionales para la enumeración y aislamiento, (ii) comparado con el enfoque convencional usado hasta el momento en microbiología, que está basado en el aislamiento de cepas de la matriz de alimento y sus identificaciones por test fisiológicos/fenotípicos o por métodos moleculares, las técnicas directas requieren menos esfuerzo y tiempo, (iii) permiten una descripción paralela de las poblaciones de diferentes grupos microbiológicos. Sin embargo, estas técnicas requieren personal especializado y equipo relativamente costoso. Además, se ha determinado que el límite de detección para el más común de los métodos directos usados, la D/TGGE, está en torno a 10^3-10^4 unidades formadoras de colonias UFC/g o mL (4). En consecuencia, grupos microbianos presentes y activos pero cuya población es menor de 10^3-10^4 unidades formadoras de colonias UFC/g o mL no son detectados.

La aplicación de la PCR-DGGE sobre el ARN extraído directamente de la matriz y sometido posteriormente a transcripción inversa nos permite una mejor e interesante contribución al conocimiento de la ecología microbiana de los alimentos. El ADN puede persistir en un entorno dado, algunas veces por largos periodos después de que el microorganismo ha muerto. En contraste, el ARN se degrada rápidamente después de la muerte celular y en consecuencia, la aplicación de la RT-PCR-DGGE proporciona una huella (o perfil) de poblaciones vivas y metabólicamente activas. Cuando la RT-PCR-DGGE se ha aplicado a productos cárnicos los resultados son comparables con los obtenidos por PCR-DGGE (4), aunque en ciertos casos los perfiles RT-PCR-DGGE son más ricos (16).

Estas técnicas han sido empleadas satisfactoriamente en el estudio de la microflora de los alimentos. En la figura 3 se muestra un esquema analítico posible.

Cómo diseñar iniciadores PCR-DGGE

Cuando se aplica PCR-DGGE para estudiar poblaciones microbianas complejas,

Figura 3. Esquema que muestra el enfoque experimental utilizado para el estudio de la ecología microbiana de los alimentos usando métodos independientes de cultivo [adaptado de (3)].

como por ejemplo las presentes en muestras de alimentos, un parámetro importante, que influenciará los resultados obtenidos, es la elección del gen diana a amplificar previamente a la DGGE.

El gen diana ha de tener dos características básicas: (i) debería estar presente en todos los miembros del grupo microbiano que estamos considerando, (ii) debería tener regiones conservadas, sobre las que puedan ser diseñados los iniciadores universales y tener regiones variables, sobre las cuales sea posible efectuar la separación. Además, si el ARN va a ser analizado, el gen debería ser caracterizado como de expresión constitutiva. Los genes que cumplen con estos requerimientos son aquellos que están involucrados en funciones universales e importantes de la célula. Habitualmente los genes que codifican el ARNr caen dentro de esta categoría. En las bacterias se han utilizado varias regiones del gen que codifica el ARNr 16S, mientras que en levaduras el gen que codifica ARNr 26S es la diana habitual.

Una ventaja importante de los genes que codifican para ARNr 16S y 26S es el hecho de existir, para ambos genes, una base de datos con las secuencias de un gran número de especies representativas. Esto es importante ya que permite la identificación de las bandas DGGE por secuenciación y comparación con la base de datos. Un inconveniente asociado con el uso de genes que codifican ARNr es la inherente heterogeneidad de secuencias

dentro de la misma especie, resultado de múltiples copias con pequeñas diferencias en la secuencia (polimorfismo). Las copias múltiples originan a menudo multibandas en los perfiles DGGE que complican el análisis.

Se ha propuesto un gen alternativo para usar en la PCR-DGGE. Se trata del gen rpoB que codifica para la subunidad β, de la ARN polimerasa, presente habitualmente en una copia simple por genoma. La limitación para usar el gen rpoB es el escaso número de secuencias disponibles en las bases de datos, que impide la identificación de las bandas DGGE desconocidas.

La calidad de la información producida por PCR-DGGE depende del número y resolución de los fragmentos amplificados (amplicones) en los geles de gradiente de desnaturalización (17). En la elaboración de la huella genética de las comunidades microbianas de un producto alimentario, es importante que el método permita la diferenciación de las especies individuales asociadas con un alimento específico. Por esta razón, los iniciadores usados y las condiciones empleadas en la PCR-DGGE necesitan ser cuidadosamente consideradas, y si es necesario optimizadas, previamente a su aplicación en muestras reales de alimento (4, 17).

PCR y PCR cuantitativa

Al final de los años 80 se inventó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (en inglés, PCR), abriendo de este modo una nueva área en el análisis microbiológico, especialmente en la detección de patógenos. La filosofía de los métodos moleculares ya no es el cultivo, sino el análisis directo de los ácidos nucleicos. De esta manera el ADN y/o el ARN total, son extraídos de la muestra y posteriormente sometidos a un método de análisis en el cual es buscada y amplificada una diana determinada, a menudo específica para el microorganismo investigado. Los métodos basados en la PCR son típicamente independientes de cultivo, ya que los ácidos nucleicos se aíslan sin cultivo alguno. Si antes de la extracción del ADN, o del ARN, se hace una etapa de enriquecimiento, el método ya no puede ser considerado independiente de cultivo. Enriquecer la muestra es una práctica común en los análisis microbiológicos, incluyendo los exámenes de alimentos, también cuando se usan los métodos de PCR como sistemas de detección. Permite incrementar las concentraciones de las especies diana y, en el caso de sistemas alimentarios, ayuda a diluir los compuestos que se encuentran en las muestras y que inhiben la actividad de la ADN polimerasa, la enzima responsable de la síntesis de moléculas de ADN durante la PCR.

La aplicación en microbiología de los alimentos de los métodos basados en PCR permite el desarrollo de protocolos más rápidos, sensibles y específicos que los métodos microbiológicos tradicionales usados para la detección e identificación de los microorganismos relacionados con los alimentos. Normalmente el resultado de presencia o ausencia de una bacteria específica se obtiene tras 3 ó 4 horas, o como máximo 24-36 horas, si se ha llevado a cabo una etapa de enriquecimiento.

Los protocolos tradicionales de PCR, donde los productos de amplificación se detectan con gel de electroforesis, tienen la gran desventaja de ser exclusivamente

cualitativos. Si se lleva a cabo un análisis densitométrico usando una curva de calibración obtenida a partir de cantidades conocidas de ADN es posible una semicuantificación. Sin embargo, este tipo de aproximación no puede ser aplicado, por ejemplo, para la cuantificación de la concentración de un microorganismo específico presente en una muestra de alimento. Esto es así porque la detección de la señal en la PCR "convencional" ocurre al final del ciclo de amplificación, cuando la reacción alcanza una meseta (figura 4). Por esta razón, la cuantificación basada en la densitometría no es capaz de discriminar entre 10^3 y 10^5 células por mililitro o por gramo.

La PCR ha llegado a ser un método cuantitativo gracias a diversos avances tecnológicos. A finales de los 90 se diseñaron equipos capaces de detectar los productos PCR mientras se estaban produciendo y amplificando, lo que hizo posible el análisis cuantitativo de los productos de PCR. Esta técnica llamada PCR cuantitativa (en inglés, qPCR) o PCR en tiempo real (en inglés, Rt PCR) revolucionó el enfoque molecular en la microbiología de los alimentos. No sólo es posible cuantificar un microorganismo específico en alimentos, sino que también es posible estudiar su comportamiento ante los cambios medioambientales (por ejemplo composición del alimento, temperatura, pH, oxígeno, etc.).

Conclusiones

Actualmente estamos experimentando importantes avances en el análisis microbiológico de los alimentos, gracias a la disponibilidad de técnicas que, nunca como ahora, facilitan información significativa respecto a la ecología y seguridad de los productos alimenticios. La invención de la PCR, inicialmente caracterizada por su extrema rapidez en comparación con los métodos microbiológicos tradi-

Figura 4. Monitorización de los productos de amplificación por PCR convencional y PCR.

cionales, pero no adecuada para el recuento de células de patógenos, hoy es una técnica cuantitativa debido a la posibilidad de monitorizar, en tiempo real, la amplificación del producto de la PCR.

Tanto los ensayos basados en ARN como en ADN ofrecen versatilidad en la reducción de la incidencia de falsos negativos en las aplicaciones de aseguramiento de la calidad, sensibilidad en el procesado de matrices alimentarias heterogéneas, especificidad en diferenciar cepas bacterianas emparentadas estrechamente, y velocidad, como en el caso de muchas de las técnicas químicas de fluorescencia en tiempo real que hay actualmente en el mercado. Aunque algunas de las tecnologías basadas en los ácidos nucleicos no es probable que reemplacen completamente a los métodos de cultivo convencional, bioquímicos o inmunológicos, la mayoría de ellas ofrecen un potencial de alto rendimiento y fiabilidad, ventajas que compensan el coste del equipamiento inicial necesario y su posterior mantenimiento o el coste de los reactivos. El diagnóstico molecular también ofrece una herramienta fiable para el muestreo inicial, por lo que seguir usando métodos convencionales es necesario sólo si la muestra es positiva para el microorganismo de interés.

Con frecuencia, cuando ambos métodos, cultivo independiente y cultivo dependiente, son aplicados en paralelo, se obtiene información interesante. Desde la experiencia ganada hasta ahora en este campo, podemos concluir que las dos propuestas se complementan y que su uso resalta importantes aspectos que podrían pasar desapercibidos.

Indiscutiblemente, el principal avance de los métodos directos es que el cultivo mismo con sus limitaciones inherentes (organismos no cultivables por lesiones o estrés, o por pobre selectividad de los medios) puede ser evitado. Además, por primera vez, somos capaces de ver *in situ* qué microorganismos son metabólicamente activos y obtener información referente a la importancia relativa de los diferentes grupos microbianos en el proceso de transformación.

La posibilidad de usar técnicas moleculares capaces de diferenciar cepas dentro de la misma especie ayudará a entender la diversidad intraespecie de la microbiota involucrada en la fermentación y deterioro de los alimentos. Por ejemplo, diferentes cepas de la misma especie pueden estar tan implicadas en el desarrollo de perfiles sensoriales específicos, como los diferentes ingredientes y los procesos tecnológicos usados durante la producción. Para nosotros esto es un aspecto importante a considerar en nuestra comprensión de la ecología microbiana y necesita ser investigado aun más. Definir y comprender las dinámicas microbianas determinadas por la sucesión de especies, y la ecología microbiana, determinada por interacciones entre especies, es crucial, ya que estos son los parámetros que tendrán un gran impacto en las características organolépticas y sensoriales del producto final así como en el conocimiento del proceso de deterioro de un alimento.

Agradecimientos

Parte de los resultados incluidos en este capítulo fueron obtenidos dentro del proyecto de la UE llamado "PATHOGEN

COMBAT: control y prevención a nivel celular y molecular de futuros patógenos emergentes a través de toda la cadena alimenticia" patrocinado por la comisión Europea dentro del Sexto Programa Marco, contrato nº 007081. Agradecemos a Claudia Beimfohr de Vermicon AG, Alemania, por las fotos por FISH.

Bibliografía

1. Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on theemerging phylogenetic view of bacterial diversity. J Bacteriol. 1998; 180:4765-74.

2. Pontes SD, Lima-Bitterncourt IC, Chartone-Souza E, Amaral Nascimiento AM. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. J Ind Microbiol Biotechnol. 2007; 34:463-73.

3. Cocolin L, Dolci P, Rantsiou K. Molecular methods for identification of microorganisms in traditional meat products. In: Toldrà F, editor. Meat Biotechnology, New York: Springer. 2008. p. 91-127.

4. Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. Appl Environ Microbiol. 2001; 67:5113-21.

5. Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni C, Cattaneo P, Comi G, Cocolin L. Culture dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. Appl Environ Microbiol. 2005; 71:1977-86.

6. Diez A, Urso R, Rantsiou K, Jaime I, Rovira J, Cocolin L. Spoilage of blood sausages Morcilla de Burgos treated with high hydrostatic pressure. Int J Food Microbiol. 2008; 123:246-53.

7. Ercolini D, Russo F, Torrieri E, Masi P, Villani F. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. Appl Environ Microbiol. 2006; 72:4663-71.

8. Aymerich T, Martin B, Garriga M, Hugas M. Microbial quality and direct PCR identificationof lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:4583-94.

9. Ercolini D, Russo F, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Simultaneous detection of *Pseudomonas fragi, P. lundensis*, and *P. putida* from meat by use of a multiplex PCR assay targeting the carA gene. Appl Environ Microbiol. 2007; 73:2354-9.

10. Martin B, Jofré A, Garriga M, Pla M, Aymerich T. Rapid quantitative detection of Lactobacillus sakei in meat and fermented sausages by real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 2006; 72:6040-8.

11. Bottari B, Ercolini D, Gatti M, Neviani E. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 73:485-94.

12. Ercolini D, Hill PJ, Dodd ER. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:3540-8.

13. Cocolin L, Diez A, Urso R, Rantsiou K, Comi G, Bergmaier I, Beimfohr C. Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. Int J Food Microbiol. 2007; 120:100-9.

14. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. A Van Leeuw J Microb. 1998; 73:127-41.

15. Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. J Microbiol Meth. 2004; 56:297-314.

16. Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Urso R, Cantoni C, Comi G. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:1883-94.

17. Yu Z, Morrison M. Comparison of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:4800-6.

Aplicación de métodos combinados de conservación. Experiencias en la Universidad de Burgos

Dra. Ana M.ª Diez Maté, Dra. Isabel Jaime Moreno y Dr. Jordi Rovira Carballido

Introducción

Este capítulo presta especial atención a la aplicación de métodos combinados de conservación, desarrollados en diferentes experiencias realizadas en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Burgos, con la finalidad de mostrar al lector el enorme abanico de posibilidades que existe dentro del uso de estos métodos combinados y los diferentes resultados que se obtienen dependiendo de la opción elegida y de la finalidad del estudio, así como del tipo de producto en que se estén aplicando.

La conservación de los alimentos es fundamental y consiste en todas aquellas acciones realizadas para obtener productos más seguros y con mayor vida útil, de forma que mantengan en grado aceptable su calidad higiénica, nutricional, sensorial y tecnológica. Por lo tanto, mediante la conservación de los alimentos se consigue hacer frente a las alteraciones de los mismos, ya sean de tipo mecánico, como golpes y lesiones, físicas, como fluctuaciones de temperaturas y de humedad, químicas, debido a pardeamientos y oxidaciones y, por último, biológicas causadas por enzimas, microorganismos, ácaros e insectos.

Existen diversas clasificaciones de los métodos de conservación de los alimentos, la que se describe a continuación se divide en tres grupos en función de la finalidad de cada uno de estos métodos: eliminación, inhibición y, por último, inactivación o destrucción.

El primero de ellos, la eliminación, consiste en retirar los microorganismos o sus enzimas de los alimentos. Son de muy poca aplicación, ya que sólo se pueden utilizar en alimentos líquidos. Algunas de las técnicas utilizadas son la centrifugación, decantación y filtración.

Por otro lado, la inhibición consiste en impedir el desarrollo de los microorganismos que se encuentran en los alimentos, alejando los distintos factores que intervienen en el mismo de los valores óptimos para su crecimiento, como por ejemplo mediante del control de la temperatura (refrigeración o congelación), de la actividad de agua (deshidratación, liofilización o adición de solutos), del pH (acidificación directa o a través de la fermentación), del potencial redox (vacío o atmósferas modificadas) o bien mediante el uso de sustancias inhibidoras, entre muchas otras acciones. Todas estas acciones son muy utilizadas en la actualidad.

El último de los métodos es el de destrucción, el cual consiste en la inactivación permanentemente de todos o algunos de los grupos de microorganismos que se encuentran en los alimentos mediante distintos sistemas muy utilizados, como es el caso de los tratamientos térmicos, o a través de las llamadas tecnologías emergentes como son las radiaciones ionizantes, altas presiones (HPP), pulsos eléctricos, pulsos luminosos, campos magnéticos o sustancias bactericidas entre otras, las cuales se están utilizando cada vez más.

Además es importante evitar la recontaminación, que consiste en impedir la contaminación de los alimentos después de la aplicación de diversos métodos de conservación. Algunas de las técnicas utilizadas son el uso de envases herméticos, técnicas de envasado, el procesado aséptico, o a través del almacenamiento higiénico. La ventaja que presenta este método es que no sólo evita la acción de los agentes de alteración de origen biológico sino que también se puede evitar o reducir la acción de los agentes de alteración de tipo mecánico, físico y químico.

La aplicación de nuevas técnicas de conservación es necesaria ya que debido a las recientes crisis alimentarias, los consumidores demandan productos más seguros, saludables y de calidad, y además poco procesados y con una apariencia fresca. Con el fin de armonizar esa demanda sin comprometer la seguridad alimentaria de los mismos, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias como el procesado mínimo y los métodos combinados.

El procesado y conservación convencional consiste en la aplicación de una única técnica de conservación, con condiciones drásticas, que generalmente determina una intensa transformación de los alimentos, mientras que el procesado mínimo y los métodos combinados consisten en la aplicación de diversas técnicas o estrategias combinadas, más suaves, que en conjunto consiguen una adecuada conservación de los alimentos, pero sin modificarlos intensamente con el fin de obtener alimentos más sanos y nutritivos, utilizar menos aditivos y preservar las cualidades sensoriales de los mismos.

El procesado mínimo se basa en la utilización de técnicas de procesado que causan los mínimos cambios posibles en los atributos de calidad y frescura de los alimentos y al mismo tiempo proporcionan al producto gran estabilidad y una vida útil relativamente prolongada. Las estrategias utilizadas son variadas, en muchos casos se emplean los métodos combinados, pero también otras como: mayor higiene, empleo de salas blancas, o el uso de tecnologías emergentes.

Los métodos combinados consisten en la combinación de barreras o técnicas (factores inhibidores), insuficientes por separado para proteger el alimento, que en conjunto pueden llegar a impedir o retrasar la actuación de los factores de alteración, modificando en menor medida la calidad sensorial y nutritiva del alimento que los métodos tradicionales de conservación. La estabilidad microbiana y la seguridad de la mayoría de los alimentos se basan en una combinación de diversos factores de conservación (denominados obstáculos, barreras o vallas), que los microorganismos presentes en los alimentos son incapaces de remontar, y que fue introducido por primera vez por Leistner

(1). El efecto obstáculo es de vital importancia en la conservación de los alimentos, ya que en un producto estable los obstáculos controlan la alteración microbiana, la intoxicación alimentaria así como los beneficios de la fermentación (1, 2). Leistner y colaboradores comprendieron que el concepto obstáculo solamente ilustra el hecho bien conocido de que las complejas interacciones de temperatura, actividad de agua, pH, potencial redox, etc., son de extraordinaria importancia para la estabilidad microbiana de los alimentos. Desde la comprensión del efecto obstáculo se derivó a la denominada tecnología de obstáculos (3), en la que, utilizando combinaciones de obstáculos de forma deliberada e inteligente, se pueden conseguir mejoras en la seguridad y calidad de los alimentos. Esta tecnología de obstáculos tiene normalmente particular interés en la elaboración de alimentos mínimamente procesados de los países industrializados mientras que en los países en vías de desarrollo son de primordial importancia en la obtención de alimentos que se puedan conservar sin necesidad de refrigeración. Este concepto también se denomina conservación de alimentos por métodos combinados, procesos combinados, conservación por combinación o técnicas de combinación. La tecnología de obstáculos asegura la estabilidad y seguridad microbiana de los alimentos así como la calidad sensorial de los mismos (4, 5), proporcionando a los consumidores alimentos frescos y seguros y al mismo tiempo resulta económicamente eficaz para el industrial, ya que requieren menos gasto energético durante su producción y almacenamiento. Aunque hay muchas posibilidades de combinación de los distintos obstáculos, en la práctica los procesos combinados se pueden clasificar en dos grupos: los que se basan en la acción específica de distintos métodos de conservación sobre los microorganismos o enzimas en cuestión, los cuales actúan simultáneamente, como por ejemplo el uso de atmósferas protectoras (MAP) y refrigeración, o sucesivamente como un tratamiento de pasteurización y a continuación la refrigeración del producto; o bien, aquellos cuya acción se basa en la potenciación del efecto de otros métodos obteniéndose así un efecto sinérgico como por ejemplo el uso de un tratamiento térmico y HPP, tratamiento térmico y radiaciones ionizantes, radiaciones ionizantes y HPP… Diversos estudios han demostrado la efectividad del uso combinado por ejemplo del tratamiento de altas presiones (HPP) y bacteriocinas en productos cárnicos (6, 7) o con otras sustancias antimicrobianas naturales como lactato-diacetato (8, 9). De acuerdo con Raso y Barbosa-Cánovas (2003) (10), la combinación de sustancias antimicrobianas con HPP, podría aumentar la efectividad de la presurización con las correspondientes ventajas en la calidad y seguridad del producto. Desde que se conocen mejor los fenómenos de homeostasis, agotamiento metabólico y reacciones al estrés de los microorganismos en relación con el efecto obstáculo, se ha incrementado el conocimiento de los mecanismos fisiológicos del crecimiento, supervivencia y muerte de los microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos. Los alimentos obtenidos mediante tecnología de obstáculos son más frágiles que los productos alimenticios tradicionales que con frecuencia se procesan en exceso y

por tanto poseen un gran margen de seguridad. En consecuencia, cuando se utiliza la tecnología de obstáculos de manera intencionada deben definirse y controlarse exactamente los procesos aplicados. En un futuro, nuevas aplicaciones de la tecnología de obstáculos se deben desarrollar tanto para optimizar los alimentos tradicionales como los alimentos de nuevo diseño (11).

A continuación se explican brevemente siete de las experiencias realizadas en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Burgos o en colaboración con otros centros de investigación, donde se estudia la aplicación de distintos métodos combinados y el efecto que tienen en los diversos productos evaluados. Comenzaremos con un producto típico de la provincia de Burgos como es la morcilla, en la que los métodos combinados utilizados fueron el envasado al vacío, conservación a temperaturas de refrigeración junto al uso de ácidos orgánicos, altas presiones o una combinación de ambas. Otras de las experiencias realizadas fueron en productos cárnicos curados como lomo, jamón serrano, salchichón y cecina, siendo los métodos combinados aplicados en estos casos el envasado al vacío, la conservación en refrigeración, el uso de conservantes junto al tratamiento con altas presiones de estos productos. En cordero se empleó el envasado en MAP junto a la aplicación de cepas productoras de bacteriocinas y almacenamiento del producto en condiciones de refrigeración. Y por último, se explicará una experiencia realizada in vitro frente a *Listeria monocytogenes* donde se evaluaba el efecto que tenía frente a este microorganismo el uso de distintas combinaciones de pH, Tª y CO_2 junto al empleo de dióxido de cloro.

Morcilla de Burgos

La morcilla de Burgos es un producto cárnico tratado por calor, típico de la provincia de Burgos (España), pero existen multitud de productos similares elaborados con sangre y con distintos ingredientes en todo el mundo. Algunos de ellos son "cavourmas" en Grecia (12), "blutwurst" en Alemania (13) o "morcella de Assar" en Portugal, que incluye grasa, sangre y especias y es sometida a un pequeño ahumado después del proceso de cocción (14). Otros ejemplos son "black pudding" en Gran Bretaña, "kaszanka" en Polonia, "biroldo" en la bahía de San Francisco (EE.UU.) o "rellena" en México y Colombia. También en España tenemos otros tipos de morcillas, de las que se encuentran referencias documentadas como la morcilla de León y la morcilla de Aragón.

El presente estudio se integra dentro de la línea de investigación del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos, relacionada con la caracterización y conservación de alimentos y específicamente de la morcilla de Burgos. Desde la puesta en marcha del Área de Tecnología de los Alimentos en la Universidad de Burgos, uno de los principales objetivos de este grupo investigador se ha centrado en estudios de caracterización y tipificación de este producto con objeto de obtener una figura europea de protección como es la Indicación Geográfica Protegida (IGP) y además desarrollar estrategias para la mejora de la calidad higiénico sanita-

ria que permitan ampliar el mercado potencial de este producto. Con esta finalidad se quiso comprobar si diferentes tratamientos de conservación afectaban a la vida útil y características sensoriales de la morcilla de Burgos envasada al vacío, para lo cual, en el caso del estudio sobre la vida útil del producto, se llevaron a cabo análisis de pH y microbiología convencional, y en el caso de la evaluación de las características sensoriales, se realizaron dos tipos de análisis sensoriales que consistían en una prueba de diferencias mediante un panel de consumidores y por otro lado un análisis cuantitativo del perfil sensorial, a través de un panel entrenado.

El primer tratamiento que se estudió fue el uso de distintas sales de ácidos orgánicos comerciales (OAS). Las sales derivadas de ácidos orgánicos comerciales (Purac, Amsterdam, The Netherlands) utilizadas fueron un 3% de lactato potásico (PL), 3% de una mezcla de lactato sódico/lactato potásico (PL+SL) y por último un 2,5% de una mezcla de lactato potásico/diacetato sódico (PL+SD). El empleo de ácidos orgánicos ofrecen las ventajas de ser sustancias naturales, que alargan la vida útil e incrementan la seguridad microbiana en los productos, aunque también presentan algunos inconvenientes como en el caso de sales que contienen sodio ya que aumentan el contenido del mismo, hecho que se puede solucionar ajustando su concentración en el producto. Con los resultados obtenidos para este tratamiento, respecto al pH se observó que la mezcla de PL+SD era el único que causó un descenso inmediato significativo del pH ($P < 0,05$). El empleo de PL+SL destacó por retrasar más que el resto de tratamientos el crecimiento de la microbiota aerobia mesófila total y bacterias ácido-lácticas (BAL). Partiendo de recuentos iniciales por encima de tres unidades logarítmicas, retrasó la aparición de recuentos de BAL por encima de 7 log UFC/g aproximadamente 14 días respecto a las muestras control (15). Estos mismos resultados fueron confirmados para este mismo tratamiento en un segundo trabajo realizado (16), por lo que fue considerado como el más efectivo de los tratamientos estudiados y seleccionado por ello para posteriores estudios. Respecto al resto de microbiota estudiada, en ninguna de las muestras ni tratamiento se detectó *Clostridium perfringens*. Como se vio en trabajos previos (17), la principal microbiota que crece en este tipo de producto sin envasar son *Pseudomonas* spp, por lo que la utilización de 2,5% de lactato potásico/diacetato sódico podría ser el más conveniente para morcilla de Burgos sin envasar ya que mantenía por debajo del límite de detección sus recuentos a lo largo de todo el estudio, mientras que el resto de sales mostraron un efecto limitado tanto frente a *Pseudomonas* spp como frente a enterobacterias partiendo de recuentos elevados. Sin embargo, en el segundo trabajo (16) en el que se usó el PL+SL y se partía de recuentos menores para ambos microrganismos se observó que el uso de esta sal tenía de nuevo un efecto limitado frente a *Pseudomonas* spp, pero mucho mayor frente a enterobacterias. Las diferencias respecto al primer trabajo (15) se pueden deber a los diferentes recuentos de partida.

Como segundo método se estudió el efecto que tenía la aplicación de diversos tratamientos de HPP sobre la vida útil del

producto. Se utilizó un equipo Wave 6000/55 (NC Hyperbaric, Burgos, España) (este equipo fue utilizado en todos los experimentos que se describen en el presente capítulo) y los tratamientos elegidos fueron a 300, 500 y 600 MPa durante 10 minutos. Las ventajas que presenta el uso de esta tecnología es que alarga la vida útil e incrementa la seguridad microbiana de los productos, manteniendo en general las propiedades sensoriales. Con respecto a los resultados de pH obtenidos para este tratamiento, se observó que ninguno de los tratamientos aplicados producía diferencias significativas ($P < 0,05$) en el pH de forma inmediata, aunque la tendencia era encontrar un descenso más lento a medida que se aplicaban tratamientos más intensos. Las bacterias Gram positivas, como las BAL, se reducían ligeramente, aproximadamente 1 log UFC/g, después de la aplicación de cada uno de los tratamientos de HPP, siendo esta reducción y el retraso en la aparición de recuentos de BAL por encima de 7 log UFC/g, mayor a medida que también eran más intensos los tratamientos aplicados. En este trabajo se partía de recuentos inusualmente elevados de BAL por encima de 5 log UFC/g, aun así el aumento de la vida útil que se consiguió tras la aplicación de HPP fue de aproximadamente siete días a 300 y 500 MPa y 14 días con 600 MPa, siendo este último tratamiento el considerado como el más eficaz de entre los estudiados en el aumento de la vida útil del producto (15). Este comportamiento fue confirmado en un segundo y tercer trabajo realizados (16, 18), sin embargo, en estos dos últimos, los recuentos de partida de BAL fueron más normales (en torno a 3 log UFC/g), y consiguiéndose una vida útil de las morcillas tratadas de 36 días. Respecto a la influencia de estos tratamientos de HPP frente al resto de microorganismos evaluados, se observó que todos ellos eran efectivos en la reducción de la población de bacterias Gram negativas como enterobacterias y *Pseudomonas* spp, manteniéndolas por debajo de sus límites de detección a lo largo de todo el estudio.

Por último, se evaluó si existía un posible efecto sinérgico sobre el aumento de la vida útil del producto entre los dos tratamientos seleccionados como más eficaces. En esta ocasión, el uso combinado de 3% de lactato sódico/lactato potásico y HPP a 600 MPa durante 10 minutos produjo un ligero efecto sinérgico, aunque sin diferencias significativas, ni en el pH ni en los recuentos microbiológicos, respecto al tratamiento con HPP (16).

El segundo objetivo era evaluar como afectaban estos mismos tratamientos a las características sensoriales del producto.

Respecto a la aplicación de OAS, el panel de consumidores no encontró diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto a las muestras control. Para evaluar los parámetros de deterioro analizados a lo largo del tiempo se utilizó una escala del 1 a 5, siendo 1 ausencia de los mismos y 5 máxima intensidad, fijándose el valor de 3 como límite de rechazo del producto. Se observó que el tratamiento con PL+SL fue el único que retrasó significativamente el momento en el que se superó el valor límite de 3, fijado como rechazo del producto, posponiendo con ello el rechazo del mismo en una semana respecto al tratamiento control (15, 16).

Contrariamente a los resultados obtenidos con los ácidos orgánicos, el tratamiento realizado con HPP modificaba significativamente ($P < 0,05$) al producto respecto a las muestras control. Según los comentarios recogidos por los catadores, las morcillas tratadas se percibían como pastosas y con un sabor ligeramente diferente, si bien cuando se les preguntaba por sus preferencias entre ambas muestras, los catadores no encontraban diferencias significativas entre ambas (15, 16). En el estudio de los parámetros de deterioro a lo largo del tiempo de conservación en el primer trabajo (15), coincidiendo con lo obtenido para los resultados microbiológicos, no se observó ningún retraso en estos síntomas con el tratamiento a 300 MPa pero sí se obtenían mejores puntuaciones a medida que eran más intensos los tratamientos aplicados, retrasándose significativamente el tiempo en el que se superaba el valor límite de 3, fijado como rechazo del producto, en una semana con los tratamientos a 500 y 600 MPa. En el segundo trabajo realizado (16), en el cual se partía de recuentos microbianos más bajos se encontraron aún mejores resultados, observándose un retraso de al menos 15 días en la aparición de los signos de deterioro respecto al tratamiento control. Estos resultados han puesto de nuevo de manifiesto la importancia que tiene la contaminación de partida del producto en la efectividad del tratamiento con altas presiones para alargar la vida útil del mismo.

Para finalizar, se evaluó si existía un efecto sinérgico mediante el uso combinado de ambos tratamientos seleccionados en las características sensoriales. En el análisis de diferencias, de nuevo los consumidores encontraron diferencias en textura y sabor entre muestras tratadas y no tratadas, aunque no mostraron preferencias por ninguna de ellas. Respecto al perfil de los parámetros de deterioro, la combinación de ambos tratamientos mantuvo unos valores por debajo del límite de rechazo durante más tiempo, siendo al menos de dos semanas respecto a las muestras control, de una semana respecto a las muestras con ácidos orgánicos y coincidiendo con los resultados obtenidos para el tratamiento sólo con HPP. Por ello, se puede concluir que el uso combinado de los tratamientos seleccionados para HPP y OAS, no supone una mejora sensorial significativa del producto respecto a la utilización solamente del tratamiento HPP (16).

Por todo lo explicado anteriormente las principales conclusiones del trabajo fueron:

- El uso de OAS y HPP aumenta la vida útil de la morcilla de Burgos con respecto a las morcillas control sin tratar.
- Con el uso de un 3% de lactato sódico y lactato potásico, la vida útil del producto aumenta hasta los 28 días. En el caso de las altas presiones a 600 MPa durante 10 minutos, la vida útil aumenta hasta los 35 días, respecto a los 15 días de vida útil que se observaron en las muestras control.
- El uso combinado de los tratamientos seleccionados para HPP y OAS, no mejora significativamente la vida útil del producto respecto al uso solamente con el tratamiento de HPP.
- Sensorialmente, el panel de consumidores sólo encontraba diferencias significativas ($P < 0,05$) en las muestras

tratadas con HPP en la textura y el sabor, respecto a las muestras control, aunque estas modificaciones no fueron consideradas como negativas con respecto a las preferencias de los consumidores, por lo tanto el tratamiento con HPP no modificaba sensoriamente al producto de un modo negativo.

Lomo curado

Este estudio se encuadra dentro del Proyecto Europeo "PathogenCombat" en el que participa el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Burgos.

La finalidad del estudio consistía en evaluar el efecto de las altas presiones para inhibir la presencia de *L. monocytogenes* en lomo curado con el fin de mejorar la seguridad alimentaria del producto y evaluar si existían modificaciones sensoriales en el color causadas por este tratamiento.

Se analizaron 37 muestras de las cuales 22 fueron tratadas con altas presiones a 600 MPa durante 10 minutos y 15 muestras se utilizaron como controles.

Para este estudio se llevaron a cabo análisis microbiológicos mediante microbiología convencional siguiendo las normas ISO para la detección de *L. monocytogenes* y de biología molecular mediante PCR a tiempo real utilizando el Kit PCR SureFood PREP *Listeria monocytogenes* (Congen, Berlín, Alemania) para la detección específica de este microorganismo. Por otro lado, también se evaluó el color del producto tratado y sin tratar a través de un colorímetro (Spectrophotometer CM-2600d, Konica Minolta Sensing ING), donde L* mide la luminosidad del color, y va de 0 = negro, a 100 = blanco, a* se refiere a la gama que va del rojo (valores positivos) al verde (valores negativos), y b* se refiere a la gama que va del amarillo (valores positivos) al azul (valores negativos).

Como resultados más importantes se pudo destacar que el porcentaje de ausencia de esta bacteria pasa del 26,67% en las muestras sin tratar al 68,18% en las muestras tratadas mediante los análisis realizados a través de la microbiología convencional, y del 33,33% al 72,73%, respectivamente, en los análisis realizados con la PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos con ambos análisis fueron muy similares, la única diferencia se encuentra en el tiempo necesario para realizar los mismos, necesitándose 10 días en el caso de la microbiología convencional y tan sólo cuatro para PCR a tiempo real.

Respecto al análisis del color las muestras tratadas con altas presiones presentaron un color más oscuro, más rojo y más amarillo que las muestras sin tratar con altas presiones, aunque cuando se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos se obtuvo que no existían diferencias significativas respecto al color entre las muestras tratadas y no tratadas.

Por lo tanto, las principales conclusiones del trabajo fueron que el tratamiento con altas presiones a 600 MPa durante 10 minutos reduce la probabilidad de tener resultados positivos en detección de *L. monocytogenes* en lomo curado, sin modificar el color del producto, por lo que sería un método útil para aumentar la seguridad alimentaria del mismo (19).

Jamón serrano

En esta ocasión se buscaba estudiar la efectividad del tratamiento HPP sobre la población de *L. monocytogenes* inoculada en jamón serrano con el fin de mejorar la seguridad alimentaria y evaluar si las altas presiones determinaban modificaciones sensoriales en el color.

El jamón serrano en lonchas se distribuyó en 64 envases, que se dividieron en cuatro lotes de 16 envases cada uno, que antes o posteriormente a la inoculación se envasaron al vacío. El primero de ellos se utilizó como control, el segundo se inoculó con una concentración en torno a 10^3-10^4 UFC/g de una mezcla de distintas cepas de *L. monocytogenes* (CECT 932, 934, 4032, 5366), el tercero fue inoculado del mismo modo y tratado a continuación a 500 MPa durante tres minutos y el último de los lotes fue inoculado de igual manera y tratado a 600 MPa durante tres minutos.

Para este estudio se llevaron a cabo análisis microbiológicos mediante microbiología convencional siguiendo las normas ISO para el recuento y la detección de *L. monocytogenes*. Por otro lado, también se evaluó el color del producto tratado y sin tratar a través de un colorímetro (Spectrophotometer CM-2600d, Konica Minolta Sensing ING).

Entre los resultados obtenidos se ha de destacar que en ninguna de las muestras control evaluadas se detectó *L. monocytogenes*. Los tratamientos con altas presiones redujeron los recuentos de *L. monocytogenes* inoculada inmediatamente después del tratamiento, siendo la reducción de aproximadamente 1,50 log UFC/g a 500 MPa-3' y 3,00 log UFC/g a 600 MPa-3'. A pesar de que inicialmente el tratamiento a 500 MPa era menos efectivo, después de 10 días de almacenamiento ambos tratamientos presentaban los mismos niveles de seguridad microbiológica en el producto, no detectándose *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras. Respecto al color, el tratamiento con HPP no causaba diferencias significativas respecto a las muestras control, sin embargo lo que se observó es que el parámetro b* evolucionaba con el tiempo hacia valores más bajos, pero estas modificaciones se veían significativamente ralentizadas ($P < 0,05$) con las altas presiones.

Por lo tanto, las principales conclusiones del trabajo fueron que el tratamiento de HPP a 600 MPa era el más efectivo de los evaluados, siendo capaz de inhibir a *L. monocytogenes* inoculada en el jamón curado inmediatamente después de aplicar el tratamiento, manteniendo la seguridad del producto debido al efecto sinérgico de HPP, condiciones de almacenamiento (refrigeración y envasado) y las características del propio producto. Por otro lado, el color no se ve afectado por HPP, y además la aplicación de este tratamiento retrasaba la aparición de cambios en este parámetro con el tiempo (20).

Otros productos cárnicos curados. Cecina de León y salchichón

Ambos experimentos son fruto de la colaboración entre la Estación Tecnológica de la Carne del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León y el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Burgos.

En el caso del experimento realizado en cecina de León, se estudió la combinación de envasado al vacío, de los conservantes habitualmente utilizados en la elaboración de este producto, el tratamiento con altas presiones y la conservación del mismo bajo condiciones de refrigeración.

El tratamiento con altas presiones (500 MPa durante cinco minutos) es un método efectivo para retrasar el crecimiento de microorganismos alterantes en la cecina de León envasada al vacío, especialmente cuando está en lonchas, y además no se observan cambios sensoriales ni físico-químicos entre las muestras tratadas y sin tratar (21). Por lo tanto, se consideró que el tratamiento con altas presiones utilizado era un método de conservación válido para la cecina de León que mejora la conservación del producto sin modificar sus características.

En el caso del salchichón no se obtuvieron tan buenos resultados utilizando los mismos métodos combinados, obteniéndose que el tratamiento con altas presiones (500 MPa durante cinco minutos) inhibía sólo ligeramente el crecimiento de microorganismos como mohos y levaduras y bacterias psicotrofas y anaerobias, aunque de nuevo las HPP no causaban diferencias en las propiedades físico-químicas y sensoriales del salchichón, incluso cuando se había enriquecido en ácidos grasos insaturados, por lo que en este producto el tratamiento con altas presiones no potenciaba la oxidación (22).

Cordero

Este estudio también se encuadra dentro del Proyecto Europeo "PathogenCombat" en el que participa el Área de Tecnología de los Alimentos.

En esta ocasión se buscaba estudiar la efectividad de la aplicación de cepas productoras de bacteriocinas frente a *Listeria monocytogenes* inoculada sobre filetes de cordero envasados con distintas atmósferas con el fin de mejorar la seguridad alimentaria del producto sin que se modificara sensorialmente.

Lo primero que se realizó fue la evaluación de la actividad antimicrobiana de dos cepas productoras de bacteriocinas, *Leuconostoc pseudomesenteroides,* productora de la bacteriocina PCK 18 y *Lactobacillus pentosus,* productora de la bacteriocina PCD 101 (Anidral, Novara, Italia), frente a ocho cepas de *L. monocytogenes*, cuatro de ellas originarias de muestras alimentarias y cuatro pertenecientes a la colección española de cultivos tipo. Los mejores resultados se obtuvieron en el caso de *L. pseudomesenteroides* cuya bacteriocina presentaba actividad antimicrobiana frente a seis de las ocho cepas de *L. monocytogenes* evaluadas, mientras que en el caso de *L. pentosus* no se obtuvo ningún resultado positivo frente a las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas.

Para realizar el estudio se inocularon filetes de cordero con una concentración de 10^5-10^6 UFC/g de la mezcla de cuatro cepas de *L. monocytogenes* (CECT 934, 4032, 5366 y una aislada de cordero) y posteriormente se envasaron al vacío y con distintas atmósferas protectoras, una con alto contenido en CO_2 (A) (15% O_2/60% CO_2) y otra con bajo contenido en CO_2 (B) (15% O_2/30% CO_2) y por otro lado se realizó lo mismo pero además de inocular con las

cepas de *L. monocytogenes* se inocularon las muestras con una concentración en torno a 10^6 UFC/g, con la cepa productora de la bacteriocina PCK 18.

Los principales resultados obtenidos se pueden ver en la figura 1, donde se observa que el empleo de atmósferas protectoras con alto contenido en CO_2 inhibía el crecimiento de *L. monocytogenes* en mayor medida. Por otro lado, la cepa productora de la bacteriocina PCK 18 reducía los recuentos de *L. monocytogenes* entre 2-3 log respecto al empleo sólo de MAP. Sin embargo, sensorialmente el empleo de la cepa productora de la bacteriocina PCK 18 causaba modificaciones en el olor del producto antes que las muestras no inoculadas con dicha cepa.

Por lo tanto, la principal conclusión del trabajo fue que a pesar de que el uso combinado de MAP junto al empleo de la cepa productora de la bacteriocina PCK 18 es muy efectivo en la inhibición *L. monocytogenes*, las características sensoriales del producto se modificaban antes.

Estudio *in vitro*

Este estudio fue realizado en colaboración con la Universidad de Gante (Bélgica) bajo la supervisión de los Doctores F. Devlieghere y M. Uyttendaele.

El objetivo era estudiar la revivificación de *Listeria monocytogenes* después del tratamiento con métodos combinados, como el tratamiento de las mismas con

Figura 1. Recuentos de Listeria monocytogenes (log UFC/g) para todas la muestras estudiadas. Ab: atmósfera 15% O_2/60% CO_2 + L. monocytogenes + bacteriocina; Ai: atmósfera 15% O_2/60% CO_2 + L. monocytogenes; Bb: atmósfera 15% O_2/30% CO_2 + L. monocytogenes + bacteriocina; Bi: atmósfera 15% O_2/30% CO_2 + L. monocytogenes; Vb: vacío + L. monocytogenes + bacteriocina; Vi: vacío + L. monocytogenes.

ClO_2 junto con diversas condiciones de sal, pH y Tª. Para ello, previamente se realizó la estandarización del tratamiento con ClO_2, para a continuación evaluar el comportamiento de 17 cepas de *L. monocytogenes* frente al mismo y por último realizar el seguimiento de la revivificación de *L. monocytogenes* en condiciones adversas de sal, pH y Tª después de su tratamiento con ClO_2.

Algunas de las ventajas que presenta el ClO_2 líquido son que tiene actividad antimicrobiana, alta función oxidativa (2,5 veces mayor que Cl_2), y es 10 veces más soluble en agua que el Cl_2. Sin embargo, también presenta inconvenientes como que el ClO_2 gas es explosivo a altas concentraciones, que varía su concentración fácilmente, es volátil y su actividad antimicrobiana se ve afectada por la materia orgánica.

Para evaluar la combinación del ClO_2 junto con distintas condiciones de sal, pH y Tª, se estudió la revivificación de las cepas de *L. monocytogenes* tratadas mediante el análisis de la densidad óptica en placas de 96 pocillos.

La estandarización de la concentración de ClO_2 dio como resultado que la más recomendable era 6 ppm, consiguiendo una reducción de 2 log en las cepas de *Listeria monocytogenes* estudiadas. A continuación se evaluó el comportamiento de las 17 cepas, seleccionándose tres de ellas por su diferente comportamiento frente al ClO_2 para continuar con el estudio.

En el caso del empleo de cepas de *L. monocytogenes* tratadas con ClO_2 líquido junto con distintas concentraciones de sal se observó que las cepas de *L. monocytogenes* no tratadas con ClO_2 crecían de forma más lenta que las no tratadas. También se observó que con mayores concentraciones de sal el crecimiento de dicho microorganismo era más lento, tanto en cepas tratadas como no tratadas. Y por último, las tres cepas tanto tratadas como no tratadas con ClO_2 mostraban por lo general un comportamiento similar.

En el caso de la combinación de cepas tratadas con ClO_2 líquido y expuestas a diferentes pH, se pudo observar que de nuevo las cepas de *L. monocytogenes* tratadas crecían más tarde que las no tratadas, además a menores pH las cepas tratadas y no tratadas crecían de forma más lenta. En esta ocasión cada una de las cepas, tanto tratadas como no tratadas, mostraban comportamientos muy variables entre ellas.

Y por último, respecto al empleo combinado de cepas tratadas con ClO_2 líquido junto con el empleo de distintas temperaturas se observó que cada una de las cepas, tanto tratadas como no tratadas, mostraban comportamientos diferentes entre ellas, aunque en todos los casos las cepas tratadas con ClO_2 retrasaban su crecimiento en todas las temperaturas evaluadas, respecto a las cepas no tratadas. También se observó que a menor temperatura, el crecimiento era más lento para todas las cepas estudiadas.

Por lo tanto, la principal conclusión de trabajo fue que una combinación óptima de sal, pH o temperatura con el tratamiento de ClO_2 podría aumentar la vida útil y la seguridad de los alimentos (23).

Bibliografía

1. Leistner L. Hurdle effect and energy saving. In: Downey WK (Ed). Food Quality and Nutrition. Applied Science Publishers, London, UK. 1978.

2. Leistner L, Rödel W, Krispien K. Microbiology of meat products in high- and intermediate-moisture range. In: Rockland LB and Stewart GF (Eds). Influences on Food Quality. Academic Press, New York, NY. 1981.

3. Leistner L. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. In: Simatos D and Multon JL (Eds). Properties of Water in Foods in Relation to Quality and Stability. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Nederland. 1985.

4. Leistner L. Food preservation by combined methods. Food Research International. 1992; 25(2):151-8.

5. Leistner L. Food protection by hurdle technology. Bulletin of the Japanese Society Research Food Protection. 1996; 2:2-27.

6. Aymerich T, Garriga M, Ylla J, Vallier J, Monfort JM, Hugas M. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria* innocua in meat products. Journal of Food Protection. 2000; 63(6):721-6.

7. Garriga M, Aymerich MT, Costa S, Monfort JM, Hugas M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. Food Microbiology. 2002; 19(5):509-18.

8. Marcos B, Jofré A, Aymerich T, Monfort JM, Garriga M. Combined effect of natural antimicrobials and high pressure processing to prevent *Listeria monocytogenes* growth after a cold chain break during storage of cooked ham. Food Control. 2008; 19(1):76-81.

9. Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Balasubramaniam VM, Niranjan K, Knorr D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2007; 47(1):69-112.

10. Raso J, Barbosa-Cánovas GV. Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2003; 43(3):265-85.

11. Leistner L. Métodos combinados de conservación de alimentos. En: Shafiur Rahman M (Eds). Manual de conservación de los alimentos. Acribia, Zaragoza, España. 2002.

12. Arvanitoyannis IS, Bloukas JG, Pappa I, Psomiadou E. Multivariate data analysis of Cavourmas - a Greek cooked meat product. Meat Science. 2000; 54(1):71-5.

13. Stiebing A. Blood sausage technology. Fleischwirtschaft. 1990; 70(4):424-8.

14. Roseiro LC, Santos C, Almeida J, Vieira JA. Influence of packaging and storage temperature on cured pork blood sausages shelf-life. In Proceedings 44th International Congress of Meat Science and Technology (pp. 430-1) Barcelona, Spain. 1998.

15. Diez AM, Santos EM, Jaime I, Rovira J. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. Food Microbiology. 2008; 25(1):154-61.

16. Diez AM, Santos EM, Jaime I, Rovira J. Effectiveness of combined preservation methods to extend the shelf life of "morcilla de Burgos". Meat Science. 2009; 81(1):171-7.

17. Santos EM, Diez AM, González-Fernández C, Jaime I, Rovira J. Microbiological and sensory changes in "morcilla de Burgos" preserved in air, vacuum and modified atmosphere packaging. Meat Science. 2005; 71(2):249-55.

18. Diez AM, Urso R, Rantsiou K, Jaime I, Rovira J, Cocolin L. Spoilage of blood sausages "morcilla de Burgos" treated with high hydrostatic pressure. International Journal of Food Microbiology. 2008; 123(3):246-53.

19. Corcuera ME, Diez AM, Tonello C, Jaime I, Rovira J. Effectiveness of high hydrostatic pressure on detection of *Listeria monocytogenes* in pork cured loin by conventional microbiology and real time PCR analyses. In:

The 21st International ICFMH Symposium. FoodMicro 2008. Aberdeen, Scotland. p. 239.

20. Osés SM, Diez AM, Martín N, Tonello C, Jaime I, Rovira J. Effectiveness of high hydrostatic pressure on reduces *Listeria monocytogenes* population in inoculated dry-cured ham. In: The 53rd International Congress of Meat Science and Technology. 2007. Beijing, China. p. 551.

21. Rubio B, Martínez B, García-Cachán MD, Rovira J, Jaime I. Effect of high pressure preservation on the quality of dry cured beef "cecina de León". Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2007; 8(1):102-10.

22. Rubio B, Martínez B, García-Cachán MD, Rovira J, Jaime I. The effects of high pressure treatment and of storage periods on the quality of vacuum-packed "salchichón" made of raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2007; 8(2):180-7.

23. Rajkovic A, Uyttendaele M, Van Houteghem N, Gómez SMO, Debevere J, Devlieghere F. Influence of partial inactivation on growth of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions of increased NaCl concentration or increased acidity. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2009; 10(2):267-71.

“Pasteurización” de alimentos por altas presiones

Dra. Margaret F. Patterson y Dr. Mark Linton

Introducción

El consumidor de hoy espera, y tiene derecho a ello, consumir alimentos seguros, pero además muchos desean otros atributos tales como comodidad, buena calidad nutritiva y sensorial, larga vida comercial, naturalidad, sin aditivos y el mínimo procesado de elaboración. Es difícil, si no imposible, encontrar una única tecnología de procesado de alimentos que pueda reunir todos estos requerimientos. Los tratamientos térmicos, tales como la pasteurización o la esterilización, han sido usados extensamente durante años y son bien aceptados por los consumidores. Sin embargo, estos tratamientos pueden tener efectos negativos sobre la calidad nutritiva y sensorial de algunos alimentos. En las últimas décadas se han investigado diversas tecnologías de procesado no basadas en el calor.

Una de las tecnologías más prometedoras es el uso de las altas presiones hidrostáticas, también conocidas como procesado por altas presiones (PAP, o en versión original HPP, High Pressure Processing). La idea de usar presiones altas para conservar alimentos no es nueva. Hite (1) publicó que la leche tratada con presión se conserva “dulce” durante más tiempo, indicando que muchos de los microorganismos causantes de su deterioro habían sido destruidos por el tratamiento. También publicó la utilidad de la presión para alargar la vida comercial de las frutas por inactivación de las levaduras, y adicionalmente señaló el problema de la resistencia de las esporas bacterianas a la presión (2).

El interés científico en el uso de las altas presiones para inactivar microorganismos continuó en los siguientes 70 años, dando lugar a numerosas publicaciones sobre inactivación de bacterias, virus, levaduras y mohos (3-5). También fueron descritos otros efectos interesantes de la presión, por ejemplo su efecto sobre las proteínas (6, 7). Sin embargo, sólo desde 1980 la alta presión es considerada como una tecnología aplicable al procesado de alimentos.

En esa época, la alta presión tenía varias aplicaciones industriales bien conocidas, tales como la producción de cerámica y diamantes industriales. El diseño de los equipos había mejorado significativamente en estos años, y ya se disponía de modelos comerciales, seguros, fiables y adecuados para la industria alimentaria. Los primeros alimentos comerciales tratados con altas presiones fueron desarrollados en Japón. En su mayoría eran productos ácidos, basados en frutas tales como mermeladas y salsas. Desde entonces, ha crecido la aplicación de esta tecnología y actualmente hay más de 120 instalaciones de PAP en cuatro continentes (Tonello, 2009, comunicación personal). También parece que, a diferencia de otros trata-

mientos no térmicos como la irradiación por rayos gamma, la tecnología PAP tiene una aceptación general por los consumidores. En el año 2001 la UE simplificó la legislación sobre Novel Food. Esencialmente, si un producto nuevo se demuestra como "sustancialmente equivalente" a otro producto existente en el mercado, puede ser considerado de acuerdo con la legislación nacional y no está sujeto a la legislación de Novel Food (8).

La unidad de presión en el S.I. es el Pascal, siendo 1 Pascal (Pa) equivalente a 1 Newton/m^2. Esta unidad de presión es muy pequeña y en el sistema métrico de presión se usa el KPa (10^3 Pa) o el MPa (10^6 Pa). Otras unidades de presión más antiguas son el bar, la atmósfera o la libra por pulgada cuadrada (ver tabla 1, para comparar unidades). La mayoría de las aplicaciones en alimentación requieren presiones entre 300 y 600 MPa mantenidas durante varios minutos.

Aplicaciones comerciales de los alimentos tratados por presión

En 1994, la empresa Ulti en Francia fue la primera en la UE en comercializar alimentos tratados por altas presiones. El zumo de naranja fue el producto principal con volúmenes más pequeños de zumo de limón y pomelo. El PAP se ha usado para alargar la vida comercial, en refrigeración, del zumo fresco de fruta. El objetivo era disminuir los costes logísticos sin afectar la calidad sensorial y el contenido en vitaminas del zumo. Hoy los zumos PAP se encuentran en varios países incluyendo Portugal, Italia, República Checa, España y Australia (Tonello, comunicación personal).

En 1998, la empresa española Espuña fue una de las primeras en procesar jamón en lonchas y productos cárnicos de delicatessen, en estuchados flexibles, usando un proceso industrial de "pasteurización fría" trabajando a presiones entre 400-500 MPa durante varios minutos. Hoy las carnes PAP constituyen aproximadamente un tercio del mercado mundial de alimentos tratados por presión. En muchos casos, la tecnología se usa como un tratamiento final de descontaminación de productos ya envasados y listos para comer, para eliminar patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. Esto es de particular importancia en EE.UU., país de "tolerancia cero" a *L. monocytogenes*. Además, es posible alargar significativamente la vida comercial de los productos refrigerados manteniendo las propiedades organolépticas. Productos cárnicos PAP se comercializan en países como EE.UU. (precocinados de ave, buey y pollo), Canadá (carnes curadas y precocinados), España (jamón y otras carnes

Tabla 1. Conversión de unidades de presión.

Unidad	MegaPascales (MPa)	Kilobar (kbar)	Libras por pulgada cuadrada (psi)	Atmósferas
100 MPa	100	1	14.504	986,9
5 kbar	500	5	72.520	~4934
100.000 psi	~690	~7	100.000	6.805

curadas) y Alemania (carnes curadas). En Japón, el PAP se utiliza para producir "bacon", salchichas y carne en lonchas sin nitratos. En estos casos, la tecnología se utiliza para producir alimentos sin conservantes o de menor contenido en sal que los equivalentes tradicionales.

Se comercializan productos vegetales PAP desde 1997, cuando la compañía Fresherized Foods en EE.UU. usó por primera vez esta tecnología para conservar guacamole. El PAP reduce la actividad polifenol oxidasa lo que permite mantener el color verde fresco así como el sabor, y retardar el deterioro microbiológico. Desde entonces ha crecido la gama de productos hasta platos completos PAP que incluyen carne precocinada, salsa, guacamole, pimientos y cebolla. Solo las tortillas de harina no son PAP. Estas comidas tienen una vida comercial de al menos 35 días. Otros productos vegetales PAP incluyen salsas vegetales (EE.UU., Canadá y Japón), platos vegetales listos para comer (España), tofu y *hummus* (EE.UU.). En Japón, el PAP se utiliza para reducir la retrogradación del almidón en el arroz, obteniendo un producto de cocción rápida.

El marisco PAP es otro mercado importante. La primera aplicación comercial vino de la compañía de EE.UU., Motivatit Seafoods Inc (ver: www.theperfectoyster.com), que usó la tecnología PAP para abrir las ostras fácil y limpiamente, sin afectar a la calidad sensorial. La tecnología funciona igualmente bien en otros bivalvos y también se usa en cangrejo y langosta. El interés principal del uso de esta tecnología es la facilidad para separar las conchas y el aumento del rendimiento, aunque otro beneficio menor es la reducción de patógenos tales como *Vibrio* spp.

Actualmente, los mariscos tratados por altas presiones son comercializados en Canadá, Nueva Zelanda, Japón e Italia, además de EE.UU.

Procesado por altas presiones

Un sistema típico de tratamiento por altas presiones consiste en una cámara de tratamiento, un fluido que transmite la presión (generalmente agua potable) y una o más bombas que generan presión. Es un proceso por lote y las cámaras de tratamiento tienen capacidades entre 35 y 700 L, con un coste que oscila generalmente entre los 300.000 y 2 millones de euros, según el tamaño (ver figura 1a y 1b).

Los alimentos envasados son introducidos en la cámara, que es cerrada, y a continuación comienza el bombeo de agua dentro de la cámara. Cuando se alcanza la presión de trabajo, el bombeo cesa y se cierran las válvulas para mantener la presión sin otro gasto energético. La presión es transmitida rápida y uniformemente a través del agua y el alimento. Cuando ha transcurrido el tiempo fijado, la presión es liberada y los envases se sacan de la cámara. Como esto es un proceso por lote, el rendimiento es relativamente limitado en comparación con otros procesos alimentarios continuos como el autoclavado. Sin embargo, la salida "continua" de alimentos bombeables como el zumo de frutas se puede conseguir colocando en paralelo tres o más cámaras de presión (llamadas en inglés "isolator" porque una partición separa físicamente el fluido a tratar del fluido que genera la alta presión). La secuencia de operación

Figura 1a. Instalación vertical Avure 35 L HPP en el Agri-Food and Biosciences Institute, Belfast, UK.

de cada cámara es calculada automáticamente con respecto a las otras para conseguir una salida "continua" del alimento tratado (9).

La presión se aplica al alimento de una manera isostática. Ello implica que todos los átomos y moléculas del alimento están sujetos a la misma presión, y exactamente el mismo tiempo, a diferencia de los procesos térmicos donde ocurren gradientes de temperaturas.

La segunda característica clave de las altas presiones, derivada del principio de Le Chatelier, es que cualquier fenómeno que dé lugar a un descenso de volumen es favorecido por un incremento de la presión. Por tanto, la aplicación de altas presiones favorece la formación de puentes de hidrógeno, mientras que son desestabilizados otros enlaces débiles de las proteínas. Sin embargo, los enlaces covalentes no son afectados por las altas presiones.

Efectos de las altas presiones sobre los microorganismos

Se han publicado muchos trabajos sobre los cambios inducidos por las altas presio-

Figura 1b. Máquina horizontal NC Hyperbaric 420 L en una línea de producción (foto cortesía de NC Hyperbaric).

nes en los microorganismos, incluyendo alteraciones en la membrana y morfología celular, efectos sobre las proteínas (incluyendo enzimas) y efectos sobre los mecanismos genéticos de los microorganismos (4, 10). Sin embargo, a pesar de estas investigaciones, los mecanismos de la inactivación microbiana no son aún comprendidos en su totalidad. La mayoría de los autores concuerdan con que el efecto letal de las altas presiones sobre las bacterias es debido a varios procesos diferentes que ocurren simultáneamente. En concreto, el daño a la membrana celular y la inactivación de enzimas claves, incluyendo las implicadas en la replicación y transcripción del ADN, están considerados como puntos clave afectados por las altas presiones en los microorganismos (11, 12). Se han encontrado evidencias de daños físicos a la membrana celular después del tratamiento por altas presiones, bien en forma de pérdidas de ATP o de material con absorción al UV, o bien como mayor captación de colorantes fluorescentes, como el yoduro de propidio, que normalmente no penetran a través de las membranas de células sanas (14). Las células en fase estacionaria son normalmente más resistentes a la presión que las células en fase exponencial. Mañas y Mackey (15) han propuesto que las células en fase exponencial son inactivadas por las altas presiones por daños irreversibles en las membranas celulares. En cambio, las células en fase estacionaria tienen una membrana citoplásmica más robusta que puede aguantar mejor el tratamiento por presión. Esta propuesta se basa en el hecho de que tras tratamiento PAP las células en fase exponencial muestran cambios en sus membranas celulares que no son detectables en las células en fase estacionaria. Estos cambios incluyen perturbaciones físicas de la estructura de la membrana, pérdida de respuesta osmótica y liberación de ARN y proteína al medio extracelular.

Variaciones en la resistencia a la presión entre microorganismos

En términos generales, las esporas bacterianas son los tipos de microorganismos más resistentes a la presión (tabla 2). Por tanto, permanecen relativamente indiferentes a las presiones usadas para "pasteurizar" tal como son descritas en este capítulo. Por ello tienen que ser tratadas con una combinación de presión y calor, que logra la "esterilización" tal como se discute con detalle en el siguiente capítulo de Alfredo Rodríguez.

Algunos virus son también resistentes a tratamientos por presión, especialmente en alimentos, más que en medios de cultivo (tabla 3). Por ejemplo, en un medio de cultivo de tejidos, un tratamiento de 600 MPa durante 600 segundos es suficiente para conseguir reducciones superiores a 5 unidades logarítmicas en los títulos de infectividad viral, del calicivirus felino (un modelo de norovirus), superiores a 3 unidades logarítmicas en el virus de la hepatitis A y menores o iguales a 2 en polivirus (16). El virus de la hepatitis A, presente en ostras contaminadas, también es inactivado por presión. Tratamientos a 350, 375 y 400 MPa, en un intervalo de temperaturas entre 8,7 y 10,3 °C (17), produjeron reducciones superiores a 1, 2

Tabla 2. Sensibilidad a la presión de determinadas esporas bacterianas.

Organismo formador de esporas	Sustrato	Tratamiento	Inactivación (Nº de reducciones logarítmicas)	Referencia
Esporas de *C. botulinum*, tipo E (Alaska)	Tampón Fosfato Sorensen (0,067 M, pH 7,0)	827 MPa/ 50 °C/5 min	5	36
Esporas de *C. botulinum*, tipo A BS-A	Mezcla de carne de cangrejo	827 MPa/ 75 °C/15 min	3,2	37
C. sporogenes	Pechuga de pollo	680 MPa/ 80 °C/20 min	2	38
C. sporogenes *B. subtilis* *B. stearothermophilus*	Emulsión cárnica	621 MPa/ 98 °C/5 min	> 5 > 9 > 10	39

y 3 unidades logarítmicas, respectivamente. Estos resultados sugieren que los tratamientos por presión necesarios para matar patógenos bacterianos vegetativos serían también suficientes para causar una inactivación significativa de partículas de virus humanos.

El virus de la fiebre aftosa (FMDV) es también relativamente sensible a la alta presión. Un tratamiento de 250 MPa a -15 ºC durante una hora en urea 1 M destruye la infectividad del FMDV, aunque manteniendo la integridad de la cápsida. El virus tratado todavía provoca la producción de

Tabla 3. Sensibilidad a la presión de determinados virus.

Virus	Sustrato	Tratamiento	Inactivación	Referencia
Rotavirus	Medio de laboratorio	300 MPa/ 21 °C/2 min	Log 8 TCID50/ml*	40
Coxsackievirus	Medio de laboratorio	500 MPa/ 21 °C/5 min	Log 6,5 TCID50/ml	41
Enterovirus bovino	Ostras	350 MPa/ 20 °C/5 min	~Log 3 TCID50/g	42
Virus hepatitis A	Cebollas verdes	375 MPa/ 21 °C/5 min	Log 4,75 PFU/g**	43
Norovirus	Tejido de ostra	400 MPa/ 5 °C/5 min	Log 4,05 PFU/g	44

**TCID50 = Dosis infectiva para un cultivo de tejidos (50%).*
***PFU = Unidades formadoras de placas.*

anticuerpos neutralizantes en conejo. Estos resultados sugieren que la alta presión podría ser un método simple, seguro y reproducible para producir vacunas virales (18).

Generalmente las levaduras no se asocian a enfermedades causadas por alimentos. Sí son relevantes en cuanto al deterioro de los mismos por su capacidad para crecer en productos con baja actividad de agua (a_w) y su tolerancia a concentraciones relativamente altas de ácidos orgánicos usados como conservantes. Las levaduras son generalmente sensibles a la presión, aunque las ascosporas son más resistentes que las bacterias vegetativas (tabla 4). Se dispone de menos información sobre la sensibilidad a la presión de los mohos, aunque se ha demostrado que las formas vegetativas son relativamente sensibles mientras que las ascosporas son más resistentes (19). La edad de las ascosporas puede afectar a la respuesta a la presión, siendo más resistentes las ascosporas más viejas (20). El efecto de la presión sobre micotoxinas se considera limitado ya que el tratamiento tiene poco efecto sobre los enlaces covalentes. Sin embargo, en un estudio se ha descrito que la patulina, una micotoxina producida por varias especies de *Aspergillus, Penicillium* y *Byssochlamys*, es degradada por la presión (21). El contenido en patulina de un zumo de manzana bajó un 42%, 53% y 62% después de una hora de tratamiento a 300, 500 y 800 MPa respectivamente y 20 °C. No se ha presentado ninguna explicación de los resultados.

Las bacterias Gram (+), especialmente los cocos como *Staphylococcus aureus*, tienden a ser más resistentes a la presión que los bacilos Gram (-), como *Salmonella* spp (tabla 5). Sin embargo, hay excepciones a esta regla general. Por ejemplo, algunas cepas de *Escherichia coli* O157:H7 son relativamente resistentes a la presión (22).

Tabla 4. Sensibilidad a la presión de ciertas levaduras y mohos.

Virus	Sustrato	Tratamiento	Inactivación (Nº de reducciones logarítmicas)	Referencia
Saccharomyces cerevisiae	Emulsión de cerdo	300 MPa/ 20 °C/10 min	2	45
Ascosporas de *Saccharomyces cerevisiae*	Zumo de manzana pH 3,8	500 MPa/ 5 °C/1 min	~6	46
Ascosporas de *Talaromyces avellaneus*	Zumo de manzana pH 3,45	600 MPa/25 °C/60 min 600 MPa/60 °C/60 min	~3 ~6	47
Ascosporas de *Byssochlamys nivea*	Zumo de uva aw 0,97 Mermelada de arándanos aw 0,84	700 MPa/ 30 min/70 °C	4 <1	48

Tabla 5. Sensibilidad a la presión de ciertas bacterias vegetativas.

Virus	Sustrato	Tratamiento	Inactivación (Nº de reducciones logarítmicas)	Referencia
Vibrio parahaemolyticus	Ostras	300 MPa/ 10 °C/3 min	5	49
Campylobacter jejuni	Leche UHT	300 MPa/ 20 °C/10 min	~1	50
Y. enterocolitica	Queso modelo	500 MPa/ 20 °C/10 min	> 5	51
Salmonella enteritidis	Zumo de naranja pH 3,76	250 MPa/ 30 °C/10 min	5,53	52
Listeria monocytogenes	Tampón PBS pH 6,3	500 MPa/ 20 °C/10 min	> 7	23
Escherichia coli O157:H7 NCTC 12079	Leche UHT Carne de ave	600 MPa/ 20 °C/15 min	> 2 3	23

Se ha publicado poco sobre los efectos de la presión sobre los parásitos (ver tabla 6). Hay alguna evidencia de que los quistes de *Toxoplasma gondii* son relativamente sensibles a la presión. En un bioensayo en ratones se demostró que un tratamiento de 30-400 MPa, durante menos de 90 segundos fue suficiente para convertir en no-viables unos quistes de la cepa VEG de *T. gondii* en carne de cerdo picada (23).

Variaciones entre cepas dentro de una misma especie

En diferentes cepas de la misma especie puede haber variaciones significativas a la resistencia a la presión. Por ejemplo, se ha encontrado una diferencia de 3 unidades logarítmicas en la resistencia de cepas patógenas de *E. coli*, tratadas a 600 MPa, durante 15 minutos y 20 °C (24). Alpas y

Tabla 6. Inactivación por presión de determinados parásitos.

Virus	Sustrato	Tratamiento	Inactivación	Referencia
Cryptosporidium parvum	Zumo de naranja	530 MPa/ 20 °C/10 min	Inactivación > 4 unidades logarítmicas de ooquistes	53
Eimeria acervulina	DMEM conteniendo $10^{5,8}$ ooquistes	550 MPa/ 40 °C/2 min	No se detecta patogenicidad en pollos, sin presencia de ooquistes en heces	54

DMEM: medio de cultivo celular Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

colaboradores (25) también encontraron variabilidad en la resistencia a la presión de cepas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *S. aureus y E. coli* O157:H7. Sin embargo, también encontraron que el rango de diferencias a la presión dentro de una especie desciende cuando la temperatura durante el tratamiento se incrementa de 25 a 50 °C. Este hallazgo puede ser útil comercialmente, ya que la combinación de presión y calentamiento suave se podría usar para aumentar el efecto letal de los tratamientos.

Efectos de la intensidad y duración del tratamiento por presión

Presión y calor son similares en cuanto a que por debajo de un umbral no hay inactivación. El umbral varía con el microorganismo. Por encima del umbral, el efecto letal del proceso tiende a aumentar a medida que la presión se incrementa, pero no necesariamente a medida que se incrementa el tiempo. Por tanto, la representación del logaritmo del número de supervivientes frente al tiempo no siempre es lineal (es decir, no sigue una cinética de primer orden). A menudo hay un descenso en la velocidad letal y una "cola" resistente a la presión. Los estudios han demostrado que cuando esta población "cola" es aislada, crecida y de nuevo expuesta a la presión, no hay diferencia significativa entre ella y el cultivo original (26). Colas similares se encuentran también en los procesos de tratamiento por calor, pero el fenómeno parece más pronunciado con las altas presiones. Este efecto no es conocido en su totalidad. Puede ser debido a variaciones fenotípicas inherentes a la resistencia a la presión en algunas células. Las condiciones experimentales, tales como sustrato y condiciones de crecimiento, también pueden ser un factor. El fenómeno "cola" puede complicar el cálculo de los valores D y Z y se ha de tener en cuenta en los estudios de inoculación usados para optimizar las condiciones de procesado en los diferentes alimentos.

Efecto del tiempo procesado sobre la resistencia a la presión

La temperatura durante el tratamiento con presión puede tener un efecto significativo en la resistencia microbiana. En general, los tratamientos con presión llevados a cabo por debajo de los 20 °C o por encima de la temperatura de crecimiento de los microorganismos, resultan en una mayor inactivación. Por ejemplo, la inactivación por presión de *S. bareilly, V. parahaemolyticus* y *S. aureus* en buffer de fosfato sódico 2 mM, pH 7,0, es mayor a -20 °C que a 20 °C (27). La aplicación simultánea de presión (hasta 700 MPa) con temperatura media (hasta 60 °C) es más letal que sólo la presión para inactivar patógenos como *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* en leche y carne de ave (28).

Efecto del sustrato sobre la resistencia a la presión

La composición química del sustrato durante el tratamiento puede tener un efecto significativo sobre la respuesta de los microorganismos a la presión. Algunos constituyentes de los alimentos tales como proteínas, hidratos de carbono y lípidos pueden tener un efecto protector

(29). Por ejemplo, el tratamiento de *E. coli* O157:H7 bajo las mismas condiciones de 700 MPa durante 15 minutos a 20 °C, resulta en una reducción logarítmica de 6 unidades en solución salina tamponada con fosfato, de 3 unidades en carne de ave y menos de 2 unidades en leche UHT (ver figura 2). Cationes como el Ca^{2+} pueden ser baroprotectores y esto puede explicar porque muchos organismos parecen más resistentes a la presión cuando son tratados en ciertos alimentos como la leche (30). Por tanto, los datos de inactivación obtenidos usando tampones o medios de laboratorio no deberían ser extrapolados a situaciones de alimentos reales, donde puede ser necesario un tratamiento a presión más severo para conseguir el mismo nivel de inactivación.

La actividad de agua (a_w) y el pH de los alimentos pueden afectar significativamente a la inactivación de los microorganismos por la presión. Una baja actividad de agua protege a los microorganismos contra los efectos de la presión. Oxen y Knorr (31) han informado que reduciendo la a_w del medio de 0,98-1,0 hasta 0,94-0,96 mejora la supervivencia de *Rhodotorula rubra* sometida a presiones de 200-400 MPa, a 15 °C durante 15 minutos. Sin embargo, la naturaleza del soluto es importante. A la misma a_w las células son más sensibles a la presión en glicerol que en mono y disacáridos. La trealosa confiere la máxima protección (32).

La presión y el pH pueden actuar sinérgicamente para incrementar la inactivación microbiana. Linton y colaboradores (33) mostraron que el pH inicial tenía un efec-

Figura 2. Inactivación por alta presión (700 MPa / 20 °C / 15 min) de E. coli O157:H7 en varios sustratos.

to significativo sobre la velocidad de inactivación de *E. coli* O157:H7 en zumo de naranja. A menor pH, las células eran más susceptibles a la presión y las células con daños subletales menos capaces de repararlos y morían más rápidamente durante el almacenaje posterior del zumo. Este hecho puede tener valor comercial, como es el tratamiento por presión de los zumos de frutas donde los patógenos, como *E. coli* O157:H7, que pueden sobrevivir al tratamiento inicial por presión, morirían en un periodo de tiempo relativamente corto durante el almacenamiento refrigerado en un medio fuertemente ácido (34).

La PAP como un proceso de "pasteurización"

Tradicionalmente el término "pasteurización" describe un tratamiento térmico (por ejemplo 72 °C / 15 segundos). Este tratamiento origina una reducción significativa en varios patógenos relevantes para la Salud Pública. En los últimos años la definición de pasteurización ha sido ampliada para incluir otros tratamientos no térmicos. En el año 2004, el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) en EE.UU. definió la pasteurización como "cualquier proceso, tratamiento o combinación de ambos que, aplicado a un alimento, reduce los microorganismos más resistentes, relevantes para la Salud Pública, a un nivel en el que no es probable que supongan un riesgo para ésta bajo condiciones normales de distribución y almacenaje" (35). Por tanto, cuando el PAP es usado para controlar patógenos vegetativos en alimentos, éste puede ser validado como un proceso de pasteurización y puede ser considerado como un Punto Crítico de Control (PCC) dentro de un sistema de APPCC. Sin embargo, como las esporas son extremadamente resistentes a la presión, la tecnología por sí misma no puede ser usada para producir alimentos estables a temperatura ambiente. Como alternativa, una combinación de presión con calentamiento suave puede ser muy efectiva (ver capítulo siguiente).

Conclusiones

La idea de aplicar altas presiones a los alimentos como un método para mejorar la seguridad y alargar la vida comercial de alimentos no es nueva. Pero sólo en los últimos años se ha dispuesto de equipos comerciales adecuados para la industria alimentaria. Aunque el mercado es aún pequeño comparado con los alimentos procesados por calor, por ejemplo, los autoclavados, está creciendo. La alta presión es particularmente útil para productos sensibles al calor, donde tiene ventajas sobre otras tecnologías de conservación. Las bacterias vegetativas, incluyendo patógenos, levaduras y mohos y algunos virus son relativamente sensibles a la presión y su número se puede reducir significativamente usando 600 MPa o menos durante unos cuantos minutos. Sin embargo, las esporas bacterianas, como las de *Clostridium botulinum*, son extremadamente resistentes a estas presiones. Por tanto, la presión por sí sola no puede ser usada para producir alimentos estables a temperatura ambiente. No obstante, una combinación de presión y calentamiento suave puede ser útil para matar estas esporas (ver capítulo siguiente).

Bibliografía

1. Hite BH. The effect of pressure on the preservation of milk. W. Vi Agric. Exp. Sta. Bulletin. 1899; 58:15-35.

2. Hite BH, Giddings NJ, Weakley CE. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. W. Vi Agric. Exp. Sta. Bulletin. 1914; 146:1-67.

3. Oliveira AC, Gomes AMO, Lima SMB, Cortines JR, Silva JL. Effects of hydrostatic pressure on viruses. In: Michiels C. Bartlet, DH, Aersten A, editors. High pressure microbiology. Washington DC: ASM Press. 2008. p. 19-34.

4. Smelt JP, Hellemons JC, Patterson MF. Effects of high pressure on vegetative microorganisms. In: Hendrickx MEG, Knorr D, editors. Ultra high pressure treatments of foods. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2001. p. 55-76.

5. Hocking AD, Begu M, Stewart CM. Inactivation of spoilage yeasts and moulds using high pressure processing. In: Hocking AD, Samson RA, Pitt JI, Thrane U, editors. New York: Advances in food mycology. Springer US. 2006. p. 239-46.

6. Heremans K. High pressure effects on biomolecules. In: Ledward DA, Johnston DE, Earnshaw RG, Hastings APM, editors. High pressure processing of foods. Nottingham: Nottingham University press. 1995. p. 81-97.

7. Michel M, Autio K. Effects of high pressure on protein- and polysaccharide-based structure. In: Hendrickx MEG, Knorr D, editors. Ultra high pressure treatments of foods. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2001. p. 189-214.

8. Hugas M, Garriga M, Monfort JM. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. Meat Sci. 2002; 62:359-71.

9. Patterson MF, Ledward DA, Rogers N. High pressure processing. In: Brennan JG, editor. Germany: Food processing Handbook. Wiley-VCH. 2006. p. 173-200.

10. Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. Food Technol. 1989; 43:99-107.

11. Ulmer HM, Gänzle M, Vogel RF. Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarunm* TMW 1.460. App Environ Microbiol. 2000; 66:3966-73.

12. Casadei MA, Mañas P, Niven G, Needs E, Mackey BM. Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. App Environ Microbiol. 2002; 68: 5965-72.

13. Smelt JPPM, Rijke AGF, Hayhurst A. Possible mechanisms of high-pressure inactivation of microorganisms. High Pressure Research. 1994; 12:199-203.

14. Benito A, Ventoura G, Casadei M, Robinson T, Mackey B. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. App Environ Microbiol. 1999; 65:1564-9.

15. Mañas P, Mackey BM. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: Relationship with cell death. App Environ. Microbiol. 2004; 70:1545-54.

16. Grove SF, Forsyth S, Wan J, Coventry J, Cole M, Stewart CM, Lewis T, Ross T, Lee A. Inactivation of hepatitis A virus, poliovirus and a norovirus surrogate by high pressure processing. Inn Food Sci Emerg. Technol. 2008; 9:206-10.

17. Kevin R, Meade GK, Tezloff RC, Kingsley DH. High-Pressure Inactivation of Hepatitis A Virus within Oysters. App. Environ. Microbiol. 2005; 71:339-43.

18. Ishimaru D, Sá-Carvalho D, Silva JL. Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. 2004; Vaccine. 22:2.334-9.

19. Voldrich M, Dobias J, Ticha L, Cerovsky M, Kratka J. Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould Talaromyces avellaneus to the high pressure treatment in apple juice. J Food Engin. 2004; 61:541-3.

20. Chapman B, Winley E, Fong ASW, Hocking AD, Stewart CM, Buckle KA. Ascospore

inactication and germination by high pressure processing is affected by ascospore age. Inn. Food Sci Emerg Technol. 2007; 8:531-4.

21. Brüna D, Voldrich M, Marek M, Kamarád J. Effect of high pressure treatment on patulin content in apple concentrate. In: Heremans K, editor. High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology Leuven: Leuven University Press.1997; p. 335-8.

22. Patterson MF, Quinn M, Simpson R, Gilmour A. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. J Food Protect. 1995; 58:524-9.

23. Lindsay DS, Collins MV, Holliman D, Flick GJ, Dubey JP. Effects of high-pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. J Parasitol. 2006; 92:195-6.

24. Linton M, McClements JMJ, Patterson MF. Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skimmed milk using high hydrostatic pressure. Int J Food Sci and Technol. 2001; 2:99-104.

25. Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Sikes T, Dunne CP, Ray B. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of foodborne pathogens. Appl Environ Microbiol. 1999; 65:4248-51.

26. Metrick C, Hoover DG, Farkas DF. Effects of high hydrostatic pressure on heat-sensitive strains of salmonella. J Food Sci. 1989; 54:1547-64.

27. Takahashi K, Ishii H, Ishikawa H. Sterilisation of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. In: Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P, editors. High Pressure Science and Biotechnology. Paris: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. 1992. pp. 303-7.

28. Patterson MF, Kilpatrick DJ. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. J Food Protect. 1998; 61:432-6.

29. Simpson RK, Gilmour A. The effects of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate buffered saline and model food systems. J App Microbiol. 1997; 83:181-8.

30. Hauben KJA, Bernaerts K, Michiels CW. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. J App Microbiol. 1998; 85:678-84.

31. Oxen P, Knorr D. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of Rhodotorula rubra. Lebens-Wissen Technol. 1993; 26:220-3.

32. Smelt JPPM. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends Food Sci Technol. 1998; 9:152-8.

33. Linton M, McClements JMJ, Patterson MF. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of pressure-treated orange juice. J Food Prot. 1999; 62:1038-40.

34. Patterson MF. Microbiology of pressure-treated foods. J App Microbiol. 2005; 98:1400-9.

35. Anon Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurisation. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for foods. 2004.

http://www.fsis.usda.gov/ophs/nacmcf/2004/NACMCF_Pasteurization_082704.pdf

36. Reddy NR, Solomon HM, Fingerhut GA, Rhodehamel EJ, Balasubramaniam VM, Palaniappan S. Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. J Food Safety. 1999; 19:277-88.

37. Reddy NR, Solomon HM, Tetzloff RC, Rhodehamel EJ. Inactivation of *Clostridium botulinum* type A spores by high pressure processing at elevated temperatures. J Food Protect. 2003; 66:1402-7.

38. Crawford YJ, Murano EA, Olsen DG, Shenoy K. Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate Clostridium sporogenes in chicken breast. J Food Prot. 1996; 59:711-5.

39. Wilson MJ, Baker R. High temperature/ultra high pressure sterilization of foods. US Patent No: 6, 207, 215 B1. 2001.

40. Khadre MA, Yousef AE. Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure and pulsed electric field. J Food Protect. 2002; 65:1441-6.

41. Kingsley DH, Chen H, Hoover DG. Inactivation of selected picornoviruses by high hydrostatic pressure. Virus Res. 2004; 102:221-4.

42. Murchie LW, Kelly AL, Wiley M, Adair BM, Patterson M. Inactivation of a calicivirus and enterovirus in shellfish by high pressure. Inn. Food Sci Emerg Technol. 2007; 8:213-7.

43. Kingsley DH, Guan D, Hoover DG. Pressure inactivation of hepatitis A virus in strawberry puree and sliced green onions. J Food Prot. 2005; 68:1748-51.

44. Kingsley DH, Holliman DR, Calci KR, Chen H, Flick GJ. Inactiv∏ation of norovirus by high-pressure processing. App Environ Microbiol. 2007; 73:581-5.

45. Shigehisa T, Ohmori T, Saito A, Taji S, Hayashi R. Effects of high pressure on the characteristics of pork slurries and inactivation of micro-organisms associated with meat and meat products. Int J Food Microbiol. 1991; 12:207-16.

46. Zook CD, Parish ME, Braddock RJ, Balaban MO. High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juices. J Food Sci. 1999; 64:533-5.

47. Voldrich M, Dobiás J, Tichà L, Čeřousky M, Kratká J. Resistance of vegetative cells and ascospores of heat resistant mould *Talaromyces avellaneus* to the high pressure treatment in apple juice. J Food Engin. 2004; 61:541-3.

48. Butz P, Funtenberger S, Haberditzl T, Tausher B. High pressure inactivation of *Byssochlamys nivea* ascospores and other heat resistant moulds. Lebens-Wissens Technol. 1996; 29:404-10.

49. Cook D. Sensitivity of *Vibrio* species in phosphate buffered saline and in oysters to high-pressure processing. J Food Protect. 2003; 66:2276-82.

50. Martínez-Rodríguez M, Mackey BM. Factors affecting the pressure resistance of some *Campylobacter* species. Lett Appl Microbiol. 2005; 41:321-6.

51. De Lamo-Castellvi S, Capellas M, López-Pedemonte T, Hernandez-Herrero MM, Guamis B, Roig-Sagues AX. Behaviour of *Yersinia enterocolotica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. J Food Protect. 2005; 68:528-33.

52. Balasubramaniam VM, Ting EY, Stewart CM, Robbins JA. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. Innov Food Sci Emerg Technol. 2004; 5:299-306.

53. Slifko TR, Raghubeer E, Rose JB. Effect of high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity. J Food Protect. 2000; 63:1262-7.

54. Shearer AEH, Wilkins GC, Jenkins MC, Kniel KE. Effects of high hydrostatic pressure on Eimeria acervulina pathogenicity. Immunogenicity and structural integrity. Inn Food Sci Emerg Technol. 2007; 8:259-68.

Esterilización de alimentos por alta presión y aplicación del enfoque del objetivo de seguridad alimentaria (FSO) para desarrollar procesos de esterilización

Dr. Alfredo C. Rodríguez Zendejas

Introducción

Este capítulo presta especial atención a la tecnología de alta presión aplicada a la esterilización de alimentos en lo concerniente a la aplicación del FSO al desarrollo de procesos de esterilización.

El FSO es "la frecuencia máxima y/o la concentración máxima de un peligro en un alimento en el momento del consumo que provee o contribuye al nivel adecuado de protección (ALOP)" (2). El FSO se puede definir a través de la siguiente fórmula matemática:

$$H_0 + \Sigma I + \Sigma R \leq FSO$$

FSO = objetivo de seguridad alimentaria.
H_0 = nivel inicial de riesgo.
ΣI = incremento total del riesgo debido a crecimiento o contaminación.
ΣR = inactivación total (reducción del riesgo, número negativo).

FSO representa la probabilidad o riesgo de que alguien consuma un producto contaminado por un microorganismo patógeno, o por alguna toxina de origen microbiano. El FSO abarca desde el momento inicial del proceso, hasta el momento en el que el producto es consumido. Los detalles de la formula serán explicados más adelante.

En fechas relativamente recientes el FSO se ha convertido en un tópico frecuentemente discutido en las reuniones profesionales relativas a la seguridad de los alimentos; en particular, a la seguridad de los alimentos esterilizados. Hay diferentes razones que explican la popularidad del FSO. Probablemente la más significativa es que su aplicación tiene gran potencial para favorecer la innovación tecnológica en la industria alimentaria.

El FSO establece un patrón probabilístico para decidir el nivel de riesgo que se puede considerar aceptable y para juzgar la capacidad de los procesos industriales para alcanzar ese nivel de riesgo. En contraste, normas en efecto en los EUA definen precisamente las características de los procesos. Este enfoque corresponde a una situación en la que las alternativas tecnológicas son muy limitadas. Pudiera ser que el proceso óptimo difiriera de las condiciones autorizadas y en este caso la norma elimina posibilidades tecnológicas cuya aplicación podría ser ventajosa debido a resultados económicos o nutricionales, etc.

Otro tipo de norma define la pasteurización con respecto a la reducción de la población microbiana o de algún microorganismo patógeno de importancia

especial. En este caso, el riesgo no está necesariamente bien controlado porque la posibilidad de una contaminación por encima de cien mil microorganismos existe y por lo tanto existe la posibilidad de que la norma no proteja apropiadamente a la población consumidora.

El FSO puede considerarse una herramienta de gran potencial para asegurar que un proceso industrial satisfaga los requisitos de seguridad alimentaria. El FSO puede usarse para establecer un límite práctico con respecto a la seguridad de los productos alimenticios reduciendo el impacto sobre las posibilidades de innovar o mejorar los productos y procesos correspondientes.

En la mayoría de los procesos dirigidos a la producción de productos comercialmente estériles, los microorganismos capaces de inducir alteraciones microbiológicas en los productos son más resistentes a los agentes letales (como el calor húmedo, por ejemplo) que los microorganismos de interés desde el punto de vista de la seguridad de los consumidores. Así pues, en general, cuando los procesos son suficientemente severos como para garantizar la estabilidad de los productos durante su vida de anaquel, la inactivación de los microorganismos de interés sanitario como *Clostridium botulinum* puede darse por hecha.

Éste no es el caso de la esterilización comercial de productos de baja acidez (LACF) por medio de alta presión. En este último caso, a la fecha, el microorganismo más resistente que se ha encontrado en términos prácticos corresponde al *Clostridium botulinum* que representa un riesgo enorme. Por lo tanto, el margen de seguridad que existe en la mayoría de los productos esterilizados comercialmente no existe en el caso de la esterilización por alta presión. Luego, el uso de herramientas que permiten el control del riesgo resulta muy conveniente. El FSO puede fungir como un criterio de evolución para el desarrollo de procesos y productos en áreas en las que se carece del vasto archivo histórico de experiencia industrial que tiene la industria de los alimentos enlatados de baja acidez.

Por lo tanto, este capítulo trata de la aplicación del concepto del FSO a la esterilización de productos de baja acidez usando alta presión.

El uso de la esterilización por alta presión es una tecnología que promete ayudar a la industria alimentaria a generar nuevos productos y a mejorar algunos de los productos existentes en cuanto a su calidad nutricional y organoléptica. La razón principal es la celeridad con que la temperatura puede ser controlada durante el proceso de esterilización.

La presión utilizada en los procesos de esterilización por alta presión induce un cambio en la temperatura por compresión o descompresión de los materiales. Este cambio puede considerarse prácticamente instantáneo en comparación con la transferencia de calor tradicional por conducción o convección.

En su turno, la capacidad de manipular la temperatura con gran rapidez nos da la oportunidad de inactivar las esporas bacterianas hasta alcanzar el nivel necesario para obtener productos seguros.

Por lo tanto, la exploración de los aspectos teóricos y prácticos de la esterilización por alta presión se beneficia del uso del

FSO como un patrón de referencia. No se intenta en este trabajo hacer una revisión exhaustiva de la información relativa, sino hacer énfasis en la información necesaria y suficiente para resolver el problema de la esterilización comercial de productos alimenticios de baja acidez usando una combinación de alta presión y temperatura.

Finalmente, el ejemplo de la primera solicitud "aprobada" por la FDA para un alimento de baja acidez esterilizado con la ayuda de alta presión (Pressure Assisted Thermal Sterilization o PATS) nos da la esperanza de que un camino claro existe para satisfacer los requisitos técnicos y legales para la aplicación de los procesos de esterilización por alta presión. El autor fungió como líder técnico e ingeniero de proceso del equipo que logró recientemente el mencionado triunfo. La palabra "aprobada" está entre comillas porque de manera rigurosa, la FDA no aprueba los productos o procesos, sino que declara que, tras la revisión cuidadosa de los mismos, no tiene objeción. El documento llamado "Letter Of No Objection (LONO)" constituye la autorización requerida para producir legalmente este tipo de productos para consumo humano.

Una fracción importante de las referencias en el presente capítulo (1, 3, 5, 6) consiste de publicaciones relativamente antiguas. La razón es que el autor hace un intento de dar crédito a los científicos e ingenieros que hicieron las contribuciones originales.

El presente capítulo describe de manera detallada el componente o término de inactivación (Sigma R). La atención especial prestada a este término obedece a que la inactivación de las esporas bacterianas es el factor crítico para conseguir el nivel de seguridad necesario en el caso de la esterilización comercial de los alimentos de bajo pH (Low Acid Canned Foods o LACF).

Información sobre la tecnología de alta presión

La tecnología de alta presión ha tenido un desarrollo impresionante en los últimos años. En la actualidad, los alimentos pasteurizados usando alta presión forman un sector dinámico e innovador en el mercado. La disponibilidad de equipo seguro y eficiente que permite alcanzar la factibilidad técnica y económica de los procesos de pasteurización por alta presión es el factor que desencadenó este proceso de innovación y el correspondiente trabajo de investigación y desarrollo.

Este desarrollo nos trae a la situación actual, en la que las preguntas más importantes para la aplicación de la alta presión a la esterilización de productos alimenticios de baja acidez han recibido respuesta desde el punto de vista de la ingeniería de proceso.

La comprensión de los detalles científicos correspondientes probablemente seguirá evolucionando, pero el nivel actual de nuestro conocimiento nos permite desarrollar y verificar los procesos de esterilización por alta presión satisfactoriamente.

El futuro desarrollo de equipo y tecnología deberá proveer los insumos necesarios para demostrar e implementar la factibilidad técnica y económica de nuestros procesos y productos.

Fundamento bioquímico y bioenergético de la inactivación de esporas bacterianas por procesos de alta presión y temperatura

Efectos de la alta presión sobre las enzimas

Existe evidencia de que la inactivación de las esporas bacterianas por alta presión y temperatura está relacionada con la desnaturalización de enzimas localizadas en la membrana de las esporas. Estas enzimas son necesarias para que las esporas puedan germinar y producir células bacterianas vegetativas. Por lo tanto, la cinética de los cambios inducidos por alta presión y temperatura en las enzimas debe de traducirse en los cambios que ocasionan la inactivación de las esporas (8).

El efecto de la presión sobre las enzimas ha sido descrito usando termodinámica (análisis de la energía libre de Gibbs) (4).

La dinámica del efecto de la presión y temperatura combinadas rinde un comportamiento elíptico que da lugar a diferentes resultados dependiendo de la región en el plano, presión, temperatura (PT). En parte de esta, las enzimas se encuentran en su forma activa, en otra parte se encuentran en forma desnaturalizada. La desnaturalización de las enzimas puede ser reversible o irreversible.

Así pues, es importante tener presente que dependiendo de los procesos que se sigan, el resultado será diferente. En términos prácticos, el mensaje más importante es que necesitamos encontrar las condiciones que inducen la inactivación requerida de manera consistente, y no preocuparnos sobremanera del comportamiento de las esporas en otras condiciones que no corresponden al proceso que se desarrolla.

La inactivación de esporas bacterianas por alta presión y temperatura

La inactivación de las esporas bacterianas por presión y temperatura se puede estudiar a través del efecto de los procesos en la constante de velocidad de la transformación de inactivación. La constante de velocidad de los procesos químicos moleculares depende de la presión, temperatura y la presencia de catalizadores. En el caso de la esterilización por calor tradicional, los valores de la presión no tienen un efecto detectable en la constante de velocidad. Sin embargo, cuando la presión alcanza valores del orden de 600 MPa, el agua ya no se puede considerar como un fluido incompresible (sufre un cambio volumétrico del 15%) y la constante de velocidad se ve afectada visiblemente por la presión. El modelo matemático corres-

$$k = k_o \exp\left\{-\left[\frac{\Delta V^*}{RT_0}(P-P_0)+\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T}-\frac{1}{T_0}\right)\right]\right\}$$

$$N(t) = N_o \exp\left\langle -k_o \int_0^{t_f} \exp\left\{-\left[\frac{\Delta V^*}{RT_0}(P(t)-P_0)+\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T(t)}-\frac{1}{T_0}\right)\right]\right\} dt \right\rangle$$

$$\log\frac{N_o}{N} = \frac{\ln(10)}{D_0}\int_0^{t_f} \exp\left\{-\left[\frac{\Delta V^*}{RT_0}(P(t)-P_0)+\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T(t)}-\frac{1}{T_0}\right)\right]\right\} dt$$

$$F_{TPo} = \int_0^{t_f} \exp\left\{-\left[\frac{\Delta V^*}{RT_0}(P(t)-P_0)+\frac{Ea}{R}\left(\frac{1}{T(t)}-\frac{1}{T_0}\right)\right]\right\} dt$$

Fórmulas derivadas del modelo matemático para la constante de velocidad k, el número de supervivientes N y la letalidad acumulada F. Rodríguez et al, 2004.

Gráficas mostrando que el modelo matemático describe la inactivacion de las esporas bacterianas apropiadamente. Rodríguez et al, 2004.

pondiente (8) da buenos resultados siempre y cuando la activación de las esporas por presión no induzca una "joroba" en la curva de inactivación. En ese caso, el modelo matemático produce valores que describen la curva aparentemente bien, pero los valores de la energía de activación y el volumen de activación no se pueden justificar técnicamente.

La transformación de activación de las esporas bacterianas por la presión

La transformación de activación induce una joroba en la curva de inactivación y en ciertas condiciones conduce a resultados que indican que la presión aparentemente protege a las esporas en vez de dañarlas. Con el fin de contar con una descripción matemática efectiva y completa, es necesario incorporar la transformación de inactivación en el modelo correspondiente. Finalmente, es necesario combinar los efectos de la activación y la inactivación de las esporas bacterianas para poder describir la dinámica de la población de esporas durante los procesos de alta presión y temperatura (9).

Rodríguez et al, 2005.

El correspondiente modelo matemático es:

$$dN1/dt=-(kdD+kA)\,N1 \;\ldots\ldots\; 1$$

$$dN2/dt=kA\,N1-kdA\,N2 \;\ldots\; 2$$

Las ecuaciones de respuesta isotérmica/isobárica son:

$$N1[t] \rightarrow e^{-(kA+kdD)\,t}\,N10$$

$$N2[t] \rightarrow \frac{e^{-kdA\,t}\,(kA\,((-1+e^{-(kA-kdA+kdD)\,t})\,N10-N20)+(kdA-kdD)\,N20)}{-kA+kdA-kdD}$$

Modelo matemático del sistema que incluye activación e inactivación simultáneamente.

Gráfica mostrando que el modelo matemático describe apropiadamente curvas con una "joroba" inducida por la activación de las esporas.

La combinación de activación e inactivación de las esporas durante la esterilización conduce a modelos matemáticos que describen la dinámica de la población de esporas durante la esterilización. Este nivel de comprensión es muy importante para apoyar el trabajo práctico de desarrollo y verificación de los procesos esterilización.

Sin embargo, es claro que es posible obtener productos seguros sin pasar por un proceso teórico detallado. Esta alternativa corresponde al desarrollo empírico de los procesos de esterilización en contraste con el diseño de los mismos a partir del conocimiento teórico.

El desarrollo de un proceso de esterilización comercial térmica usando alta presión (Pressure Assisted Thermal Sterilization o PATS)

PATS es un proceso en el que los requisitos legales establecidos para la esterilización comercial de productos de baja acidez son satisfechos con la ayuda de la alta presión.

Figura mostrando el uso del análisis de las distribuciones (12) para establecer el tiempo de exposición requerido para garantizar una Fo mínima de tres minutos.

La presión se usa para manipular la temperatura y satisfacer los requisitos de legalidad microbiológica y térmica (Fo). Dos ventajas impresionantes son que el proceso es comparativamente muy breve, y que cuando la presión se libera, se consigue un enfriamiento del orden de aproximadamente 30 °C de manera prácticamente instantánea en toda la carga del esterilizador.

En PATS no se toma ventaja de la contribución de la presión a la letalidad del proceso. NCFST recibió una LONO de la FDA en febrero de 2009 que lo autoriza a la producción de puré de papas en bolsas flexibles para consumo humano. Este es un logro especial que esperamos abra la

Figura mostrando el análisis estadístico con los datos normalizados.

puerta a un desarrollo efectivo de procesos industriales que aprovechen las ventajas de PATS tales como muy alta calidad organoléptica y nutricional.

Vasija de alta presión (Quintus) de 35 L en operación para la realización de un ciclo de esterilización.

Figura mostrando la esterilización por medio de PATS.

Proceso de esterilización comercial por alta presión

El paso siguiente desde el punto de vista técnico-legal es el desarrollo de un proceso que tome ventaja de la contribución de la presión a la letalidad. Será necesario

Figura mostrando otro aspecto de la esterilización por medio de PATS.

generar suficiente información respecto a la seguridad de los productos y procesos como para conseguir que se permita su uso para producir alimentos para consumo humano. NCFST ha iniciado un proyecto en colaboración con varios miembros de la industria para desarrollar la tecnología necesaria para llevar a la práctica este concepto de gran potencial técnico y económico.

Bibliografía

1. Bradley RS (Ed). "High Pressure Physics and Chemistry". Volumes 1 and 2. Academic Press, London. 1963.

2. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). A Simplified Guide to Understanding, and Using Food Safety Objectives and Performance Objectives. Page ICMSF. 2006.

3. Comings EW. "High Pressure Technology". McGraw-Hill Book_Company, Inc. New York. 1956.

4. Hawley SA. "Reversible Pressure-temperature Denaturation of Chymotrypsinogen". Biochemistry. 1971; 10(13):2436-42.

5. Holzapfel WB and Isaacs N S (Eds). "High Pressure Techniques in Chemistry and Physics". Oxford University Press, Oxford. 1997.

6. Johnson FH, et al. "The Theory of Rate Processes in Biology and Medicine". John Wiley & Sons, New York. 1974.

7. Rodríguez AC, et al. Calculating Accumulated Lethality and Survivorship in EtO Sterilization Processes. Medical Device and Diagnostic Industry. 2001; 23(9):100-7.

8. Rodríguez AC, et al. "Model of the Inactivation of Bacterial Spores by Moist heat and High Pressure". J Food Sc. 2004; 69(8): E367.

9. Rodríguez AC. "High Pressure Sterilization of Pharmaceutical Products", presented at the 2005 Annual Meeting and Conference of the Parenteral Drug Association, April 5, 2005.

10. Soc for Experimental Biol. "The effects of Pressure on Organisms", Academic Press, Inc New York. 1972.

11. Zimmerman AM (Ed). "High Pressure Effects on Cellular Process". Academic Press, New York. 1970.

12. Bowman KO, Shenton LR. Moment Techniques In: D'Agostino RB and Stephens MA Eds. Goodness of Fit Techniques, Marcel Dekeer Inc, New York. 1986. pp 279-329.

13. Loehle C. Global Optimization (for Wolfram's Mathematica). Loehle Enterprises, Naperville, IL. 2006.

14. Oxborrow GS, Berube R. Sterility testing – validation of sterilization processes and sporocide testing. In: Block SS, Ed. Disinfection, sterilization and preservation. Lea and Febiger, Philadelphia. 1991. p. 1047.

15. Taylor WA. Distribution analyzer user's guide. Taylor Enterprises, Inc. Libertyville, Il. 2007.

16. Gould GW, Sale AJH. Initiation of Germination of Bacterial Spores by Hydrostatic Pressure. J General Microbiol. 1970; 60:335-46.

17. Walpole RE, Myers RH. Probability and statistics for engineers and scientists. McMillan Publishing Company, New York, 1978. p. 371.

Homogenización a altas presiones. Tecnología y aplicaciones

Dr. Buenaventura Guamis López y Dr. Tomás López Pedemonte

Introducción

La homogenización a alta presión (también llamada alta presión dinámica) es una nueva tecnología que actualmente se estudia en las áreas alimentaria y farmacéutica con la finalidad de inactivar microorganismos, enzimas y virus (*Moroni et al, 2002; Vachon et al, 2002; Diels et al, 2005; Hayes et al, 2005; Picart et al, 2006; Briñez et al, 2006*), así como fragmentar partículas en dispersiones y emulsiones (*Floury et al, 2000; Keck & Muller, 2006*). Cuando las presiones que se utilizan se encuentran en el margen comprendido entre 200 y 400 MPa se conoce como Ultra Homogenización a Alta Presión (UHPH). Varios estudios se han realizado sobre la UHPH para su aplicación en el procesado de alimentos, como leche, productos lácteos y licuados vegetales financiados por proyectos de la Unión Europea y el Plan Nacional. Esta tecnología consigue una más eficiente reducción del tamaño de partícula que la homogenización clásica, con la ventaja de reducción de la carga microbiana (*Hayes & Kelly, 2003; Thiebaud et al, 2003; Briñez et al, 2006*). La homogenización clásica, que se utiliza como proceso estándar en las industrias láctea, farmacéutica y cosmética para reducir el tamaño de partícula, opera a presiones entre 20-60 MPa. En estas industrias se utilizan homogenizadores convencionales que en algunos casos pueden llegar hasta los 100 MPa, para incrementar la estabilidad de emulsiones previniendo el cremado y la coalescencia. La homogenización clásica consiste en forzar el paso de un fluido a través de una válvula de aproximadamente 100 a 300 µm. Una de las innovaciones recientes en el diseño de homogenizadores consiste en incrementar la presión. Esto se ha conseguido principalmente debido a los avances recientes en la ciencia de los materiales. En los campos de la química, farmacia, biotecnología y alimentación se utiliza la homogenización a alta presión para la disrupción celular, la obtención de emulsiones estables, la nanoencapsulación, la dispersión y el mezclado y procesado de productos. La Ultra Homogenización a Alta Presión (UHPH) a presiones superiores a 200 MPa es motivo de intensos estudios actualmente en Estados Unidos y Europa. De momento solamente se utiliza en investigaciones y en la búsqueda de nuevos desarrollos. El incremento de los niveles de presión permite la reducción del tamaño de partícula de las emulsiones a nanómetros, dando la posibilidad de obtener micronanoemulsiones. Esto mejora la vida útil de los productos obtenidos haciéndolos estables más largo tiempo. Debido a que se produce disrupción celular y destrucción de microorganismos simultáneamente, se produce un efecto higiénico positivo cuando se tratan determinados fluidos incluyendo alimentos (*Mid-*

delberg, 1995; Pandolfe and Kinney, 1998; Floury et al, 2002; Miller, 2002; Thiebaud et al, 2003; Floury et al, 2004a). Básicamente, un ultra homogenizador consiste en un generador de alta presión y una válvula diseñada específicamente para trabajar a muy altas presiones. El fluido procesado pasa a muy alta presión a una sección donde se encuentra la válvula y sale a través del espacio que queda libre entre el cabezal y el asiento (*Paquin, 1999).* Teniendo en cuenta las publicaciones realizadas sobre homogenización convencional de leche hasta 100 MPa (*Middelberg, 1995; Pandolfe, 1999; Miller, 2002)*, y teniendo en cuenta los procesos físicos responsables de la disrupción de glóbulos grasos y de microorganismos en los homogenizadores clásicos de alta presión (APV-Gaulin, Rannie), en los diseños clásicos de válvulas el fluido es alimentado de manera axial en el asiento y después acelerado radialmente a una pequeña zona situada entre el asiento y el cabezal. Después el fluido sale de la válvula por un resquicio (10-30 µm) y choca de manera axial con un anillo de impacto antes de llegar de nuevo a presión baja (*Kleinig and Middelberg, 1997*). Stansted Fluid Power, empresa fabricante de equipos de UHPH ha modificado esta configuración alcanzando presiones de hasta 400 MPa, desde el año 2006. Las válvulas diseñadas por esta empresa son de material cerámico. La geometría de estas válvulas ha sido modificada comparada con las válvulas clásicas (APV-Gaulin). El fluido es alimentado axialmente a lo largo de la parte móvil y después acelerado radialmente entre la parte del asiento y el cabezal. El tamaño de la ranura por donde pasa el fluido es entre 2,5 y 2,0 µm y la

velocidad resultante depende de la presión conseguida entre la válvula y el mecanismo de contrapresión, el cual permite su ajuste. La presión conseguida en el fluido es la presión de homogenización (*Floury et al, 2004a and 2004b)*. La UHPH puede ser utilizada para obtener emulsiones muy finas, conseguir la disrupción de cultivos microbianos densos, obtener metabolitos celulares, inactivar bacteriófagos y modificar propiedades funcionales de hidrocoloides (*Middelberg, 1995; Bury et al, 2001; Floury et al, 2002; Geciova et al, 2002; Hayes et al, 2005*). En aplicaciones en alimentos se utiliza para incrementar la estabilidad y las propiedades físico-químicas de licuados vegetales, incrementar el rendimiento y mejorar las propiedades reológicas y de coagulación de la leche, así como reducir la carga microbiana y controlar la agregación de las proteínas séricas (*Cruz et al, 2007; Serra et al, 2006; López-Pedemonte et al, 2006; Picart et al, 2006; Gràcia et al, 2007*).

Inactivación de microorganismos

Cuando se aplica la UHPH a un fluido que contiene microorganismos algunos de

estos son inactivados durante la etapa de compresión, pero la mayoría son destruidos por el proceso completo. Al pasar el fluido a través del espacio estrecho de la válvula de alta presión, la descompresión repentina, torsión y fuerzas de estrés, turbulencia, impacto, fenómenos de cavitación, ondas de choque y el incremento de temperatura, actúan sobre las bacterias (*Middelberg, 1995; Thiebaud et al, 2003; Diels et al, 2005a*). La inactivación se ve afectada por: la composición de la pared celular de las bacterias (*Middelberg, 1995; Geciova et al, 2002; Wuytack et al, 2002)*; forma del microorganismo (*Saboya et al, 2003; Moroni et al, 2002*); temperatura de entrada (*Vachon et al, 2002; Briñez et al, 2006a and 2006b; Diels et al, 2004*); nivel de presión y número de pases (*Moroni et al, 2002; Vachon et al, 2002; Wuytack et al, 2002; Thiebaud et al, 2003; Diels et al, 2005a; Picart et al, 2006*); viscosidad del fluido (*Floury et al, 2004b; Diels et al, 2004*); carga inicial (*Vachon et al, 2002; Moroni et al, 2002; Diels et al, 2005b*); sustrato y actividad del agua (*Diels et al, 2005a; Vachon et al, 2002; Briñez et al 2006a and 2006c*); presencia de inhibidores (*Vanini et al, 2004; Lucci et al, 2006; Diels et al, 2005b*). Los valores típicos de inactivación de las bacterias patógenas son aproximadamente de 3-4 log CFU/mL para tratamientos de 300 MPa y es posible alcanzar niveles de 9 log CFU/mL para bacterias menos resistentes (*Wuytack et al, 2002; Diels et al, 2003/2004; Briñez et al, 2006a, c and 2007*). Finalmente, hay poca información disponible sobre la presencia de daños subletales en microorganismos tratados por UHPH o inactivación de esporas. Estos temas deberán ser explorados con detalle.

Se espera que las esporas sean altamente resistentes a los tratamientos UHPH. Reducciones de aproximadamente 0,5 ciclos logarítmicos de *Bacillus licheniformis* (Tª 50 ºC, 200 MPa, Microfluidizer) fueron reportados por *Feijoo et al (1997).*

Tratamientos UHPH de la leche

De acuerdo con *Picart et al (2006),* para una temperatura de entrada (Tin) de 24 ºC y un tratamiento de 100 MPa, la distribución de tamaños de los glóbulos grasos cambia de un sistema dimodal (3,31 µm el tamaño de pico principal hasta alrededor de 1 µm para leche cruda) a un sistema multimodal (0,63 y 0,16 µm los picos principales). Los tratamientos UHPH inducen a un progresivo descenso del tamaño a 200 y 250 MPa. El aumento de la presión hasta 300 MPa causa un incremento del pico de 0,16 µm a expensas del de 0,63 µm. El diámetro de los glóbulos grasos < 0,36 µm representan el 78% y el 93% del volumen total a 200 y a 300 MPa, respectivamente. También confirmó la presencia de glóbulos grasos muy pequeños de 40-60 nm. No fueron observados agregados grasos en esas experiencias. La aplicación de 200 MPa varios pases seguidos disminuyó el diámetro medio y también redujo la distribución de tamaños. Conclusiones similares fueron reportadas por *Hayes and Kelly (2003a)* y *Hayes et al (2005)*. El uso de una segunda etapa (10% de presión de la 1.ª etapa) podría evitar la recoalescencia de los glóbulos grasos rotos que no se han cubierto de proteínas (*Hayes and Kelly, 2003a*).

La temperatura de entrada de la leche tiene un efecto significativo en la reduc-

ción del tamaño de glóbulo. Esto fue descrito por *Thiebaud et al (2003)* y *Hayes and Kelly (2003)* y confirmado por *Datta et al (2005)* que establecieron que la temperatura de entrada de la leche es determinante en el tamaño de glóbulo resultante.

La leche desnatada sometida a una homogenización convencional de dos etapas (Tin 50 ºC, APV 1.000, APV homogenisers AS, Albertslund, Denmark) y a un tratamiento de alta presión homogenización a presiones ≤ 150 MPa (5-7 ºC Tin, 'nm-GEN' 7.400H, Stansted Fluid Power, Essex, UK) no presentó cambios en el tamaño de la micela de caseína, pero hubo una reducción del 5% a presiones por encima de 150 MPa (entre 180,75 nm y 170,65 nm) (*Hayes and Kelly, 2003a). Sandra and Dalgleish (2005)* describieron que no hubo cambios significativos en el tamaño de las micelas de caseína como resultado de un tratamiento con una etapa a 41 MPa (Tin 25 ºC, Emulsiflex C-5, Avestin, Canadá), pero incrementando la presión a 186 MPa disminuía significativamente el tamaño. También obtuvieron el mismo efecto pasando la muestra varias veces en las mismas condiciones. De acuerdo con los autores, en la UHPH hasta 200 MPa parece que se afecta parcialmente la superficie de las caseínas κ y α_{s1}, pero no se rompen completamente las micelas (al contrario de los tratamientos por altas presiones hidrostáticas, HHP).

El efecto sobre las proteínas séricas está sujeto a algunas controversias. *Hayes and Kelly (2003a)*, no obtuvieron desnaturalización significativa en proteínas séricas sometidas a tratamientos UHPH de una o dos etapas (Tin 5-7 ºC, a presiones hasta 225 MPa). Cuando la temperatura de entrada (Tin) alcanza hasta 45 ºC se puede observar la desnaturalización de las proteínas séricas, siendo más extensiva la desnaturalización de la β-lactoglobulina que la de α-lactalbúmina. Comparando con los valores publicados, la desnaturalización por UHPH parece ser mayor que la causada por los tratamientos térmicos (*Hayes et al, 2005*). *Datta et al (2005)* confirmaron estos resultados y probaron que para temperaturas de salida ≤ 65 ºC no se observó la desnaturalización de la β-lactoglobulina. La α-lactalbumina no fue desnaturalizada en ninguna muestra. Dispersiones de aislado de proteína sérica conteniendo 6% o 10% (w/w) de proteína a pH 6,5 fueron procesadas utilizando un equipo de UHPH de 15 L/h con enfriamiento inmediato de la muestra (*Gràcia-Julia et al, 2007*). El tratamiento de UHPH no induce la agregación de proteínas por debajo de 225 MPa. La técnica de espectroscopia de correlación fotónica (PCS) reveló una agregación de proteínas a 250-300 MPa para ambas dispersiones. La técnica PCS (en frecuencia de número de partículas) indicó una población de agregados a 7, 26 y 50 nm, a 250, 275 y 300 MPa, respectivamente, con el 6% de proteína, mientras que se observó una distribución monomodal de 26 nm a las mismas presiones anteriores y 10% proteína, resultando una agregación controlada sin gelificación. El efecto de las fuerzas mecánicas predomina sobre el efecto del calentamiento de tiempo extremadamente corto.

La actividad de la lactoperoxidasa disminuye por los tratamientos de UHPH (después de tratamientos de 135, 180 y 225 MPa), sobre leche cruda quedan actividades desde 91, 34 hasta 0% (*Hayes et al,*

2005). *Datta et al (2005)* demostraron que la UHPH produce mayor inactivación que diversos tratamientos térmicos. La actividad de la plasmina decreció en muestras tratadas a ≥ 135 MPa. Sin embargo, leche tratada con UHPH retuvo una parte de su actividad a temperaturas de entrada (Tin 5-7 °C). *Hayes and Kelly (2003b*) y *Picart et al (2006)* observaron un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina para Tin 4 °C y 200-250 MPa. Esto corresponde a una temperatura máxima de 58 °C después de la válvula de alta presión, que puede ayudar a establecer enlaces entre la enzima y la membrana del glóbulo graso o modificar la estructura de la enzima haciendo lugares activos más accesibles para el sustrato. Por encima de 200 MPa, la inactivación del 6% se debe más a fuerzas mecánicas que a efectos térmicos. La mayor actividad lipásica fue observada en muestras de leche tratadas por UHPH (240% de actividad lipásica en leche cruda para temperaturas de salida de aproximadamente 57 °C). El tratamiento UHPH produce la completa inactivación de la lipasa cuando la temperatura de salida es mayor que 71 °C (*Datta et al, 2005*). Posteriores estudios están enfocados en evitar la lipolisis en muestras lácteas.

El efecto en las propiedades de coagulación de la renina fue publicado por *Hayes and Kelly (2003a)*: tiempo de coagulación, máxima firmeza de la cuajada y firmeza del gel después de 40 minutos de la coagulación fueron estudiados a temperaturas de entrada de 5-7 °C, y presiones hasta 225 MPa. En general los valores disminuyen o aumentan respectivamente después del tratamiento UHPH con simple o doble etapa (10% de presión de la primera etapa). Más recientemente, *Zamora et al (2006)* llegan a la conclusión de que los tratamientos con una etapa a 200 y 300 MPa mejoran las propiedades de coagulación de la leche (tiempos de coagulación con renina menores o iguales a las leches cruda o pasteurizada-homogenizada incrementando el rango de firmeza de la cuajada y de la firmeza después de 30 minutos comparada con la leche cruda). El rendimiento y el contenido en humedad de las cuajadas obtenidas con leches tratadas UHPH fueron mayores que los de la leche cruda, homogenizada-pasteurizada o pasteurizada simplemente. El contenido en suero de α-$_{la}$ y β-$_{lg}$ disminuye considerablemente con respecto a la leche cruda, pasteurizada o homogenizada-pasteurizada. Este incremento de la presencia de proteínas séricas en las cuajadas puede explicar el alto contenido de humedad de las cuajadas obtenidas.

El efecto de la UHPH sobre la coagulación ácida de la leche fue estudiado por *Serra et al (2007)* para su posible utilización en la elaboración del yogur, comparado con el proceso utilizado habitualmente en la industria. Leche a diferentes temperaturas de entrada (30 °C ó 40 °C) fue sometida a tratamientos a 100, 200 ó 300 MPa (una etapa) y 130, 230 ó 330 MPa (dos etapas). La leche tratada a 300 ó 200 MPa presentaron geles más fuertes en la coagulación, mayores firmezas de gel en los análisis de textura, menos sinéresis y menor acidez tritable, comparadas con la leche enriquecida con el 3% de leche desnatada y sometida a proceso convencional.

Estudios sobre inactivación microbiana fueron publicados por *Thiebaud et al*

(2003). Los autores trataron leche bovina entera procedente de una granja local a una temperatura de entrada de 4, 14 y 24 °C (FPG7400 H, Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). Los tratamientos UHPH a presiones de 200 MPa a temperaturas de entrada de 24 °C produjeron reducciones similares a las obtenidas pasteurizando a 30 min y 63 °C) y consiguieron reducciones de al menos 3 ciclos-log aplicando 300 MPa. Sin embargo, se observó un cambio en la distribución de poblaciones con respecto a la leche cruda. Las muestras tratadas a 200 MPa presentaron una población halotolerante mayor y una población psicrotrófica menor. Las leches tratadas a 300 MPa presentaron una población bacteriana halotolerante y termoresistente. *Picart et al (2006)* obtuvieron similares niveles de inactivación para los recuentos de bacterias totales. *Pereda et al (2006)* también obtuvieron aproximadamente una reducción de 3 ó 4 ciclos sobre los recuentos de bacterias totales para temperaturas de entrada de 30 y 40 °C, respectivamente, los recuentos de psicrotrofos y *Lactococcus* presentaron reducciones similares. Los coliformes, *Lactobacilli y Enterococci* fueron completamente destruidos por los tratamientos de UHPH. La leche UHPH obtenida y sin envasado aséptico obtuvo una vida útil en refrigeración de 18 días.

Efecto de la UHPH sobre los zumos de frutas

Los zumos de frutas y vegetales en general han sido reconocidos como causa de nuevas enfermedades emergentes. Los factores que han contribuido se deben a que son productos primarios agrícolas sin tratar, que pueden ser contaminados por animales o desechos humanos y consumidos sin haber sido procesados para destruir los patógenos asociados. Las altas temperaturas de pasteurización impactan negativamente en la calidad nutricional y sabor de los zumos. El consumidor demanda cada vez más alta calidad, productos libres de aditivos, mínimamente procesados, nutritivos y similares a los frescos. En estudios previos utilizando equipamiento poco desarrollado, se han obtenido resultados prometedores, tales como inactivación microbiana y enzimática y estabilidad en los productos. Pero esos estudios son incompletos y no profundizan lo suficiente. En ellos no se ha evaluado ningún cambio nutricional ni organoléptico. El potencial de la UHPH como alternativa a la pasteurización por el calor para la destrucción de patógenos en alimentos ha sido demostrado en tratamientos sobre la leche (*Kheadr et al, 2002; Vachon et al, 2002; Briñez et al, 2006a and 2006b*). También se han conseguido reducciones importantes sobre E. coli O157:H7 y *L. innocua* inoculados en zumo de naranja.

Efectos sobre licuados vegetales

En tratamientos por UHPH a 200 y 300 MPa se han conseguido reducciones de recuentos iniciales, esporas y enterobacterias. Los análisis de tamaño de partícula evidencian la intensa reducción de tamaño causada por el tratamiento UHPH, también se ha detectado la formación de agregados a 300 MPa. Mediante técnicas de calorimetría diferencial se ha demostrado que las proteínas de soja son par-

cialmente desnaturalizadas a 200 MPa, mientras que tratamientos a 300 MPa presentan los mismos niveles de desnaturalización que los obtenidos en el licuado de soja UHT (*Cruz et al, 2007*).

UHPH y las formulaciones líquidas basadas en leche, zumos de frutas y licuados vegetales

Preparados a base de bebidas líquidas son destinados habitualmente para el consumo de enfermos o personas ancianas con dificultades de deglución. Cada dosis de 200 cc provee la energía necesaria de una comida y son habitualmente presentadas como productos en polvo o líquidos UHT envasados en envases asépticos. El procesado por UHPH podría pues reducir aditivos consiguiendo la estabilidad del producto sin cambiar el valor nutritivo, permitiendo su distribución.

Preparación de nanoemulsiones mediante UHPH

La incorporación de componentes bioactivos (también componentes nutracéuticos) tales como vitaminas, péptidos bioactivos, antioxidantes, prebióticos, agentes anti-microbianos, agentes aromáticos, dentro de las matrices de los alimentos, es una vía para el desarrollo de nuevos alimentos con beneficios nutricionales o funcionales. Las proteínas tienen propiedades únicas que les permiten formar geles y emulsiones (las propiedades tecnofuncionales de las proteínas han sido bien establecidas en los últimos 15 años) (*Dickinson, 2003; Walstra, 2003*). También son importantes por ser un material ideal para encapsular componentes bioactivos actuando como sistemas de protección y liberación (*Chen, 2006*).

Las emulsiones se definen como sistemas donde al menos dos fluidos inmiscibles próximos están dispersos uno en otro en forma de gotas (fase dispersa) sobre una fase continua. Para ser termodinámicamente estables, estos sistemas necesitan la presencia de un surfactante (o emulgente) para disminuir la tensión interfasial en la interfase aceite en agua (O/W). (*Walstra, 2003; Mc Clements, 2004*). Numerosos alimentos y cosméticos son sistemas emulsionados (desde la leche, salsas, aliños hasta lociones y cremas de belleza). Moléculas tensoactivas pueden ser macromoléculas, como proteínas que se encuentran en algunos alimentos naturales o procesados, o muchas otras moléculas de menor peso molecular que se añaden a alimentos o cosméticos como fosfolípidos, mono/diglicéridos, polisorbatos y sorbitan (Tween®, Span®), etc. La habilidad de las proteínas para interaccionar con las interfases es consecuencia de su carácter anfifílico, flexibilidad y habilidad de absorber, enlazar y desenlazar con la interfase O/W para formar capas viscoelásticas, reduciendo la energía libre del sistema y la tensión interfasial (*Dickinson & McClements, 1996; Damodaran, 1997*). En la interfase O/W, las proteínas permiten la formación de un film viscoelástico que protege las gotitas en contra de la coalescencia, limitando la difusión de los componentes encapsulados, y de posibles fenómenos de oxidación. Esto es útil para la estabilización de las emulsiones alimentarias. En el caso de las emulsiones cosméticas puede ser utilizado para estabilizarlas y desarrollar viscosidades y texturas interesantes.

Las proteínas también podrían mejorar sus características hipoalergénicas. El cizallamiento para inducir la formación de emulsiones puede ser producido por la utilización de rotores-estatores, alta presión, membranas o ultrasonidos (*Schubert et al, 2003; Schultz et al, 2004*). Es posible distinguir entre procesos continuos y discontinuos, en los que diferentes mecanismos de ruptura son responsables de provocar la disrupción de las gotas (*Shultz et al, 2004*). Los homogenizadores de alta presión son particularmente útiles para la producción continua de emulsiones dispersas muy finas y tienen un interés particular en los campos farmacéutico, cosmético y alimentario (*Mehnert & Mäder, 2001; Keck & Müller, 2005; Sanguansri & Augustin, 2006*).

Bibliografía

Ananta E, Heinz V, Knorr D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. Food Microbiol. 2004; 21:567-77.

Ananta E, Heinz V, Schlüter O, Knorr D. Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. Innovative Food Sci Emerg Technol. 2001; 2:261-72.

Anonymous. EU Council directive 92/46/EEC of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of milk, heat treated milk and milk based products. 1992.

AOAC. Official methods of analysis 15th ed. Arlington: AOAC. 1990; pp. 840-50.

Augustin MA. The role of encapsulation in the development of functional dairy foods. Australian Journal of Dairy Science and Technology. 2003; 58:156-60.

Barbosa-Canovas GV, Góngora-Nieto MM, Pothakamury UR, Swanson BG. Non-thermal preservation of foods. Marcel Dekker, New York. 1998.

Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernández Herrero MM, Guamis López B. Inactivation by ultrahigh pressure homogenization of *Escherichia coli* strains inoculated into orange juice. J Food Prot. 2006b; 69(5):984-9.

Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernández Herrero MM, Guamis López B. Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenisation at inlet temperatures of 6 and 20 °C. 2007.

Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernández Herrero MM, Guamis López B. Inactivation of Listeria innocua in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. J Food Prot. 2006b; 69(1):86-92.

Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernández Herrero MM, Guamis López B. Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultra high-pressure homogenisation. Lait. 2006c; 86:241-9.

Butz P, Fernández A, Fister H, Tauscher B. Influence of high hydrostatic pressure on. 1997.

Butz P, Ludwig H. Pressure inactivation of yeasts and molds. Pharmazeutische industrie. 1991; 53(6):584-6.Butz P, Fernández García A, Lindauer R, Dieterich S, Bognar A, Tauscher B. Influence of high pressure processing on fruit and vegetable products. Journal of Food Engineering. 2003; 56:233-6.

Butz P, Tauscher B. Emerging technologies: chemical aspects. Food Research International. 2002; 35:279-84.

Chau CF, Wu SH, Yen GC. The development of regulations for food nanotechnology. Trends Food Sci Technol. 2007; 18:269-80.

Chen L, Hévrad G, Denis S, Beyssac E, Alric M, Subirade M. Proceedings de ICEF10 Congress, Viña del Mar, Chile, 20-24 abril. 2008.

Chen L, Remondetto GE, Subirade M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. Trends Food Sci Technol 2006;17:272-83.

Chen XG, Lee CM, Park HJ. O/W emulsification for the self-aggregation and nanoparticle formation of linoleic acid modified chitosan in aqueous system. Journal of Agricult. Food Chem. 2003; 51:3.135-9.

Datta N, Hayes MG, Deeth HC, Kelly AL. 2005. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. J Dairy Res. 72:1-7.

Diels AMJ, Callewaert L, Wuytack EY, Masschalck B, Michiels CW. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. Int J Food Microbiol. 2005a; 101(3):281-91.

Diels AMJ, Callewaert L, Wuytack EY, Masschalck B, Michiels CW. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. Biotechnol Prog. 2004; 20:1512-7.

Diels AMJ, De Taeye J, Michiels CW. Sensitisation of Escherichia coli to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenisation. Int J Food Microbiol. 2005b; 105:165-75.

Diels AMJ, Wuytack EY, Michiels CW. Modelling inactivation of Staphylococcus aureus and Yersinia enterocolitica by high-pressure homogenisation at different temperatures. Int J Food Microbiol. 2003; 87:55-62.

Dumay E, Picart L, Regnault S, Thiebaud M. High pressure-low temperature processing of food proteins. Biochim Biophys Acta. 2006; 1764:599-618.

FAO/WHO. Code of principles concerning milk and milk products. International standard and standard methods of sampling and analysis for milk products, 7th Edition, FAO, CAC/M-1, 1973. Rome.

Floury J, Bellettre J, Legrand J, Desrumaux A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A. Study of the flow pattern. Chemical Engineering Science. 2004a; 59:843-53.

Floury J, Desrumaux A, Axelos MAV, Legrand J. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenization. Food Hydrocolloids. 2002; 16:47-53.

Floury J, Desrumaux A, Axelos MAV, Legrand J. Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. J Food Eng. 2003; 58:227-38.

Floury J, Legrand J, Desrumaux A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. Study of droplet break-up and recoalescence phenomena. Chemical Engineering Science. 2004b; 59:1285-94.

Freitas C, Müller RH. Spray-drying of solid lipid nanoparticles SLN(™). Eur J Pharm Biopharm. 1998; 46:145-51.

Gracia-Julia A, René M, Cortés-Muñoz M, Picart L, López-Pedemonte T, Chevalier D, Dumay E. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. Food Hydrocolloids, in press. 2008.

Guerzoni ME, Vannini L, Chaves López C, Panciotti R, Suzzi G, Gianotti A. Effect of high pressare homogeneization on microbial and chimico-physical characteristics of goat cheses. J Dairy Sci. 1999; 82:851-62.

Hayes MG, Fox PF, Kelly AL. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of milk. J Dairy Res. 2005; 71:1-9.

Hayes MG, Kelly AL. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. J Dairy Res. 2003b; 70:307-13.

Hayes MG, Kelly A. High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. J Dairy Res. 2003a; 70:297-305.

Hinrichs J, Rademacher B. High pressure thermal denaturation kinetics of whey proteins. J Dairy Res. 2004; 71(4):480-8.

Horn D, Rieger J. Organic nanoparticles in the aqueous phase-theory, experiment, and use. Angew Chem Int Ed. 2001; 40:4330-61.

Keck C, Muller R. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2006; 62:3-16.

Kheadr EE, Vachona JF, Paquina P, Fliss I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. Int Dairy J. 2002; 12:435-46.

Kleinig AR, Middelberg APJ. On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenisation. Chem Eng Sci. 1997; 53(5):891-8.

Koutchma T, Guo B, Patazca E, Parisi. High pressure-high temperature sterilization: From kinetic analysis to process verification, J Food Process Eng. 2005; 28(6):610-29.

Lado BH, Yousef AE. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. Microbes and Infection. 2002; 4:433-40.

Lanciotti R, Vaninni L, Patrignani F, Lucci L, Valicelli M, Ndagijimana M, Guerzoni ME. Effect of high pressure homogenization of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese. J Dairy Res. 2006; 73:216-26.

Lanciotti R, Vannini L, Pittia P, Guerzoni ME. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yogurt. Food Microbiol. 2004; 21:753-60.

Middelberg APJ. Process-scale disruption of microorganisms. Biotechnology Advances. 1995; 13:491-551.

Miller J, Rogowski M, Kelly W. Using a CFD model to understand the fluid dynamics promoting *E. coli* breakage in a high-pressure homogeniser. Biotechnol Prog. 2002; 18:1060-7.

Moroni O, Ean J, Autret J, Fliss I. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. Int Dairy J. 2002; 12:907-13.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Requisite Scientific Parameters for Establishing the Equivalence of Alternative Methods of Pasteurization. J Food Prot. 2006; 69(5):1190-216.

Pandolfe WD. Homogenisers. In: Franci FJ (Ed). Encyclopedia of Food Science and Technology, 2nd Edition. Wiley, New York. 1999; pp. 1289-94.

Pandolfe WD, Kinney RR. High-pressure homogenization: latest technology expand performance and product possibilities. Chemical Processing. 1998; 61(3):39-43.

Paquin P. Technological properties of high pressure homogenizers: The effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. International Dairy Journal. 1999; 9(3-6):329-35.

Paquin P, Giasson J. Microfluidisation as an homogenization process for cream liqueur. Lait. 1989; 69:491-8.

Pereda J, Ferragut V, Quevedo JM, Guamis B, Trujillo AJ. Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. J Dairy Sci. 2006; 90:1081-93.

Perrier-Cornet JM, Marie P, Gervais P. Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilised oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenisation. J Food Eng. 2005; 66:211-7.

Picart L. New food preservation processing: pulsed electric fields, high pressure treatments combined with low temperatures, high pressure homogenization. Characterisation of operational conditions and microbial inactivation. PhD Thesis, Université de Montpellier II, Montpellier, France. 2004.

Picart L, Thiebaud M, René M, Guiraud JP, Cheftel JC, Dumay E. Effects of high pressure homogenization of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. J Dairy Res. 2006; 73:1-10.

Popper L, Knorr D. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. Food Technol. 1990; 44:84-9.

Pressures of 500 MPa damaged starter cells and prevented its recovery during storage at 8 °C. On the contrary, 400 MPa applied at 5 °C resulted in a more friendly HHP treatment, especially for the first 15 days of storage.

Sandra S, Dalgleish DG. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. Int Dairy J. 2005; 15(11):1095-104.

Sanguansri P, Augustin MA. Nanoscale materials development-a food industry perspective. Trends Food Sci Technol. 2006; 17:547-56.

Simón E. Proceedings de ICEF10 Congress, Viña del Mar, Chile, 20-24 Abril. 2008.

Simpson RK, Gilmour A. The resistance of Listeria monocytogenes to high hydrostatic pressure in foods. Food Microbiol. 1997; 14:567-73.

Smelt JPPM. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. Trends Food Sci Technol. 1998; 9:152-8.

Smelt JPPM, Hellemons JC, Wouters PC, Van Gerwen SJC. Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. Int J Food Microbiol. 2002; 78:57-77.

Smelt JPPM, Rijke AGF, Hayhurst A. Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. High Pressure Res. 1994; 12:199-203.

Szabo RA, Speirs JI, Akhtar M. Cell culture detection and conditions for production of a Bacillus cereus heat-stable toxin. J Food Prot. 1991; 54(4):272-6.

Thiebaud M, Dumay E, Picart L, Guiraud JP, Cheftel JC. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. Int Dairy J. 2003; 13:427-39.

Vachon J F, Kheadr EE, Giasson J, Paquin P, Fliss I. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. J Food Prot. 2002; 65(2):345-52.

Wuytack EY, Diels AMJ, Michiels ChW. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. Int J Food Microbiol. 2002; 77:205-12.

Zamora A, Ferragut V, Jaramillo PD, Guamis B, Trujillo AJ. Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. J Dairy Sci., in press. 2006.

Aplicaciones de los pulsos eléctricos de alto voltaje en la industria alimentaria

Dr. Ignacio Álvarez Lanzarote y Dr. Javier Raso Pueyo

Introducción

Los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) son una nueva tecnología de procesado de los alimentos que consiste en la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad y corta duración (μs) a un material colocado entre dos electrodos (1). Estos tratamientos provocan la permeabilización de las células tanto eucariotas como procariotas sin apenas aumentar la temperatura del medio. Los efectos de los PEAV han sido estudiados en profundidad debido a las numerosas aplicaciones de esta tecnología en distintas áreas como la biología celular, la biotecnología, la medicina y más recientemente en la tecnología de los alimentos (2-5). Las dos principales aplicaciones en esta última área son la inactivación microbiana a temperaturas que no afectan a las propiedades de los alimentos y la mejora de la transferencia de masa a través de las membranas celulares.

Mecanismo de acción

Es bien conocido que los tratamientos mediante PEAV provocan la permeabilización de las membranas; sin embargo, su mecanismo de acción todavía no se conoce con precisión. Por el momento no se ha determinado cuál es la causa última por la que los campos eléctricos de alto voltaje provocan el fenómeno de electroporación que consiste en la aparición de poros en las membranas celulares.

Se han propuesto varias teorías (2, 6, 7) a partir de estudios realizados en sistemas modelo o en células eucariotas para intentar explicar el mecanismo de la electroporación. Una de las teorías más aceptadas es la llamada "teoría de la inestabilidad electromecánica" (2). Esta teoría asume que la membrana celular se comporta como un condensador en cuyo interior existe un material con una constante dieléctrica baja en comparación con la constante dieléctrica del interior de las células y la del medio en el que se encuentran suspendidas. En estas condiciones, se produce un acúmulo de cargas a ambos lados de la misma que genera una diferencia de potencial de alrededor de 10 mV. Al aplicar un campo eléctrico externo, el número de cargas a ambos lados de la membrana aumenta y, por lo tanto, también lo hace el potencial transmembrana. La magnitud de este incremento está relacionada con la intensidad del campo eléctrico aplicado, el diámetro de las células e incluso la orientación de las células respecto a las líneas de fuerza del campo eléctrico aplicado (8). El incremento de las cargas de diferente signo a ambos lados de la membrana provoca que aparezcan unas fuerzas de atracción electrostáticas que comprimen la membrana (figura 1a). Cuando el potencial transmembrana generado por el campo eléctrico aplicado

supera el valor de 1 voltio, la compresión de la membrana es tan intensa que provoca la formación de poros (figura 1b). El número y tamaño de los poros formados depende de la intensidad del campo eléctrico y del tiempo de tratamiento. Al valor umbral del campo eléctrico al que comienza a permeabilizarse la membrana se le denomina campo eléctrico crítico (Ec). Este campo eléctrico depende del radio de la célula y de su forma (9). Cuando el campo eléctrico aplicado se encuentra alrededor del campo eléctrico crítico o el tiempo de tratamiento es muy corto, el número y tamaño de los poros formados es pequeño. En estas condiciones, la permeabilización de la membrana es reversible de modo que, cuando cesa el campo eléctrico, la membrana celular vuelve a su estado normal (10). El tiempo de cerrado de los poros puede oscilar desde algunos segundos a minutos en células vivas. Por ejemplo, en el caso de *S. cerevisiae* se han establecido tiempos de alrededor de 5 minutos (11). Sin embargo, cuando se trabaja con sistemas modelo de membranas los tiempos de cerrado son más prolongados y oscilan desde los 30 minutos hasta varias horas (12, 13). Cuando se aplican campos eléctricos superiores a la intensidad del campo eléctrico crítica o tiempos de tratamiento más largos, aumenta el número y tamaño de los poros, lo que provoca una permeabilización irreversible de la membrana o incluso su ruptura mecánica (figura 1c). Esta teoría explica la formación de poros en la membrana celular de células eucariotas, donde la única membrana existente es la membrana citoplasmática.

A pesar de no estar totalmente dilucidado el mecanismo de acción de los PEAV, lo que está demostrado es que su aplicación puede provocar poros reversibles o irreversibles en las membranas. La permeabilización reversible se está utilizando en el campo de la biotecnología o de la ingeniería genética, siendo una herramienta de mucha utilidad para permeabilizar las

Figura 1. Mecanismo de inactivación celular por PEAV (Zimmermann, 1986). "E": intensidad del campo eléctrico. "Ec_c": intensidad del campo eléctrico crítica.

células y así introducir en su interior diversas sustancias como proteínas, ADN, etc. o facilitar la fusión celular (electrofusión) (7). Sin embargo, las aplicaciones de esta tecnología en la industria alimentaria tanto para inactivar microorganismos como para mejorar la transferencia de masa a través de las membranas están basadas en la permeabilización irreversible de las células (14).

Aspectos técnicos del tratamiento por PEAV

Parámetros del proceso

Los principales parámetros de procesado que definen los tratamientos PEAV son la intensidad de campo eléctrico, la forma y anchura del pulso, el número de pulsos, el tiempo de tratamiento, la frecuencia, la energía específica, la resistencia del medio de tratamiento y la temperatura. Entre ellos, la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la energía específica son los parámetros fundamentales en la aplicación de los procesos por PEAV.

Intensidad del campo eléctrico

La intensidad de campo eléctrico (E) es la diferencia de potencial (V) existente entre los dos electrodos dividida por la distancia (d) entre los mismos.

$$E = V/d$$

donde E se suele expresar en kV/cm.

Es un parámetro fundamental del proceso, ya que se ha visto que cuando aumenta su intensidad, también lo hace el efecto producido en la permeabilización de las envolturas celulares. La intensidad de campo eléctrico necesaria para permeabilizar las membranas de células eucariotas es bastante más baja que la necesaria para inactivar microorganismos. La diferencia en el tamaño celular provoca que para conseguir inactivar microorganismos por esta tecnología sea necesario aplicar intensidades de campo eléctrico superiores a los 10 kV/cm, y si se quieren aplicar tratamientos para conseguir una inactivación microbiana suficiente que garantice la seguridad de los alimentos se requieren intensidades de campo eléctrico superiores a los 25 kV/cm (15). Para permeabilizar células eucariotas para mejorar la transferencia de masa, intensidades de campo eléctrico inferiores a 10 kV/cm son suficientes para crear poros irreversibles en las membranas.

Tiempo de tratamiento

El tiempo en el que el alimento está sometido a un campo eléctrico de alta intensidad viene determinado por el número de pulsos aplicados y la anchura del pulso aplicado. La anchura del pulso está condicionada por la forma del mismo. Los dos tipos de pulsos más comúnmente usados en los tratamientos son pulsos de onda cuadrada y pulsos de caída exponencial monopolares (16) (figura 2). Existe un tercer tipo, los pulsos bipolares, pero debido a que para que se puedan aplicar son necesarios equipos mucho más complejos, su utilización es menor.

Desde un punto de vista práctico, los pulsos de onda cuadrada son más adecuados que los de caída exponencial. Los estudios básicos de permeabilización de membrana por PEAV deberían realizarse con pul-

sos de onda cuadrada, ya que la definición de la intensidad de campo eléctrico y el tiempo de tratamiento es más precisa cuando se usa este tipo de pulsos. En los pulsos de onda cuadrada, prácticamente toda la energía eléctrica utilizada se aplica al máximo voltaje seleccionado (17, 18).

En pulsos de caída exponencial, una vez alcanzado el máximo voltaje, éste va disminuyendo exponencialmente a lo largo del tiempo, por lo que parte de la energía utilizada se aplica a un voltaje que no tiene ningún efecto aparente. Se trata, por tanto, de una energía eléctrica que únicamente contribuye al calentamiento del producto tratado. En los pulsos de onda cuadrada toda la energía eléctrica se aplica al máximo campo eléctrico alcanzado durante toda la duración del pulso. Por lo tanto, en los pulsos de onda cuadrada la anchura de pulso es el tiempo durante el que se aplica el campo eléctrico máximo, mientras que en los de caída exponencial, la anchura de pulso se define como el tiempo en el que el campo eléctrico disminuye hasta el 37% de su valor máximo (19).

Como se ha indicado anteriormente, el tiempo de tratamiento necesario para provocar la permeabilización de las membranas celulares depende de la intensidad de campo eléctrico aplicado. Por ejemplo, *Bouzrara y Vorobiev* (20), observaron que en un tratamiento a 0,04 kV/cm se necesitaban 200 segundos para permeabilizar las membranas, mientras que a 10 kV/cm, únicamente se necesitaron 5 µs. En general, se observa que tratamientos de alta intensidad y cortos tiempos de tratamiento son más efectivos que los de baja intensidad y larga duración.

Energía específica

La energía específica es un parámetro en cuyo valor se integran varios parámetros

Figura 2. Tipos de pulsos utilizados en los sistemas de generación de PEAV. (A) Pulso de onda cuadrada; (B) Pulso de caída exponencial.

del tratamiento, como la resistencia de la cámara de tratamiento, que depende de sus dimensiones y de la conductividad del alimento, la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento. El empleo de este parámetro resulta especialmente útil cuando se utilizan pulsos de caída exponencial ya que como se ha indicado con este tipo de pulso ni la medida del tiempo de tratamiento ni de la intensidad del campo eléctrico son precisas. De hecho, se ha propuesto su uso para caracterizar los tratamientos cuando se utilizan este tipo de pulsos. Sin embargo, a pesar de que en el cálculo de la energía específica se considera la influencia de la intensidad del campo eléctrico, cuando se utiliza este parámetro para definir un determinado tratamiento es necesario indicar además la intensidad del campo eléctrico aplicado. Cuando se comparan tratamientos de la misma energía específica se ha observado que son más eficaces aquellos aplicados a una intensidad del campo eléctrico mayor (21, 22).

La energía (W) aplicada en un tratamiento PEAV viene definida por la siguiente expresión:

$$W=\frac{1}{R}\int V^2(t)\ dt$$

donde R es la resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento, V es el voltaje aplicado y t la duración del pulso.

El conocimiento de la energía específica del tratamiento es además interesante para conocer los requerimientos energéticos del equipo, para estimar el coste del procesado y para comparar desde el punto de vista de gasto energético esta tecnología con otras tecnologías de procesado.

Equipo de generación de PEAV: principales componentes

Básicamente, para generar PEAV es necesaria la carga de un condensador con corriente eléctrica continua por medio de un generador eléctrico de alto voltaje, y su descarga intermitente en intervalos de tiempo del orden de microsegundos en una cámara de tratamiento. Los equipos además suelen disponer de un sistema de control que regula el funcionamiento de todos los componentes y de un sistema de toma de los principales parámetros que caracterizan estos tratamientos.

Generador de PEAV

El generador de pulsos eléctricos de alto voltaje está constituido por un generador de corriente eléctrica continua de alto voltaje, un condensador y un interruptor (figura 3).

El generador de corriente eléctrica continua transforma la corriente alterna de la red eléctrica en corriente continua con la

Figura 3. Esquema básico de un sistema de generación de PEAV.

que se carga el condensador. El condensador, o condensadores, son el almacén de energía eléctrica que se descargará en la cámara de tratamiento a través del interruptor. El interruptor controla el paso de la corriente eléctrica desde el condensador a la cámara de tratamiento.

El tipo de interruptor que utiliza un equipo de generación de PEAV determina la configuración eléctrica y las características del resto de los componentes del equipo. Básicamente, hay dos tipos de interruptores, aquellos que una vez abiertos permiten interrumpir el paso de la corriente eléctrica, y aquellos que no son capaces de hacerlo tras su apertura. Los primeros permiten la descarga parcial del condensador y dan lugar a pulsos de onda cuadrada. Los segundos provocan la descarga total del condensador y dan lugar a pulsos de caída exponencial.

Como se ha indicado anteriormente, los pulsos de onda cuadrada son más adecuados que los pulsos de caída exponencial, pues permiten tener un mejor conocimiento tanto de la intensidad de campo eléctrico como del tiempo de tratamiento aplicado. Sin embargo, los primeros interruptores desarrollados para la aplicación de pulsos de onda cuadrada no permitían trabajar con voltajes muy elevados. Ello limitaba el empleo de los pulsos de onda cuadrada a equipos de laboratorio. Para equipos más potentes era necesario el empleo de pulsos de caída exponencial. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado interruptores capaces de generar pulsos de onda cuadrada de voltajes elevados (1). Por ello, en la actualidad la mayoría de los equipos a escala de planta piloto o incluso de producción industrial utilizan este tipo de pulsos.

Cámara de tratamiento

La cámara de tratamiento es el lugar donde se localiza el producto para su tratamiento. Básicamente, consta de dos electrodos, uno de ellos conectado al condensador a través del interruptor y el otro, a tierra. Los electrodos se encuentran separados por un material aislante a una distancia que suele oscilar entre 1-50 mm. Debido a que muchas de las características del resto del equipo vienen definidas por las dimensiones y características de la cámara de tratamiento, éstas han sido estudiadas ampliamente en lo referente a su diseño, geometría, material de construcción, etc.

Los materiales con los que se fabrican tanto los electrodos como el aislante no deben interaccionar con el producto, y deben poderse limpiar con facilidad e incluso esterilizar (19). Algunos de los materiales recomendados para la fabricación de los electrodos son el acero inoxidable o el grafito, mientras que para el aislante, cerámicas o polímeros plásticos. *Bushnell y col* (23) consideran más adecuados para la construcción de los electrodos o para su recubrimiento ciertos materiales inertes desde un punto de vista electroquímico, como el oro, el platino o el carbono.

Los diseños de las cámaras de tratamiento han sido muy variados, generalmente los electrodos utilizados son de superficie plana. Sin embargo, algunos autores (24) han utilizado electrodos con otras geometrías, como en forma de aguja, un alambre o discos planos.

El diseño de la cámara de tratamiento, fundamentalmente la geometría de sus electrodos, es de gran importancia para

conseguir intensidades de campo eléctrico elevadas y uniformes. Por ello, en ocasiones para su creación se han utilizado programas informáticos especiales que simulan la distribución de la intensidad del campo eléctrico en su interior (25, 26). Generalmente, las cámaras de tratamiento de electrodos paralelos son las que permiten obtener una distribución del campo eléctrico más uniforme. Sin embargo, debido a la gran superficie de los electrodos, los requerimientos energéticos son más elevados. Otras configuraciones, como la colineal, requieren menos energía para la aplicación de los tratamientos, pero la distribución del campo eléctrico no es uniforme, lo que complica enormemente establecer el tratamiento aplicado. En la figura 4 se muestra la imagen y distribución del campo eléctrico en una cámara de tratamiento de electrodos paralelos (4A) y en una colineal (4B) en flujo continuo.

Independientemente de la geometría del electrodo, la cámara de tratamiento puede utilizarse para aplicar tratamientos estáticos o en flujo continuo. Las cámaras para tratamientos estáticos son más indicadas en equipos a escala de laboratorio, y se utilizan para realizar investigaciones básicas. Las cámaras en flujo continuo se suelen emplear en equipos a escala de

Figura 4. Imagen y distribución del campo eléctrico en una cámara de tratamiento de electrodos paralelos (A) y en una colineal (B) para tratamientos PEAV en flujo continuo. La gráfica muestra la distribución del campo eléctrico a lo largo de la zona de tratamiento.

planta piloto donde se simulan tratamientos a escala industrial. Otro factor que influye en la elección de la cámara de tratamiento es su resistencia, debido a que determina la forma del pulso y la máxima diferencia de potencial alcanzada entre los electrodos, el calentamiento del producto al paso de la corriente y la configuración eléctrica del equipo. La resistencia eléctrica de la cámara de tratamiento depende de sus dimensiones geométricas y de la conductividad del medio de tratamiento.

Aplicaciones de los PEAV en la industria alimentaria

Durante los últimos años se han realizado numerosas investigaciones con el fin de desarrollar nuevas tecnologías de procesado menos agresivas sobre las propiedades de los alimentos. Una de estas tecnologías es la de pulsos eléctricos de alto voltaje. Como se ha indicado en apartados anteriores, estos tratamientos provocan un fenómeno conocido como electroporación que conduce al aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, tanto de células eucariotas como procariotas. Este efecto causado por estos tratamientos se está investigando para inactivar microorganismos y pasteurizar alimentos a temperaturas que no afecten a las propiedades de los alimentos y para permeabilizar células eucariotas con el propósito de mejorar procesos de transferencia de masa en la industria alimentaria. Aunque las ventajas de la tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje para distintas aplicaciones se han demostrado tanto a escala de laboratorio como de planta piloto, por el momento, sólo ha habido una aplicación industrial de esta tecnología para la pasteurización de zumos de frutas (27). Sin embargo, cabe esperar que el esfuerzo que se está realizando, especialmente, para el desarrollo de equipos, pronto dé sus frutos y esta tecnología se convierta en un tratamiento habitual en la industria alimentaria, no sólo para conservación de alimentos líquidos sino también como método de mejora de la extracción de componentes intracelulares de interés para la industria alimentaria.

Aplicación de los PEAV a la conservación de los alimentos

El método más habitual utilizado por la industria alimentaria para la inactivación de los microorganismos y enzimas presentes en los alimentos es el calor. La inactivación microbiana por el calor permite prolongar el tiempo de conservación de los alimentos y obtener alimentos sanitariamente seguros. Sin embargo, los tratamientos térmicos pueden modificar las características organolépticas y provocar la pérdida de los componentes nutritivos termosensibles de los alimentos. Debido a estos efectos adversos, en la actualidad se está realizando un notable esfuerzo para encontrar sistemas alternativos de conservación de los alimentos que sustituyan ventajosamente al calor. Entre estos nuevos sistemas de procesado de los alimentos, podemos destacar las altas presiones hidrostáticas, los ultrasonidos, los pulsos de luz, los campos magnéticos oscilantes y los pulsos eléctricos de alto voltaje (28).

La inactivación de microorganismos mediante la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje fue observada por primera

vez por *Doevenspeck* (29). Estos estudios fueron ampliados por *Sale y Hamilton* (30, 31), que estudiaron sistemáticamente el efecto de los pulsos eléctricos de alta intensidad sobre distintos microorganismos a finales de los años 60. Durante la década de los 80, se realizaron nuevos estudios, y en los últimos 10 años, se está considerando muy seriamente el uso de esta tecnología como sistema de pasteurización de alimentos termosensibles.

La eficiencia de inactivación de los microorganismos mediante PEAV depende de los parámetros del proceso, de las características intrínsecas del microorganismo y del medio de tratamiento. Estos factores que condicionan la resistencia microbiana a los PEAV están resumidos en la tabla 1.

De entre todos los parámetros del proceso, cabe destacar como los más importantes la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento, la energía específica y la temperatura de tratamiento. Por encima de un campo eléctrico denominado campo eléctrico crítico, la inactivación microbiana aumenta al hacerlo tanto la intensidad del campo eléctrico como el tiempo de tratamiento y la energía específica (figura 5) (32-34). La aplicación de tratamientos PEAV permite conseguir a temperatura ambiente niveles de inactivación similares a los alcanzados por tratamientos de pasteurización térmica en alimentos líquidos. Sin embargo, para conseguir estos niveles se requieren tratamientos muy intensos poco viables de aplicar a nivel industrial. Así, como se observa en la figura 5, para conseguir seis ciclos de destrucción de *Salmonella Senftenberg* 775 W es necesario aplicar tratamientos de 28 kV/cm, 1.000 μs y 1.500 kJ/kg en condiciones estáticas. Con el fin de reducir la intensidad de los tratamientos se están desarrollando procesos combinados. Una de las combinaciones más prometedoras es la aplicación de pulsos eléctricos a temperaturas subletales, combinación que permite aumentar la letalidad de los tratamientos de forma sinérgica (figura 6).

Finalmente, cabe destacar, como se observa en las gráficas de supervivencia microbiana a distintos campos eléctricos (figura 5), que la inactivación microbiana por PEAV no sigue la tradicional cinética de primer orden (figura 5). Por ello se están desarrollando modelos matemáticos alternativos para establecer las condiciones de tratamiento que aseguren una

Tabla 1. Factores que afectan a la inactivación microbiana por PEAV.

Parámetros del proceso	Características microbianas	Parámetros del producto
Intensidad del campo eléctrico	Resistencia intrínseca	Conductividad
Tiempo de tratamiento	Tamaño y forma celular	pH
Características del pulso (forma y anchura)	Condiciones de crecimiento	Actividad de agua
Frecuencia	Condiciones de recuperación	Composición
Temperatura		
Energía específica		

Figura 5. Influencia de la intensidad del campo eléctrico, del tiempo de tratamiento y de la energía específica aplicada en la inactivación de Salmonella Senftenberg 775 W en tampón McIlvaine de pH 7,0 por tratamientos PEAV. Condiciones de tratamiento: intensidad del campo eléctrico: 15 kV/cm (◇), 22 kV/cm (△) y 28 kV/cm (□). Anchura del pulso: 2 µs. Frecuencia: 1 Hz. Temperatura < 35 ºC.

inactivación microbiana suficiente para garantizar la seguridad y estabilidad de los alimentos.

Las principales características intrínsecas que se han investigado en relación con la resistencia microbiana a los PEAV son: el tipo de microorganismo (esporas, bacterias, levaduras, mohos), características de las envolturas celulares (bacterias Gram+ o Gram-), tamaño y forma del microorganismo, estado fisiológico (fase de crecimiento exponencial o estacionario), y la carga microbiana inicial. De entre estos parámetros el tipo de microorganismo y las características de las envolturas celulares son las características que más influyen en la resistencia microbiana. Debido al peculiar mecanismo de acción de esta tecnología las esporas bacterianas, cuyas membranas están protegidas por el cortex son resistentes a estos tratamientos. En consecuencia, esta tecnología puede utilizarse como alternativa a los tratamientos térmicos de pasteurización pero no a los de esterilización. El tipo de envolturas que rodean a las membranas celulares de las bacterias y que determina su diferente comportamiento a la tinción de Gram también ejerce una influencia muy importante en el comportamiento de éstas frente a los tratamientos por PEAV, especialmente, como se indica a conti-

Figura 6. Influencia de la temperatura inicial del medio de tratamiento en la inactivación de Escherichia coli tratada por PEAV. Condiciones de tratamiento: 40 kV/cm, 60 kJ/kg. Medio de tratamiento: zumo de manzana. Caudal: 2 l/h.

nuación, en lo referente a la influencia del pH del medio de tratamiento en la resistencia al tratamiento (35).

Las características del medio de tratamiento también afectan a la resistencia microbiana a los PEAV. Como se muestra en la tabla 1, son muchos los factores dependientes del medio de tratamiento que se han investigado. De entre ellos, quizás el que tiene más relevancia es el pH del medio de tratamiento. En general, se observa que la flora Gram positiva es más resistente en medios de pH neutro y la flora Gram negativa la más resistente en medios de pH ácido (figura 7) (35). Este diferente comportamiento indica que el microorganismo de referencia para establecer la intensidad de los tratamientos que garantice la seguridad de los alimentos dependerá del pH del alimento en cuestión.

La mayor sensibilidad a los PEAV de las bacterias Gram positivas en medios ácidos indica que los alimentos líquidos ácidos como los zumos de fruta serían los productos más adecuados para ser tratados por esta tecnología. Sin embargo, la mayor resistencia en estos medios de las bacterias Gram negativas podría limitar esta aplicación. No obstante, se ha observado que las bacterias Gram negativas tratadas en medios ácidos quedan dañadas subletalmente tras los tratamientos (36) de forma que cuando el zumo tratado se almacena durante un tiempo, estas bacterias mueren, alcanzándose niveles de inactivación adecuados para la higienización del producto. Esta circunstancia permitiría por tanto aplicar esta tecnología para el procesado de zumos. Por otro lado, la existencia de daño subletal debido a los PEAV abre la posibilidad de combinar esta tecnología con otras (por ejemplo, el uso de antimicrobianos) aumentando la eficacia letal de los tratamientos o disminuyendo la intensidad de los mismos.

Figura 7. Ciclos logarítmicos de inactivación de diferentes bacterias Gram negativas y Gram positivas en tampón McIlvaine de pH 4,0 y 7,0 tratadas a 25 kV/cm y 300 pulsos.

Las **enzimas**, tanto de origen endógeno como exógeno, son otro agente de alteración que afecta a la estabilidad de los alimentos. En muchas ocasiones, la intensidad de los tratamientos térmicos está determinada por su resistencia al calor. A diferencia de lo que ocurre con la inactivación de células vegetativas, los resultados publicados sobre la destrucción de enzimas mediante esta tecnología son contradictorios (37). Mientras que algunos autores han observado que se trata de un método muy eficaz para la inactivación de enzimas (38), otros indican que, al igual que las esporas bacterianas, las enzimas son resistentes a los PEAV (39, 40). Los autores que han observado algún efecto han indicado que la resistencia de los enzimas depende, además de la conformación y constitución de la enzima, de factores similares a los que influyen en la

resistencia microbiana. Algunos ejemplos de enzimas que se han inactivado en cantidades considerables son la α-amilasa (85% de inactivación a 80 kV/cm), lipasa (85% a 87 kV/cm), y la glucosa-oxidasa (75% a 64 kV/cm), todas con un tratamiento de caída exponencial y 30 pulsos de 2 microsegundos. Sin embargo, otras como la fosfatasa alcalina, tras un tratamiento de 80 kV/cm y 30 pulsos, solamente se inactivó un 5%, o incluso en algún caso se ha observado un incremento de su actividad. Este es el caso de la pepsina que tras un tratamiento de 40 kV/cm y 30 pulsos aumentó su actividad 2,6 veces (40). También se han observado reducciones de la pectin metilesterasa de tomate de hasta un 93,8% (41) y de la polifenol-oxidasa de melocotón y de pera de hasta un 70 y 62%, respectivamente, así como de manzana hasta un 97% (42).

Con relación al impacto de los tratamientos PEAV en los parámetros de calidad de los alimentos líquidos tratados por esta tecnología, de los resultados existentes se puede concluir que los PEAV aplicados a intensidades que permitirían pasteurizar alimentos apenas afectan a la estabilidad de las proteínas, al contenido de vitaminas, al color, olor y sabor de productos como zumos, leche u ovoproductos (37).

En conclusión, los resultados obtenidos tanto a escala de laboratorio como de planta piloto, indican que los PEAV son eficaces para la inactivación de células vegetativas de microorganismos, no así las formas esporuladas, por lo que esta tecnología tendría como objetivo conseguir la pasteurización de alimentos líquidos. Por otro lado, la falta de eficacia sobre muchas enzimas requiere que para prolongar la vida útil de los alimentos líquidos tratados por esta tecnología como leche, huevo líquido o zumos de frutas se combine con su almacenamiento en refrigeración. De entre todos los alimentos líquidos, los zumos de fruta parecen los productos más indicados para esta tecnología por distintas razones. Por un lado, las propiedades sensoriales de muchos de ellos se ven muy afectadas por los tratamientos térmicos; por otro, su bajo pH impide la germinación de las esporas bacterianas. Finalmente, su conductividad es muy adecuada para aplicar tratamientos de una intensidad elevada con un gasto energético moderado.

Aplicación de tratamientos PEAV a procesos de transferencia de masa

En los años 80, la tecnología de los PEAV se comenzó a utilizar de forma generalizada en el campo de la biología celular con distintos objetivos como la transferencia de genes, la electrofusión de células o la electroinserción de proteínas dentro de las membranas celulares (43). Pero no fue hasta los años 90 cuando se comenzó a investigar en profundidad la aplicación de los PEAV para mejorar procesos de transferencia de masa en la industria alimentaria. Fundamentalmente, estos estudios han sido realizados por el grupo de investigación del Dr. Knorr en la Universidad Técnica de Berlín y por el grupo de investigación del Dr. Vorobiev en la Universidad de Tecnología de Compiègne.

La mayoría de las investigaciones en la mejora de los procesos de transferencia de masa se han centrado en procesos de extracción tanto por difusión como por presión de compuestos de interés para la industria alimentaria como azúcar, colo-

rantes naturales, polifenoles, etc. (44-49). La aceleración de los procesos de deshidratación, tanto por aire caliente como por osmótica, así como la mejora de la posterior rehidratación también han sido investigados (43). Además de estos estudios aplicados, también se han realizado numerosos trabajos encaminados al desarrollo de modelos matemáticos que ayuden a comprender los principales factores que influyen en el proceso, al efecto de los tratamientos sobre las propiedades físicas de los alimentos y para comprender los mecanismos de acción de esta tecnología y así poder optimizar los procesos de transferencia de masa (50-53). A modo de ejemplo del efecto de los tratamientos PEAV en la extracción de compuestos intracelulares de interés en la industria alimentaria, en la figura 8 se muestra la influencia de la intensidad del campo eléctrico en la cantidad de betalaina (colorante alimentario E-162) extraída a partir de remolacha roja tratada por PEAV y en la figura 9 el aspecto del mosto tras una hora de maceración procedente de hollejos de uva garnacha tratados por distintos tratamientos PEAV.

Figura 8. Influencia de la intensidad del campo eléctrico en la concentración de betalaina extraída de la remolacha roja tratada por pulsos eléctricos de alto voltaje. Condiciones de tratamiento: campo eléctrico 0 kV/cm, 1 kV/cm, 3 kV/cm, 5 kV/cm y 7 kV/cm; 50 pulsos. Tiempo de extracción: 400 minutos.

Equipo y coste del proceso

A principios de los años 90, los estudios sobre la tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje en la industria alimentaria se centraron fundamentalmente en la pasteurización de alimentos líquidos sensibles al calor, debido a su capacidad para la inactivación de microorganismos a temperaturas inferiores a las utilizadas en el procesado térmico (54). Para conseguir un nivel de inactivación suficiente, que garantice la seguridad microbiológica de los alimentos, se requieren intensidades de campo eléctrico superiores a los 25 kV/cm, lo que encarece considerablemente los equipos y aumenta el gasto energético (15). Debido a que las células eucariotas tienen un mayor tamaño que las procariotas, la permeabilización por PEAV requiere la aplicación de campos eléctricos inferiores a los 10 kV/cm. Como consecuencia, tanto el coste de los equipos como los requerimientos energéticos del proceso son mucho menores. En la tabla 2, se comparan las características y los costes de un equipo para la permeabilización de las membranas celulares con el objeto de mejorar procesos en los que se produce una transferencia de masa con las características y costes de un equipo de pulsos eléctricos de alto voltaje destinado a la pasteurización de los alimentos (15).

Para la permeabilización de células eucariotas podrían ser suficientes tratamientos inferiores a los 5 kV/cm. Por ejemplo, para el procesado de 10 toneladas/hora de fruta para la extracción de zumo con un

Figura 9. Aspecto del mosto tras una hora de maceración procedente de hollejos de uva garnacha tratados por distintos tratamientos PEAV.

tratamiento de entre 1 y 2 kV/cm y un tiempo de procesado de alrededor de 50 microsegundos sería necesario aportar 10 kJ/kg de energía, y el consumo eléctrico aproximado sería de 3 kWh por tonelada de producto. Asumiendo un precio del kWh de 10 céntimos de euro, el coste de electricidad para el tratamiento PEAV podría ser de aproximadamente 0,3 euros por tonelada. Considerando un 10% más de gastos indirectos, el consumo total ascendería a 0,33 euros/ton. El coste de una maceración enzimática para el mismo objetivo se encuentra alrededor de los 2 euros/ton. Como se indica en la tabla, el coste del equipo para esta aplicación podría ser de aproximadamente 150.000 euros.

Para procesos de pasteurización de líquidos, donde se requiere un pico de campo eléctrico en el rango de 30-40 kV/cm, dependiendo del tipo de producto, sistema experimental, geometría de la cámara de tratamiento, y parámetros del proceso tales como forma del pulso y temperatura de procesado, la energía específica de procesado variaría de 50 a varios cientos de kJ/kg. Para el procesado con una energía específica de 50 kJ/kg, se requeriría un consumo eléctrico de 13 kWh/tonelada de producto lo que supondría un coste económico de 1,3 euros por tonelada procesada. En caso de que el tratamiento requerido llegara a los 700 kJ/kg, el coste económico por tonelada de producto alcanzaría los 19,4 euros. Para esta segunda aplicación, debido a los elevados requerimientos energéticos, el coste del equipo podría alcanzar los 5,8 millones de euros. Sin embargo, para el primer caso en el que se requiere 50 kJ/kg el coste sería bastante menor, alrededor de los 420.000 euros.

El excesivo coste de los tratamientos de pasteurización, especialmente si se requieren tratamientos muy intensos, es una de

Tabla 2. Características y costes de un equipo de PEAV para permeabilizar membranas de células eucariotas y de uno para inactivación microbiana.

	Inactivación microbiana	Permeabilización de células eucariotas
Requerimientos		
Intensidad campo eléctrico (kV/cm)	30-40	1-5
Flujo (ton/h)	10	10
Energía (kJ/kg)	50-700	10-50
Costes	50 kJ/kg (> 35ºC)	
Equipo (euros)	420.000	150.000
Procesado (euros/ton)	0,5	0,33-3
	700 kJ/kg (< 35ºC)	
Equipo (euros)	6.000.000	
Procesado (euros/ton)	20	

las razones que frena el empleo de esta tecnología en la industria alimentaria para la pasteurización de los alimentos. Sin embargo, el equipo necesario para la permeabilización de células eucariotas tiene un coste más moderado por lo que quizás esta aplicación se extienda más en la industria alimentaria en un futuro próximo.

Agrdecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida de los proyectos AGL 2007-62738 y 015710-2NOVELQ que ha permitido obtener algunos de los resultados que se muestran en este capítulo.

Bibliografía

1. Raso J, Heinz V, editors. Pulsed electric fields technology for the food industry: Fundamentals and applications, New York: Springer. 2006.

2. Zimmermann U. Electric breakdown, electropermeabilization and electrofision. Rev Phys Biochem Pharmacol. 1986; 105:196-256.

3. Palaniappan S, Sastry SK. Effects of electricity on microorganisms: a review. J Food Process Preserv. 1990; 14:393-414.

4. Ho SY, Mittal GS. Electoporation of cell membranes: a review. Crit Rev Biotechnol. 1996; 16(4):349-62.

5. Prasanna GL, Panda T. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. Bioprocess engineer. 1997; 16:261-4.

6. Tsong TY. Electroporation of cell membranes. Biophys J. 1991; 60:297-306.

7. Chang DC, Saunders JA, Chassy BM, Sowers AE. Overview of electroporation and electrofusion. In: Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE, editors. Guide to electroporation and electrofusion. San Diego: Academic Press. 1992. p. 1-9.

8. Neumann E, Rosenheck K. Potential difference across vesicular membranes. J Memb Biolog. 1973; 14:194-6.

9. Schoenbach KH, Peterkin FE, Alden RW, Beebe SJ. The effect of pulsed electric fields on biological cells: experiments and applications. IEEE transactions on plasma science. 1997; 25(2):284-92.

10. Teissie J, Tsong TY. Electric field induced transient pores in phospolipid bilayer vesicles. Biochem. 1981; 20:1548-54.

11. Muraji M, Tatebe W, Konishi T, Fujii T. Effect of electrical energy on the electropermeabilization of yeast cells. Bioelectrochem Bioenerg. 1993; 31:77-84.

12. Saulis G, Venslauskas, MS, Naktinis J. Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. Bioelectrochem Bioenerg. 1991; 26:1-13.

13. McNeil P, Steinhardt RA. Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity. J Cell Biol. 1997; 137(1):1-4.

14. Bouzrara H, Boroviev E. Solid/liquid expression of cellular materials enhanced by pulsed electric field. Chem Eng Process. 2003; 42:249-57.

15. Toepfl S, Heinz V, Knorr D. Application of pulsed electric field technology for the food industry In: Raso J, Heinz V, editors. Pulsed electric field technology for the food industry: Fundamentals and applications. New Tork: Springer. 2006. p. 197-221.

16. Jemankondan S, Jayas DS, Holley RA. Pulsed electric field processing of foods: A review. J Food Prot. 1999; 62(9):1088-96.

17. Góngora-Nieto MM, Sepúlveda DR, Pedrow P, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. LWT-Food Sci Technol. 2002; 35(5):375-88.

18. Bazhal M, Lebovka N, Vorovieb E. Optimisation of pulsed electric fields strength for electroplasmolysis of vegetative tissues. Biosyst Engineer. 2003; 86(3):339-45.

19. Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. J Food Engineer. 1995; 25:261-81.

20. Bouzrara H, Vorobiev E. Beet juice extraction by pressing and pulsed electric fields. Int Sugar J. 2000; 102:194-200.

21. Heinz V, Álvarez I, Angersbach A, Knorr D. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design. Trends Food Sci Technol. 2001; 12:103-11.

22. Álvarez I, Raso J, Sala FJ, Condón S. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. Food Microbiol. 2003; 20:691-700.

23. Bushnell AH, Dunn JE, Clark RW, Swanson JS. High Pulsed Voltage Systems for extending the shelf life of pumpable food products. 1993. U.S. Patent 5,235,905.

24. Huang K, Wang J. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. J Food Engineer. En prensa. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.06.013.

25. Lindgren M. Pulsed Electric Field Food Treatment and Low Frequency Bioelectromagnetics. Tesis doctoral. Dpto. Electromagnetics. Chalmers University of Technology: Göteborg, Sweden. 2001.

26. Gerlach D, Alleborn N, Baars A, Delgado A, Moritz J, Knorr D. Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: A review. Innov Food Sci Emerg Technol. 2008; 9(4):408-17.

27. Clark JP. Pulsed electric field processing. Food Technol. 2006; 6:66-7.

28. Barbosa-Cánovas GV, Tapia MS, Cano MP. Novel Food Processing Technologies. Boca Raton: Marcel Dekker/CRC Press. 2005.

29. Doevenspeck H. Influencing cells and cell walls by electrostatic impulses. Fleischwistschaaft. 1961; 13:986-7.

30. Sale AJH, Hamilton WA. Effect of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeast. Biochim Biophys Acta. 1967; 148:781-8.

31. Sale AJH, Hamilton WA. Effect of high electric fields on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. Biochim Biophys Acta. 1968; 163:37-43.

32. Barsotti L, Cheftel JC. Food processing by pulsed electric fields: 2. Biological aspects. Food Rev Int. 1999; 15(2):181-213.

33. Wouters P, Álvarez I, Raso J. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. Trends Food Sci Technol. 2001; 12:112-21.

34. Álvarez I, Condón S, Raso J. Microbial inactivation by pulsed electric fields, in Pulsed electric fields technology for the food industry: Fundamentals and applications. In: Raso J, Heinz V, editors. New York: Springer. p. 97-129.

35. García D, Gómez N, Raso J, Pagán R. Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. Innov Food Sci Emerg Technol. 2005; 6:388-95.

36. García D, Gómez N, Condón S, Raso J, Pagán R. Pulsed electric fields cause sublethal injury in *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol. 2003; 36(3):140-4.

37. Mañas P, Vercet A. Effect of PEF on enzymes and food constituents, in Pulsed electric fields technology for the food industry. In: Raso J, Heinz V, editors. New York: Springer. p. 131-51.

38. Marselles-Fontanet AR, Martín-Belloso O. Optimization and validation of PEF processing conditions to inactivate oxidative enzymes of grape juice. J Food Engineer. 2007; 83:452-62.

39. Castro AJ. Pulsed electric field modification of activity and denaturation of alkaline phosphatase. Washington State University, Pullman, Washington, PhD Thesis. 1994.

40. Ho SY, Mittal GS, Cross JD. Effects of high electric pulses on the activity of selected enzymes. J Food Engineer. 1997; 34:69-84.

41. Giner J, Gimeno V, Espachs A, Élez P, Barbosa-Cánovas GV, Martín-Belloso O. Inhibition of tomato (*Licopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields. Innov Food Sci Emerg Technol. 2000; 1:57-67.

42. Bendicho S, Arántegui J, Martín-Belloso O. Procesado de alimentos mediante pulsos eléctricos de alta intensidad. II. Efectos sobre microorganismos y componentes de los alimentos. Alimentaria. 2001; 37:37-44.

43. Vorobiev E, Lebovka NI. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields, in Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications. In: Raso J, Heinz V, editors. New York: Springer. 2006. p. 153-93.

44. Bazhal M, Vorobiev E. Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. J Sci Food Agricult. 2000; 80:1668-74.

45. Ade-Omowaye BIO, Angersbach A, Taiwo KA, Knorr D. The use of pulsed electric fields in producing juice from paprika (*Capsicum Annuum* L.). J Food Process Preserv. 2001; 25:353-65.

46. Eshtiaghi MN, Knorr D. High electric field pulse pretreatment: potential for sugar beet processing. J Food Engineer. 2002; 52:265-72.

47. Jemai AB, Vorobiev E. Enhanced leaching from sugar beet cossettes by pulsed electric field. J Food Engineer. 2003; 59:405-12.

48. Praporscic I, Lebovka N, Vorobiev E, Mietton-Peuchot M. Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. Separation and Purification Technology. 2007; 52(3):520-26.

49. López N, Puértolas E, Condón S, Álvarez I, Raso J. Application of pulsed electric fields for improving the maceration process during vinification of red wine: influence of grape variety. Europ Food Research Technol. 2008; 227(4):1099-107.

50. Angersbach A, Heinz V, Knorr D. Electrophysiological model of intact and processed plant tissues: cell disintegration criteria. Biotechnol Prog. 1999; 15:753-62.

51. Rastogi NK, Eshtiaghi MN, Knorr D. Accelerated mass transfer during osmotic dehydration of high intensity electrical field pulse pretreated carrots. J Food Sci. 1999; 64(6):1020-23.

52. Lebovka NI, Bazhal MI, Vorobiev E. Pulsed electric field breakage of cellular tissues: visualisation of percolative properties. Innov Food Sci Emerg Technol. 2001; 2:113-25.

53. Knorr D. Impact of non-thermal processing on plant metabolites. J Food Engineer. 2003; 56:131-4.

54. Barbosa-Cánovas GV, Sepúlveda D. Present status and the future of PEF technology. In: Barbosa-Cánovas GV, Tapia MS, Cano MP, editors. Novel Food Processing Technologies. Boca Ratón: Marcel Dekker/ CRC Press. 2005. p. 1-44.

Altas frecuencias como proceso de descontaminación alternativo y tomografía computerizada como herramienta de seguimiento de procesos

Dr. Pierre A. Picouet

Altas frecuencias como proceso de descontaminación alternativo

Introducción

Las altas frecuencias son ondas electromagnéticas que van desde 30 Kilo Hertz (KHz) a 300 Giga Hertz (GHz). Dentro de ellas encontramos las denominadas radiofrecuencias, que corresponden a ondas entre 30 KHz y 300 Mega Hertz (MHz) y las denominadas microondas que corresponden a ondas entre 300 MHz y 300 GHz. Las frecuencias no son de libre uso, en realidad quedan solamente algunas bandas de frecuencia muy restringidas llamadas bandas ISM por *Industrial Scientific and Medical* (ver tabla 1).

En el mundo de la tecnología de alimentos, las altas frecuencias son bien conocidas debido al uso del horno microondas doméstico, aparato que hoy en día se ha convertido en un elemento importante en las cocinas del mundo desarrollado. En el ámbito industrial, la aplicación de las altas frecuencias es más marginal debido a varios factores como el desconocimiento de la tecnología, el coste del equipo y la necesidad de tener personal cualificado para el mantenimiento y utilización de dichos equipos (*Picouet y del Valle, 2005*). Las ventajas de estas tecnologías, en comparación con un tratamiento térmico convencional, es por un lado alcanzar muy rápidamente la temperatura deseada y recortar el tiempo de proceso y por otro lado poder incorporar dicho proceso en una línea en continuo. No obstante, para definir y aplicar las altas frecuencias se necesita un conocimiento del producto (e.j. constantes dieléctricas, geometría, tipo de envase, etc.) y de su aplicación (*Ryynänen y Ohlsson, 1996; Brody, 2001; Ryynänen, 2002*). Actualmente en la industria alimentaria, las principales aplicaciones son la descongelación, el secado y la pasteurización de productos frescos y elaborados.

Tabla 1. Bandas de frecuencia ISM autorizadas.

	Banda ISM
Radiofrecuencia	13,56 MHz ± 6,68 KHz
	27,12 MHz ± 160,00 KHz
	40,68 MHz ± 20,00 KHz
Microondas	915 MHz ± 13 MHz
	2.450 MHz ± 50 MHz
	5.800 MHz ± 75 MHz
	24.125 MHz ± 125 MHz

Acción de las altas frecuencias sobre un alimento

Frente a un material, las altas frecuencias van a ser reflectadas por un material conductor (e.j. metales), van a atravesar el material aislante (e.j. plástico, cerámica, vidrio,…) y serán absorbidas por el material dieléctrico (e.j. alimentos, tejido humano y material polar). En el último caso estos materiales pueden generar calor. En los alimentos, los componentes (figura 1) que pueden absorber las altas frecuencias son: por una parte las moléculas dipolares como el agua que son eléctricamente neutras pero que presentan una zona negativa y una zona positiva; las moléculas largas que tienen un grupo carboxilo, es decir, una parte polar como los ácidos grasos y por otra parte los iones libres y partículas cargadas, presentes en el producto.

Según el tipo de producto, su composición química, viscosidad o estructura, uno de estos tres fenómenos será más relevante que los otros.

Parámetros importantes

Las altas frecuencias son una onda electromagnética con un componente magnético y un componente eléctrico. Si miramos la ecuación (EQ. 1) que representa la potencia utilizada por unidad de volumen, para la generación de calor, podemos ver que solamente el componente eléctrico "E" es útil.

$$P = 2\pi f \varepsilon_0 \times \varepsilon'' \times |E|^2$$

EQ. 1 (Buffler, 1993).

Los principales parámetros representados en esta ecuación son el factor de pérdida ε", la frecuencia f y la amplitud del campo eléctrico en el interior del material E. Esta ecuación se puede relacionar con parámetros termodinámicos como la velocidad de incremento de temperatura, el calor específico y la densidad del material.

Las propiedades dieléctricas describen cómo los materiales poco conductivos interaccionan con el campo eléctrico de la radiación electromagnética. Estos paráme-

Molécula polar: molécula de agua H_2O.

Ácido palmítico con un grupo carboxilo que manifiesta una **carga negativa** en contacto con el agua.

Iones libres en solución acuosa.

Figura 1. Componentes que pueden absorber las altas frecuencias.

tros proceden de la ecuación de permitividad y se diferencian entre la constante dieléctrica ε′ y el factor ε″ anteriormente citado. Estos parámetros, a pesar de llamarse constantes, son variables con distintos factores como la frecuencia del campo electromagnético, la temperatura del material, la actividad de agua, las concentraciones de sales, el contenido en grasa, etc.

La composición química del alimento tiene también una influencia sobre los parámetros termodinámicos que actuarán cuando el producto se caliente. No debemos olvidar que el tratamiento por altas frecuencias es un tratamiento térmico. La característica electromagnética de esta tecnología se manifiesta también por la importancia de la geometría del producto y el envase. Como se observa en la figura 2, los bordes de esta barqueta de arroz no se calientan de la misma manera que el centro. La diferencia de temperatura al final de los 120 segundos alcanza 61,3±3,1 °C en el centro y 86,6±5,5 °C en las esquinas. Este fenómeno hace que la geometría y el envase puedan ser considerados como un ingrediente más que hay que considerar a la hora de diseñar un experimento o un proceso industrial.

En resumen, los factores críticos son: en el alimento la composición química, el comportamiento de los parámetros dieléctricos del producto y su evolución respecto a la temperatura, la forma y el tamaño del alimento y si es líquido o sólido; en el envase se debe tener en cuenta si el envase es hermético o abierto, si hay presencia de un material absorbente, si hay presencia de *suceptores*[1] u otros objetos metáli-

Figura 2. Representación de los perfiles de temperaturas medias de las esquinas y el centro de una barqueta de arroz calentado durante 120 s a una potencia media.

[1] *Los suceptores son materiales con una resistividad eléctrica de 50-250 ohm/square que son depositados sobre un envase para absorber las microondas y generar de esta manera una irradiación infrarrojo. Este punto de calor generado permite tener también un calentamiento externo. En envases alimenticios se utiliza aluminio plastificado.*

cos que focalizan el efecto de las altas frecuencias, la forma del envase, si el material es compatible con las altas frecuencias; en el proceso, los factores están relacionados con el tiempo de proceso, la temperatura máxima, la potencia y si existe la posibilidad de combinar el tratamiento por altas frecuencias con un tratamiento térmico por vapor saturado, por aire caliente o bien por aire frío; en cuanto al tipo de equipo se debe considerar su tamaño, su frecuencia y la adecuación de la cavidad al producto.

Los envases

Como se comentó anteriormente, el envase (ver tabla 2) que se quiere utilizar es un ingrediente más en un proceso de altas frecuencias. Los envases (*Picouet y de Valle, 2005*) tienen que responder a características físico-químicas particulares, es decir, tienen que ser transparentes a las ondas electromagnéticas, tener un factor de pérdidas ε'' lo más pequeño posible (< 0,002) y, por supuesto, como se ha indicado previamente, ser estables térmicamente para poder resistir las temperaturas de trabajo (-30 °C a 120 °C). La tabla 2 muestra los principales materiales utilizados.

Además de los propios envases y films, se pueden añadir elementos externos como una válvula para permitir el escape de vapor de agua o *suceptores* para calentar la superficie del producto, como por ejemplo el envase para palomitas.

Aplicaciones de las altas frecuencias

Hoy en día las principales aplicaciones de las altas frecuencias están relacionadas con procesos de pasteurización, procesos de descontaminación de productos frescos enteros, procesos de descongelación, procesos de secado y por supuesto procesos de cocción. A continuación vamos a presentar algunas aplicaciones.

Proceso de pasteurización

El objetivo de las altas frecuencias y de las microondas en particular es descontaminar un producto para asegurar su vida útil y su vida comercial durante algunas semanas. Con respecto a un tratamiento tradicional, los argumentos para utilizar esta tecnología son la velocidad de calentamiento y de proceso, la posibilidad de tener un proceso continuo y las mejoras sensoriales y nutricionales del alimento procesado. Las altas frecuencias pueden alcanzar un nivel de descontaminación

Tabla 2. Principales envases utilizados durante un tratamiento por alta frecuencia.

Tipo de envase	Temperatura máxima	Algunas características
Polipropileno (PP)	90-120 °C	Congelable, adaptado por MAP, fácil de sellar, barato…
Teraftalato de polietileno expandido (CPET foam)	200-220 °C	Fácil de sellar con PET, precio normal, peso reducido, buen aislamiento térmico.
Teraftalato de polietileno cristalizado (CPET)	> 250 °C	Congelable, adaptado para MAP. Fácil de sellar en PET y PP, colores limitados (blanco y marrón), un poco caro.

importante con tratamientos inferiores a los 60 segundos (*Aymeric y col, 2008*).

En el mundo industrial, para platos refrigerados se habla más del valor de pasteurización P_{10} (EQ. 2) y de valor de cocción C_v (EQ. 3).

$$P_{10}^{70} = \int 10^{\frac{(T-70)}{10}} dt \qquad \text{EQ. 2}$$

$$C_v = \int 10^{\frac{(T-100)}{33}} dt \qquad \text{EQ. 3}$$

La tabla 3 muestra el cálculo del valor de pasteurización y de cocción para dos tipos de producto. En el caso de la verdura tenemos el ciclo completo calentamiento/enfriamiento y en el caso de producto precocinado mostramos la parte de calentamiento hasta la temperatura máxima. En el primer caso las microondas dan un valor de pasteurización superior al autoclave y un tiempo de cocción inferior, lo que hace que el producto final en el microondas es de mejor calidad. En el caso del plato precocinado, el tratamiento convencional da un valor de pasteurización y de cocción elevados para un tratamiento de 105 minutos. Con las microondas, el tratamiento 1 da un valor de pasteurización[2] y de cocción más bajo. Al contrario, el tratamiento 2 es más agresivo con temperatura máxima superior a 90 ºC y con valores de pasteurización y cocción elevadas que dañan el producto.

Proceso de descongelación

El objetivo de este proceso es descongelar bloques de carne o pescado en menos de una hora para poder ser procesados posteriormente. Los bloques suelen tener un peso desde 18 hasta 27 kg y normalmente tienen que pasar de -18 ºC hasta 5 ºC (*Farag y col, 2009*). En este caso se utilizan principalmente las radiofrecuencias debido a la capacidad de penetración de la onda y por la homogeneidad del calentamiento. Las radiofrecuencias se utilizan para la primera parte de la descongelación durante el atemperado hasta -2 ºC y para finalizar la descongelación se utiliza una cámara de refrigeración.

Comparando con métodos tradicionales con aire o agua, la ventaja de la técnica radica principalmente en un tiempo de procesado más corto. Así, *Farag y col*

Tabla 3. Descontaminación por altas frecuencias de algunos alimentos.

Microorganismo	Producto	Tiempo	Tª máx.	P_{10}^{70}	C_v
Autoclave	Bolsas de verduras	Ciclo < 16 min	~ 86 ºC	111 min	2,1
Microondas	Bolsas de verduras	Ciclo < 4 min	~ 94 ºC	261 min	1,1
Autoclave (105 min)*	Plato precocinado	< 105 min	~ 85 ºC	550 min	11,9
Microondas 1 (8,5 min)**	Plato precocinado	< 14 min	81-84 ºC	93 min	2,0
Microondas 2 (10,5 min)**	Plato precocinado	< 16 min	90-94 ºC	709 min	15,6

** Tiempo de subida del autoclave y de mantenimiento.*
*** Tiempo de proceso donde las microondas son en marcha.*

[2] *Tomado en cuenta el valor D de 0,25 a 68 ºC para vacuno (Guideline nº 51, 2006), una reducción de 6 log de* Staphylococcus aureus *se obtiene en un tiempo de 1,5 min, lo que hace que los tratamientos propuestos estén muy por encima de este valor.*

(2009) han temperado un bloque de vacuno de 4 kg desde -18 ºC hasta -5 ºC en 11 min con un proceso por radiofrecuencias, y en 5 horas y 22 min con aire. En el IRTA (figura 3) se han atemperado bloques de 4 kg entre -18 ºC y -2 ºC en 25 minutos con un exudado medio de 0,6%. Con un proceso con aire a 20 ºC el tiempo para llegar a -3 ºC ha sido de 151 min y con un proceso con aire a 5 ºC hemos tenido un tiempo de 578 min. Otra ventaja del método de radiofrecuencias es que el exudado suele ser inferior a 1%, mientras que con los métodos tradicionales se puede esperar un exudado de entre un 6 y 8%. Esta diferencia permite tener un producto final con características sensoriales similares o mejores que con los métodos convencionales.

Comentarios

La tecnología de altas frecuencias ofrece alternativas viables económicamente para diferentes procesos minimizando el impacto del tratamiento y mejorando la calidad final del producto. A diferencia de los tratamientos térmicos convencionales, los resultados obtenidos todavía no son totalmente generalizables, de manera que el crecimiento en el número de aplicaciones industriales depende de los futuros desarrollos en los equipos y de un conocimiento exhaustivo de las matrices alimentarias. Muchas de las empresas pequeñas y medianas del sector agroalimentario no están capacitadas para realizar actividades de valorización y aplicación de tecnologías emergentes. Actualmente este trabajo se realiza en centros integrados al ámbito universitario, organismos de investigación como el IRTA (*Institut de Recerca de Tecnologíes Alimentaries*) o en centros tecnológicos como el CENTA.

La tomografía computerizada como herramienta de seguimiento de procesos

Principios de base y equipos de tomografia computerizada (TC)

La Tomografía Computerizada (TC) consiste en la obtención de imágenes de cortes o secciones de un objeto digitalmente a partir de una serie de imágenes de rayos X de dicha sección (*Fulladossa y col 2008*). Desde finales de los años 70, el uso de equipos TC en radiología se ha extendido en todos los hospitales y clínicas del mundo. Otras áreas como la arqueología (*Harwood-Nash, 1979*) o la paleontología (*López-Polin y col, 2007*) utilizan también esta tecnología y más recientemente el área de tecnología de los alimentos.

La tomografía consiste en medir la atenuación de una fuente de rayos X al atravesar una sección de un material durante una rotación de 360º. Para cada ángulo el equipo registra una curva del factor de atenuación y mediante un algoritmo de reconstrucción genera una imagen digital de 512x512 vóxeles (voxel: pixel volumétrico). Esta imagen de la sección analizada da la distribución de las densidades del material, su unidad es la Unidad Hounsfield o HU. Para obtener un visión volumétrica del material se escanean varias secciones y mediante un programa informático se obtiene un volumen (figura 4).

El equipo disponible en el IRTA-CENTA es un Modelo GE HiSpeed ZX/i y tiene las características siguientes: protocolo axial o helicoidal, espesor de corte de 1, 2, 3, 5, 7 ó 10 mm, campo de visión de 1.800 mm hasta 500 mm, tiempo de rotación de 0,7

Figura 3. Perfil de temperaturas para la descongelación de un bloque de carne de cerdo de 3,5 kg por radiofrecuencias y por aire ha 20ºC.

hasta 3 s. El tubo de rayo X puede tener tres voltajes 80, 120 y 140 kV con una intensidad que puede variar entre 60 y 380 mA.

Figura 4. Reconstrucción en 3D de un jamón (cerdo de tipo Duroc) mediante el escaneado de 182 imágenes de TC y con el programa de reconstrucción VisualPork, desarrollado por la Universitat de Girona y el IRTA-Subprograma de Calidad de la Canal.

Aplicación de la tomografía al control de la canal porcina

El objetivo de este trabajo es estudiar la predicción del contenido en magro de la canal porcina en función de los parámetros de escaneo del TC y determinar su error de predicción.

Para este trabajo se seleccionaron 123 canales de cerdo, representativo de la población porcina española. Veinticuatro horas después del sacrificio las medias canales izquierdas debidamente refrigeradas se prepararon según el sistema de referencia (Reglamento CE Nº 1197/2006). Estas canales fueron escaneadas por TC con un voltaje de 140 kV, una intensidad de 140 mA, un tiempo de rotación de 1 s y un espesor de corte o de sección de 10 mm. Después del escaneado por TC las medias canales fueron disecadas y el porcentaje de magro de referencia fue calculado según el sistema oficial vigente (Reglamento CE Nº1197/2006). Con los

datos de TC (figura 5) y el resultado de las disecciones se elaboraron tres modelos de predicción (tabla 4). El primero se basa en un modelo de densidad (*Picouet y col, 2010*), el segundo es un modelo de densidad con una regresión linear y el tercero un modelo (*Font i Furnols y col 2009*) con una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

Para los modelos propuestos se determinó (ver tabla 4) el coeficiente de correlación R2 y el error de predicción con una validación externa para el modelo 1, y una validación cruzada para los modelos 2 y 3.

Los errores calculados son inferiores a los que recomienda la normativa europea y están por debajo de los errores que se obtienen con los diferentes equipos de clasificación autorizados hasta el momento en Europa para la predicción del porcentaje de magro. También podemos añadir que estos errores son inferiores al error del sistema de referencia (disección) que se encuentra alrededor de un 1,96% (*Nissen y col, 2006*).

Estos datos muestran que el TC podría reemplazar el sistema tradicional de medición del porcentaje de magro en la canal de cerdo. Este trabajo se lleva también a

Figura 5. Histogramas de las frecuencias volumétricas de los tres grupos de animales. Los grupos son determinados por el espesor de grasa medido entre 3ª y 4ª últimas costillas y a 6 cm (Font i Furnol y col, 2008).

Tabla 4. Coeficiente de correlación y error de predicción del porcentaje de magro de los tres modelos establecidos.

Modelos	R2	Error de predicción	
Densidad	0,923	1,48%	Validación externa
Densidad + linear	0,921	1,04%	Validación cruzada
Modelo PLS	0,958	0,83%	Validación cruzada

cabo en otros países de la Unión Europea (Alemania, Dinamarca, Francia, Irlanda, Hungría) o asociados (Noruega) con el fin de proponer a la Comisión Europea una modificación del reglamento en vigor.

Calibración del TC para el seguimiento de proceso de curación de un jamón

Durante el proceso de secado de jamones, el conocimiento de la distribución de la sal durante varias etapas del proceso es fundamental para comprender y mejorar dicho proceso. La tomografía permite observar variaciones de densidad y como los iones Na^+ y Cl^- tienen una densidad más elevada que los constituyentes mayoritarios de la carne (C, H, N, O) y estos aparecen en las imágenes de TC con más contraste (*Vestergaard y col, 2005*). Para ir más allá de las imágenes se estableció una calibración (*Fulladosa y col, 2008; Fulladosa y col, 2009*) de las imágenes de tomografía para poder medir el contenido en sal y agua. Para establecer esta calibración, se prepararon un total de 24 jamones con diferentes nivel de engrosamiento.

Los jamones se salaron a 3 ºC a diferentes tiempos para obtener diferentes rangos del contenido en sal. De la misma manera, el periodo de reposo osciló entre 23 y 45 días para obtener diferentes contenidos en agua. A diferentes etapas del proceso los jamones fueron escaneados con los parámetros siguientes: voltajes de 80 kV y de 120 kV, intensidad de 250 mA con un campo de visión de 461 mm y un tiempo de rotación de 2 segundos. Se tomaron imágenes de forma axial (secciones de 10 mm de espesor) en la zona con más grosor de los jamones objeto del estudio (10 cm por encima de la rótula). Utilizando los datos de química analítica de cada ROI se realizó un análisis estadístico para poder definir un modelo de predicción (tabla 5) para las etapas de salado y reposo.

Para cada imagen de TC se establecieron cuatro regiones de interés (ROI) cuyo contenido químico fue analizado.

Como muestra la figura 6, el modelo permite reemplazar las imágenes en unidades HU en imágenes mostrando la distribución del contenido en sal y la distribución del contenido en agua para una sección. Con este modelo de predicción, el TC puede ser utilizado como herramienta en la caracterización y optimización de los procesos de salado y secado en la industria cárnica. El modelo permite también un estudio cualitativo y cuantitativo de las distintas fases del proceso de elaboración.

La figura 7 muestra la evolución del contenido en sal y agua de un volumen de 10,8 cm^3 (54 mm x 20 mm x 10 mm) del

Tabla 5. Modelo de predicción del contenido en sal y agua para las etapas de salado y reposo.

	Ecuaciones del modelo de predicción	SD*	R2
Humedad	H %= 84,52595 + 0,24350 x HU80 – 0,42462 x HU120	1,46	0,86
Contenido en sal	NaCl %= -2,15555 + 0,04107 x HU80	0,29	0,97

** SD: error de predicción.*

Figura 6. Aplicación del modelo de predicción para una sección de un jamón al final de su periodo de salado de 16 días.

músculo bíceps femoris de un jamón con un periodo de salado de 16 días y un periodo de reposo de 45 días. Como se puede apreciar en esta figura el incremento del contenido de sal es linear desde el día 4 de salado con una pendiente d[NaCl]/dt de 0,03%/días. Por lo contrario, el contenido de agua disminuye pasando de 73,2±1,1% al día 0 hasta 69,7±0,7% al final del reposo el día 62.

Estos datos cuantitativos permiten estudiar de manera muy precisa la evolución de la penetración de la sal en el jamón en particular para optimizar el salado y disminuir el contenido en sal en el producto final.

La técnica tiene algunos inconvenientes para un uso más industrial. Uno de los mayores inconvenientes (*Santos y col, 2009*) son el coste de mantenimiento de este equipo, los riesgos laborales asociados al trabajo con rayos X y el hecho de que no se pueda utilizar como herramienta de control *on-line*.

Figura 7. Evolución del contenido de sal y agua en un volumen de 10,8 cm³ del músculo bíceps femoris.

Bibliografía

Apostolou I, Papadopoulou C, Levidiotou S, Loannides K. The effect of short-time microwave exposures on Escherichia coli O157:H7 inoculated onto chicken meat portions and whole chickens. International Journal of Food Microbiology. 2005; 101:105-10.

Aymerich T, Picouet PA, Monfort JM. Decontamination Technologies for meat product, Meat Science, Meat Science. 2008; 78:114-29.

Brody A. "The return of microwavable foods", Food Technology. 2001; 55(3):69-70.

Buffler CH. "Dielectric Properties of Foods and Microwave Material" In Microwave Cooking and Processing. New York, USA, Van Nostrand Reinhold. 1993; pp. 46-69.

Farag KW, Lyng JG, Morgan DJ, Cronin DA. Effect of low temperatures (-18 to +5 °C) on the texture of beef lean. Meat Science. 2009; 81:249-54.

Font i Furnols, Terán F, Gispert M. Estimation of lean meat content in pig carcasses using X-ray Computed Tomography and PLS regression. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, Volume 98, Issue 1. 2009; 15:31-7.

Font i Furnols, Terán F, Picouet P, Gispert M. La tomografía computerizada como herramienta para la determinación de la composición de canal. Eurocarne nº 166. 2008; 1-8.

Fulladosa E, Santos E, García-Gil N, Picouet P, Gou P. La tomografia computorizada: herramienta para la caracterización del proceso de elaboración del jamón curado. Eurocarne nº 171. 2008; 1-6.

Fulladosa E, Santos E, Picouet P, Gou P. Salt and water content prediction by Computed Tomography in dry-cured hams. Journal of Food Engineering, in press. 2009.

Guideline nº 51. Pasteurization: A Food Industry Practical Guide. Campden & Chorleywood Food Research Association Group. 2006.

Nissen PM, Busk H, Oksama M, Seynaeve M, Gispert M, Walstra P, Hansson I, Olsen E. The estimated accuracy of the EU reference dissection method for pig carcass classification. Meat Science. 2006; 73(1):22-8.

Orsat V, Bai J, Raghavam GSV, Smith JP. Radiofrequency heating of ham to enhance shelf-life in vacuum packaging. Journal of Food Engineering. 2004; 27:267-83.

Picouet P, del Valle-Rodríguez V. Tratamientos de altas frecuencias: parámetros y aplicaciones. Eurocarnes nº 137. 2005; 1-10.

Picouet PA, Landl A, Abadía M, Castellari M, Viñas I. Minimal processing of a natural apple fruit purée by microwave heating. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2009; 10 (4):545-50.

Picouet PA, Terran F, Gispert M, Font i Furnols M. Lean Content prediction in pig carcass by computerized tomography (CT) using a density model, Meat Science en revisión. 2010.

Pucciarelli AB, Benassi FO. Inactivation of *Salmonella enteritidis* on raw poultry using microwave heating. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2005; 48:939-45.

Ryynämen S, Ohlsson T. "Microwave Heating Uniformity of ready meals as affected by placement, composition and geometry". Journal of Food Science. 1996; 63 (3):620-4.

Ryynämen S. Microwave heating uniformity of multicomponent prepared foods. PhD Dissertation, University of Helsinki, may 2002.

Santos-Garcés E, Muñoz I, Picouet P, Gou P y Fulladosa E. Prediccion del contenido de sal y agua en jamon curado mediante la tomografía computerizada. Eurocarne nº 176. 2009; 1-5.

Vestergaard C, Erbou SG, Thauland T, Adler-Nissen J, Berg P. Salt distribution in dry-curedham measured by computed tomography and image analysis. Meat Science. 2005; 69:9-15.

Yilmaz I, Arici M, Gümü ST. Changes of microbiological quality in meatballs after heat treatment. European Food Research and Technology. 2005; 221:281-3.

Zhang L, Lyng JG, Brunton N, Morgan D, McKenna B. Dielectric and thermophysical properties of meat batter for a temperature range of 5-85 °C. Meat Science. 2004; 68:173-84.

La tecnología de fluidos supercríticos en la industria. Formulación de aditivos alimentarios

Dra. M.ª José Cocero Alonso, Dr. Ángel Martín Martínez y Dra. Soraya Rodríguez Rojo

Introducción

El desarrollo de tecnologías basadas en la utilización de Fluidos Supercríticos (FSC) ha aportado nuevas oportunidades a la industria de la alimentación. Un fluido a presión y temperatura superiores a su punto crítico y con densidad reducida mayor que 1, presenta unas propiedades físicas características que le confieren un poder disolvente próximo al de los líquidos. Este poder disolvente está asociado a su densidad y se puede modificar mediante variaciones en la presión y temperatura. La variación de la solubilidad con la presión permite fraccionar los extractos en FSC por sucesivas despresurizaciones, ya que el mismo fluido puede actuar como disolvente en unas condiciones y como anti-disolvente en otras (1). El FSC más utilizado y que ha dado lugar al mayor número de desarrollos industriales es el CO_2 debido a que presenta unas moderadas constantes críticas (presión de 73,8 bar y temperatura de 31 °C) (2). La utilización de CO_2 presurizado como disolvente permite por lo tanto operar en atmósfera controlada a temperaturas próximas a la ambiental, obteniendo productos con propiedades mejoradas más próximas a la de su estado natural y sin restos de disolvente.

El desarrollo de tecnología basada en las propiedades de los FSC ha sido lento. En 1826 Van der Walls presenta su tesis doctoral sobre "la continuidad del estado líquido y gaseoso", donde desarrolla su conocida ecuación de estado para describir el comportamiento de los gases no ideales. En 1890 Hannay y Hogarth demuestran la propiedad que tienen los FSC de actuar como disolventes. Estos conocimientos no se aplicaron al desarrollo de procesos hasta 1960 con las patentes de Zosel sobre la extracción de la cafeína y el lúpulo en CO_2 SC, que dieron lugar a su implementación industrial entre 1975 y 1985.

Actualmente unas 250 plantas industriales en diferentes localizaciones desde Europa, China, sudeste asiático, Japón, EE.UU., hasta Nueva Zelanda utilizan fluidos supercríticos. La mayor parte de estas instalaciones están dedicadas a la industria alimentaria, con aplicaciones como la obtención de café y té descafeinados, lúpulo, extracción de aceites esenciales y especias, o eliminación de pesticidas entre otros. Durante los últimos 30 años se han venido estudiando las grandes posibilidades que tiene esta tecnología para una gran variedad de productos, pero no ha tenido el desarrollo industrial que cabría esperar, aunque se han alcanzado unas condiciones que pueden potenciar el desarrollo de estas tecnologías (3).

Un factor que comienza a ser decisivo en el desarrollo de nuevos proyectos industriales con FSC es el crecimiento del consumo de los productos alimentarios con propiedades funcionales. El mayor precio y la actual situación económica no han frenado el desarrollo de este mercado que sigue creciendo. Por ejemplo, el crecimiento en el consumo de bebidas probióticas fue del 13% en el último año (4). La preocupación de los consumidores por la calidad y seguridad de los alimentos que consume se ha incrementado y ha abierto un mercado al que están dando respuesta las empresas alimentarias desde sus áreas de negocio, creando empresas filiales dedicadas a desarrollar estos productos. La prevención y el control de enfermedades con la alimentación puede ser una alternativa para mejorar la calidad de vida y paliar el gasto farmacéutico. Esta es una de las claves que ha potenciado el desarrollo industrial de los procesos con FSC en el sudeste asiático. Desde el año 2006 Corea cuenta con dos plantas industriales dedicadas a la obtención de aceite de sésamo. El precio de este aceite obtenido con CO_2 SC es superior al obtenido por procedimientos tradicionales pero el consumo ha ido en aumento debido a que el consumidor lo percibe como un producto más natural y de mayor calidad. India cuenta con una planta industrial dedicada a la obtención de este tipo de alimentos. La planta opera a presiones de 550 atmósferas para poder extraer antioxidantes y aditivos como la luteína. Taiwán cuenta con una planta para el tratamiento de 30.000 ton/año de arroz.

En España, desde el año 2005 Corchos Mérida (San Vicente de Alcántara, Badajoz) opera la primera planta industrial dedicada a la extracción de los Tricloro Anisoles (TCA) del corcho triturado con CO_2 SC. En el año 2008 empieza a funcionar la empresa Altex (Alta Tecnología Extractiva), dedicada a la fabricación a máquina de productos naturales con CO_2 SC. En marzo del año 2009 se constituyó la Agrupación Empresarial para el Fomento de las Tecnologías del Estado Supercrítico (AFTS). Esta agrupación tiene por misión fomentar la utilización de la I+D en las tecnologías supercríticas para mejorar la competitividad de la industria española y crear oportunidades de mercado para la comercialización de los productos basados en la tecnología de los fluidos en estado supercrítico.

La necesidad de buscar alternativas que permitan un desarrollo sostenible está marcando nuevas tendencias en el diseño de procesos y productos. La producción centralizada en grandes plantas basada en la disponibilidad de petróleo barato está siendo sustituida por una nueva filosofía de una producción descentralizada que produzca "sólo lo suficiente". El diseño bajo esta nueva concepción va a requerir desarrollar nuevos procesos basados en materias primas y energías renovables. Esta nueva concepción abre nuevas oportunidades a los procesos que puedan utilizar disolventes sin limitaciones medioambientales, como el CO_2 y el agua; y puedan integrar en pequeñas plantas la obtención de productos y energía de fuentes renovables. En este marco los fluidos supercríticos pueden aportar el desarrollo de procesos con un elevado rendimiento y selectividad que hagan competitivos los productos que se obtengan.

Procesos desarrollados a escala industrial

Cafeína y otros alcaloides

La cafeína es un alcaloide (trimetilxantina) que está presente en el café (0,8-2%), en el té (1,5-5,6%) y en otras plantas. La comercialización de café y té descafeinado está ampliamente desarrollada tanto con disolventes convencionales como con CO_2. La primera planta industrial de obtención de café descafeinado con CO_2 (HAG AG) fue construida en Alemania en 1978 para la obtención de café descafeinado en grano. Actualmente, más de 100.000 ton/año de café descafeinado se obtienen por esta tecnología tanto en Europa: HAG AG (Bremen) y Barth & Co (Wolnzach) Alemania, y SKF/Trostberg (Venefro) Italia; como en EE.UU.: Kratf Foods.

El proceso consta de una etapa de extracción que opera a presiones entre 16,0 y 22,0 MPa y una etapa de separación de la cafeína del CO_2. Esta etapa puede realizarse por reducción de la presión hasta 4-5 MPa, consiguiéndose la separación de la cafeína, y posteriormente se recomprime y recircula el CO_2. El pretratamiento del café es equivalente al utilizado en el proceso convencional de extracción de la cafeína: adición de vapor de agua para aumentar el contenido de humedad del café y que el alcaloide pueda extraerse. Después de la extracción el café se seca hasta reducir su humedad al 10-12%.

El mayor coste energético del proceso está asociado a la etapa de recompresión del CO_2, por lo que se han desarrollado diferentes alternativas para reducir este coste. Zosel (5) propone separar la cafeína sin reducir la presión (procesos cuasi-isobáricos), por absorción con agua a 70-90 ºC. De esta forma la cafeína pasa a la corriente acuosa separándose posteriormente por destilación. La concentración de cafeína se reduce desde el 0,9-1,8% inicial al 0,08%, empleando entre 3 y 5 litros de agua por kg de café tratado (5).

En una segunda patente, Zosel propuso separar la cafeína de la corriente de CO_2 por adsorción en carbón activo. El carbón activo se regenera térmicamente a 600 ºC, destruyéndose la cafeína. En una tercera patente se dispone el café y el carbón activo en un único lecho, realizándose la extracción y la adsorción en etapas sucesivas. Finalizado el proceso se separa el café y el carbón activado por tamizado. Se requiere 1 kg de carbón activado para 3 kg de café tratado. Al no recuperar la cafeína este proceso es menos rentable. Actualmente se han estudiado alternativas de separación de la cafeína del carbón activo por arrastre con vapor de agua. La separación de la cafeína de la disolución acuosa mediante osmosis inversa ha dado buenos resultados y consigue recuperar la cafeína con menor gasto energético que la destilación, que es la tecnología que se ha venido usando.

En un esfuerzo por conseguir que el proceso operase en continuo, Kraft Foods propuso un sistema de recipientes presurizados y válvulas que permiten introducir y sacar el café del extractor a la presión de operación (5).

El proceso de ESC de la cafeína empezó operando con extractores de gran volumen (44 m^3) en las instalaciones que se construyeron antes de 1980, mientras que posteriormente se están utilizando extrac-

tores de volúmenes comprendidos entre 17 y 20 m^3 (6). Al operar con grandes tonelajes el coste de inventariable representa un menor porcentaje del coste por kg de café descafeinado producido. Además, al realizar las etapas de extracción y absorción a la misma presión, se reducen los costes de operación. Lack y Seidlitz estiman los costes del proceso entre 1,1 €/kg de café para plantas de 3.500 ton/año y 0,75 €/kg de café para plantas 7.000 ton/año; estos costes pueden reducirse hasta 0,55 €/kg para plantas que operan en condiciones cuasi-isobáricas y recuperan la cafeína (8). Otros procesos que se encuentran desarrollados a nivel industrial para la extracción de alcaloides son la eliminación de la cafeína del té y la de nicotina del tabaco (9).

Aceites esenciales y especias

La extracción de aceites esenciales y especias con CO_2 es la aplicación más extendida y sus ventajas han sido puestas de manifiesto en multitud de trabajos (10, 1, 4). Se producen más de 60.000 ton/año por esta tecnología, existiendo plantas industriales en Europa, EE.UU., Canadá, el sudeste asiático y Nueva Zelanda.

Los procesos convencionales de extracción por arrastre de vapor y extracción con disolventes no pueden realizarse en un único proceso. La extracción realizada a presiones entre 10 y 12 MPa con temperaturas cercanas al punto crítico del CO_2 (31 ºC y 7,38 MPa) permite obtener aceites esenciales equivalentes a los obtenidos por arrastre de vapor. Presiones de extracción de 35-45 MPa y temperaturas entre 40 y 70 ºC permiten obtener resinas, colorantes, ácidos grasos y ceras, entre otros; extractos que son obtenidos en la extracción convencional con un disolvente orgánico. La extracción de ambos tipos de compuestos se puede realizar en un único proceso de ESC mediante la separación fraccionada del extracto por reducción de la presión en dos o más etapas.

Las instalaciones de extracción con CO_2 de tamaño medio tienen dos o tres extractores con volúmenes entre 0,2 y 0,8 m^3 y operan a presiones entre 30 y 50 MPa. Se diseñan para trabajar con distintos tipos de plantas, con el fin de que operen durante el mayor tiempo posible y cubrir la estacionalidad en la recolección. Están equipadas con dos separadores, uno para recuperar la resina y otro para el aceite esencial. La instalación, tal como se observa en la figura 1, consta de un tanque de CO_2 (A), enfriador (B), bomba (C), precalentador (D), tres extractores (E), dos separadores (F_{resina}, F_{aceite}) y un condensador (G).

Para pequeñas capacidades de tratamiento, en torno a 150 ton/año las instalaciones tienen extractores de 0,2 m^3. Para la extracción de especias los tamaños medios industriales son 2 x 0,3 m^3, 3 x 0,3 m^3 hasta 3 x 0,5 m^3. Para la extracción de especias de mayor consumo como oleoresinas de pimentón, las plantas son más grandes, tres extractores de 0,8 m^3 es el tamaño más económico, pero debido a la baja solubilidad de los colorantes del pimentón en CO_2 estas instalaciones se diseñan para operar a presiones de 50-55 MPa.

En España, la empresa Altex ha puesto en funcionamiento una planta industrial multipropósito, que opera bajo maquila y consta de cuatro extractores de 1 m^3, que pueden operar hasta 35 Mpa (11). La

Figura 1. Esquema de una planta de extracción de aceites esenciales y especias.

figura 2 muestra un detalle de los depósitos de recirculación. IDOKI SCF Technologies desarrolla productos y procesos mediante la tecnología de fluidos supercríticos, con aplicación en los sectores agroalimentario, complementos alimenticios, farmacéutico y cosmético (12). La empresa SOLUTEX comercializa ácidos grasos (EPA –eicosapentanoico– y DHA –docohexaenoico–) presentes principalmente en el aceite de pescado, y licopeno, entre otros productos (13). La empresa Super Extractos, Cabeza de Torres (Murcia), comercializa extracto de oleoresina de pimentón (14).

Figura 2. Detalle de los depósitos de recirculación. Altex. Valencia.

El coste del proceso de obtención de extractos de plantas por esta tecnología depende de los kg de CO_2 por kg de extracto obtenido, de las condiciones de extracción y separación, de la etapa de separación soluto-disolvente (operación cuasi-isobárica, utilización de un extractor o una cascada de extractores), de la materia prima y de las condiciones de automatización de las plantas. Dada la gran variedad de materias primas a extraer y las condiciones de extracción y separación no se puede dar un valor promedio del coste. Lack and Seidlitz presentan un estudio del efecto de las variables del proceso en el coste de producción de diferentes extractos por ESC con CO_2 (8).

Lúpulo

El lúpulo es una planta trepadora muy común en algunas zonas de España, con-

cretamente en León se cultiva un 98% de la superficie total en España y el resto se reparte entre La Rioja y Galicia. El extracto de sus frutos, rico en α-ácidos, se utiliza para aromatizar y dar el sabor amargo a la cerveza.

La mayoría de las plantas de extracción de lúpulo en Europa, como SKW/Trostberg en Munchsmester, Barth & Co y Natural Cane en Wolnzach, Pfizer Sydney NB, Yakima VA en EE.UU. y Australia, utilizan CO_2. En Gran Bretaña y Australia se utiliza CO_2 líquido, en Alemania se utiliza la extracción con CO_2 en condiciones supercríticas. En EE.UU. las plantas de nueva construcción trabajan con CO_2 SC.

El proceso de extracción con CO_2 líquido opera a presiones de 6 MPa y temperaturas de 8 ºC. Para conseguir eficacias del 95% se requieren 50 kg de CO_2 por kg de alimentación. La etapa limitante es la baja solubilidad del extracto en CO_2, 0,8% de los α-ácidos a 7 ºC y 5 MPa (15). La ventaja de la extracción con CO_2 líquido es el menor coste de inmovilizado de la planta.

Las plantas que operan con CO_2 SC trabajan a presiones entre 30-35 MPa y temperaturas entre 40 y 65 ºC. La solubilidad del extracto en CO_2, a 30 MPa y 80º C, es del 3,2% en peso. Las plantas son de tamaño medio con 3 ó 4 extractores de volúmenes comprendidos entre 4 m^3 y 6,5 m^3. Aunque aumenta el coste de la planta, se reduce significativamente el tiempo de extracción y la cantidad de CO_2 a utilizar. Por este motivo las plantas de nueva construcción se diseñan para operar en condiciones supercríticas (15).

Concretamente, para la extracción de lúpulo a 35 MPa, separando el extracto por despresurización hasta 4,5 MPa y con 20 semanas de operación, Lack and Seidlitz calculan un coste de 1 €/kg de alimentación. La distribución del coste total que proponen excluyendo el coste de la materia prima es: intereses y depreciación 36%, mano de obra 24,5%, servicios 17,2%, impuestos y beneficios 20,5%, gastos de administración 1%. Los costes de inventariable representan la tercera parte del coste total del proceso, lo cual es mayor que el coste de un proceso convencional pero no son tan elevados como para descartar de entrada la utilización de FSC por los costes que conllevan (8).

Pesticidas de productos vegetales

El tratamiento con compuestos químicos de determinados cultivos para eliminar pestes termina con la acumulación de estos compuestos en el producto natural en concentraciones que pueden ser tóxicas para el organismo. La patente europea EP 0925724 A2 propone un procedimiento para extraer pesticidas de cereales. Actualmente, 30.000 ton/año de arroz se están tratando con CO_2 supercrítico, operando a presiones en torno a 32 MPa. Con humedades entre 10% y 15% se consigue reducir el contenido de pesticidas hasta valores inferiores a los que marca la legislación, utilizando cantidades de CO_2 entre 7 y 15 kg/kg de arroz. En 1999 empezó a funcionar la primera planta industrial en Taiwán. Está equipada con tres extractores de 8 m^3 para una producción de 90 ton/d de arroz (15).

Tricloro anisoles (TCA) del corcho

Los TCA son ésteres aromáticos volátiles presentes en el corcho que pueden implicar alteraciones organolépticas del vino.

Su difusión hacia el vino, incluso a bajas concentraciones, es la responsable del sabor a corcho o "picado". En el año 2005 empezó a funcionar la primera planta industrial de extracción de TCA con fluidos supercríticos en San Vicente de Alcántara (Badajoz). Esta planta está dedicada a la eliminación de tricloro anisoles del corcho triturado, mediante CO_2 en condiciones supercríticas, para obtener corchos de calidad destinados a tapones de botellas (16).

La planta industrial fue diseñada por las compañías SCF Technologies A/S (Dinamarca) y NATEX (Austria) para una capacidad de tratamiento de 2.500 ton de corcho al año. La planta consta de tres líneas formadas cada una por un extractor de 8,3 m^3 de volumen que opera en torno a 10 MPa, con un sistema neumático para la carga y descarga del corcho (figura 3); un separador que opera a 5 MPa, donde se despresuriza el CO_2 hasta gas, y dos lechos de carbón activo.

Debido a la baja relación de compresión, y a los grandes flujos con los que opera, la recirculación se hace mediante compresores. La figura 4 muestra el equipo para la recompresión del CO_2. Es la primera planta industrial que utiliza compresores frente a la condensación y recompresión del CO_2 mediante bombas que utilizan otros procesos industriales (17).

El corcho, triturado hasta tamaños entre 0,5 y 1 mm, es trasladado mediante un sistema neumático hasta los extractores. El sistema neumático permite la carga y descarga rápida del extractor. La extracción se realiza con CO_2 saturado de agua; el agua aumenta la solubilidad de los TCA y controla la humedad del CO_2 para evitar desecar el corcho y mantener las propiedades mecánicas que hacen del corcho el material natural por excelencia para la obturación. La inversión realizada por la compañía Oneo Bouchage fue de 15 millones de euros. "Corchos de Mérida S.A." comenzó a comercializar los tapones "diam" a finales del año 2005.

Figura 3. Detalle de los extractores y sistema de carga y descarga del corcho.

Formulación de aditivos alimentarios

La extracción del producto sin limitaciones toxicológicas y ambientales es el primer paso para obtener un compuesto natural, pero la formulación adecuada del compuesto permite potenciar y alargar la acción del compuesto activo. Las ventajas de utilizar formulaciones en los aditivos alimentarios son claras, ya que protegen

Figura 4. Detalle del sistema de recompresión de CO_2 gas.

contra la oxidación de compuestos activos como por ejemplo antioxidantes, o favorecen la solubilidad de compuestos poco solubles al aumentar la velocidad de disolución. Una formulación adecuada de un aditivo alimentario puede actuar como un sistema de liberalización controlada potenciando y alargado la acción del aditivo, características habituales de las formulaciones de los compuestos activos farmacéuticos (18-20).

La utilización de fluidos supercríticos para la precipitación, coprecipitación y encapsulación de materiales ha dado lugar a una variedad de procesos; dependiendo de la función que desempeñe podemos clasificarlos en procesos donde el FSC actúa de disolvente, procesos donde el FSC actúa de soluto, y procesos donde el fluido supercrítico actúa como anti-disolvente (21-23).

Fluido supercrítico como disolvente

Expansión rápida de disoluciones supercríticas

La propiedad que presentan los FSC de disolver algunos sólidos ha permitido desarrollar procesos de micronización basados en la rápida sobresaturación que se consigue al descomprimir la disolución hasta fase gas. Este proceso se denomina proceso RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions). Esta rápida sobresaturación favorece la etapa de nucleación sobre la de crecimiento de la partícula, formándose nano o micro partículas con una uniforme distribución de tamaños. El tiempo de precipitación es del orden de 10^{-5}s, que es lo que tarda la disolución en pasar por una válvula o un capilar para reducir su presión. Este proceso puede aplicarse a la micronización de compuestos que sean solubles en CO_2 SC. Se ha aplicado a la precipitación de alcaloides como la cafeína, biopolímeros y compuestos farmacéuticos (24). El proceso RESS también se puede utilizar para producir formulaciones de compuestos activos y de un portador. La aplicación más directa es la disolución de la sustancia activa y el portador en el fluido supercrítico, y la coprecipitación de ambas sustancias. La limitación de esta tecnología es la baja solubilidad de muchos compuestos de interés en el CO_2 SC. Esta limitación es más restrictiva para la coprecipitación, ya

que tanto el portador como la sustancia activa tienen que ser solubles en el CO_2 SC. Existen algunas aplicaciones relacionadas con la coprecipitación de compuestos farmacéuticos con biopolímeros (25, 26). También se ha estudiado incrementar la solubilidad en CO_2, mediante la adicción de codisolventes. Otra alternativa para evitar la baja solubilidad en los FSC es el proceso RESS-no solvente (RESS-N). En este caso, un líquido que no disuelva el polímero se utiliza como un cosolvente para mejorar la solubilidad en el fluido supercrítico. Aunque muchos de los polímeros con interés industrial no son solubles en CO_2, los lípidos presentan una moderada solubilidad en CO_2 y podrían utilizarse como portadores. *Mishima et al* (27) utilizan esta técnica para encapsular proteínas y productos farmacéuticos en polímeros como el PEG o PMMA y PLA.

Otro problema de la coprecipitación mediante tecnología RESS es la dificultad de controlar la morfología de las partículas y la carga de compuesto activo, dado que la precipitación por RESS es extremadamente rápida. Una alternativa, que elimina este problema, es la precipitación del portador sobre las micropartículas de la sustancia activa previamente formadas. Con este procedimiento, se puede controlar la carga de las partículas o el espesor del recubrimiento del portador, simplemente mediante el control de la composición de la alimentación. Con el objetivo de mejorar la homogeneidad de revestimiento, *Mishima et al* (28) presentó una modificación de este procedimiento que incorpora un mezclador en la cámara de la precipitación. Esto facilita la circulación de partículas y mejora el control y la homogeneidad del proceso. Otra alternativa, que también mejora la homogeneidad del producto, es la precipitación sobre un lecho fluidizado de partículas del principio activo (29). La homogeneidad del recubrimiento se ve facilitada por la intensa mezcla de las partículas en el interior del lecho fluidizado. También la estratificación de las partículas en la cámara por la gravedad puede mejorar la homogeneidad, ya que las partículas con una capa de recubrimiento más grueso que la media tiende a concentrarse en la sección inferior del lecho fluidizado, lejos de la parte superior en la que el portador precipita. En general, la encapsulación utilizando materiales que presentan una buena solubilidad en CO_2 mediante RESS tiene aplicaciones muy prometedoras debido a la simplicidad y la limpieza de estos procesos.

Impregnación mediante disoluciones en FSC

Los polímeros pueden impregnarse con un compuesto activo mediante la disolución del compuesto activo en un FSC y la posterior impregnación del polímero con la disolución (30). Un diagrama de este proceso se presenta en la figura 5. Consta de una columna donde se produce la disolución supercrítica mediante la saturación del compuesto activo en el CO_2, y una segunda columna donde se produce la impregnación del polímero. En algunas aplicaciones se añade un codisolvente para mejorar la solubilidad o para mejorar la dispersión del compuesto activo en el polímero.

Las características del producto obtenido como la concentración o la penetración pueden ajustarse variando la forma de despresurizar, el tiempo de impregnación o cambiando la densidad del disolvente

Figura 5. Diagrama de un proceso de impregnación en FSC.

variando la presión y la temperatura (31). La incorporación del compuesto activo al polímero puede producirse mediante precipitación durante el proceso de despresurización, como se ha descrito en la tecnología RESS. Sin embargo, este mecanismo de incorporación puede dar lugar a una fisisorción de la sustancia activa en el polímero, lo que provocaría que se desprenda con facilidad.

Un mecanismo alternativo, que puede mejorar las características del producto, es la impregnación del compuesto activo durante el contacto de la disolución del FSC y la matriz polimérica. Con un coeficiente de partición favorable y afinidad entre el compuesto activo y el polímero, se puede producir quimisorción y obtener un producto uniformemente impregnado. La impregnación mediante este mecanismo se ve favorecida por la hinchazón que provoca la disolución de CO_2 en el polímero.

Como en el proceso RESS la impregnación puede verse limitada por la baja solubilidad del compuesto activo en el FSC. *Alessi et al* (32) proponen utilizar determinados sólidos codisolventes como polidimetil siloxanos (PDMS) para aumentar la solubilidad del compuesto activo. Los PDMS son biocompatibles y, por tanto, su presencia en el producto final no limitaría la calidad del producto.

Para mejorar la aplicabilidad y el rendimiento de esta tecnología es necesario entender los mecanismos que regulan las interacciones entre el polímero, el CO_2 y la sustancia activa. Esto permitirá una adecuada selección del polímero-principio activo. También es importante evitar la deposición de la sustancia activa por precipitación durante la fase de expansión, ya que puede causar la formación de partículas o gotas de la sustancia activa que no están adheridas a la matriz y que reducirían la calidad del producto.

Fluido supercrítico como soluto. Partículas a partir de disoluciones saturadas de gas (PGSS)

El proceso PGSS está diseñado para producir partículas a partir de materiales que disuelven altas concentraciones de un fluido supercrítico. En este proceso, el FSC se disuelve en un sustrato, o en una disolución, o en una suspensión del sustrato en un disolvente. A continuación, una rápida expansión de la solución saturada a través de una boquilla causa la formación de partículas sólidas o líquidas, debido al intenso efecto de enfriamiento causado por la liberación de CO_2 y el efecto Joule-Thomson. Un diagrama esquemático de un proceso PGSS se presenta en la figura 6. Consiste en un precipitador en el que el gas se inyecta para formar la disolución saturada. La saturación de la solución con el gas se consigue por medio de un mezclador estático.

Este proceso ha sido desarrollado a escala industrial por la compañía RAPS, desde el año 2000 cuenta con una planta para la producción de 200 kg/h de aditivos alimentarios naturales en Kulm (33).

El proceso PGSS es especialmente adecuado para la producción de partículas de polímeros y también para la incorporación de sustancias activas en estas partículas (34). En esta aplicación la hinchazón y plastificación que causa la disolución de CO_2 puede mejorar la incorporación de la sustancia activa. El proceso PGSS también se puede utilizar para encapsular líquidos. En este caso, el agente encapsulante es un material que se funde y se mezcla con el líquido a encapsular. Ambos componentes son presurizados y dosificados en un sistema de mezcla. Algunos ejemplos son la encapsulación de la teofilina en el aceite de palma hidrogenado para obtener un sistema de dosificación controlada, proceso desarrollado por *Rodrigues et al*

Figura 6. Diagrama del proceso PGSS.

(35), el encapsulado de parafina líquida en poliester y la encapsulación de líquidos en polietilenglicol elaborada por *Wendt et al*, y el encapsulado de soluciones acuosas en grasas (36). Al igual que en el proceso de impregnación, la sustancia activa podrá incorporarse a la matriz, ya sea en forma segregada (partículas o vacuolas líquidas), o por adsorción en la matriz. En la encapsulación de líquidos para formar vacuolas dentro de la matriz, el rendimiento dependerá de la relacion entre la velocidad de solidificación de la matriz, que forma un depósito sólido en todo el líquido y evita su evaporación, y la velocidad de la difusión y evaporación del líquido a ser encapsulado.

Para disoluciones acuosas Sievers ha desarrollado un proceso denominado CAN-BD (CO_2 assited nebulización with a bubble dryer), en el que el CO_2 disuelto en la disolución acuosa actúa como codisolvente para favorecer la pulverización de la disolución, seguido de una etapa de secado mediante un gas caliente (37). Reverchon amplió este procedimiento a disoluciones no acuosas y principalmente lo ha aplicado a disoluciones de alcoholes (38).

Procesos basados en la utilización de fluidos supercríticos como antisolventes

Precipitación utilizando fluidos supercríticos como antidisolvente (SAS)

Estos procesos se basan en la total miscibilidad que presenta el CO_2 con disolventes orgánicos a presiones y temperaturas moderadas, y en la despreciable solubilidad que tienen muchos solutos en CO_2, de forma que el CO_2 puede actuar como antidisolvente para esos solutos. La rápida disolución del CO_2 en la disolución provoca un drástico descenso en la solubilidad del soluto, produciéndose una rápida nucleación sin dar tiempo al crecimiento de las partículas (39). El producto obtenido presenta un pequeño tamaño de partícula, inferior al conseguido con las técnicas de precipitación convencionales, a la vez que se obtiene una uniforme distribución de tamaños. Esta técnica se utiliza como procedimiento de micronización para productos termolábiles, puede aplicarse a compuestos que se disuelvan en disolventes orgánicos convencionales como alcoholes o ésteres, y que no se disuelvan en CO_2 (40).

Este proceso permite producir formulaciones mediante la coprecipitación del compuesto activo y el aditivo. También puede utilizarse para encapsular un compuesto activo previamente formado mediante la precipitación desde una disolución del aditivo utilizando CO_2 como antidisolvente, de forma que las partículas se comportan como núcleos para la precipitación del agente encapsulante (41). Este procedimiento es especialmente adecuado para materiales orgánicos, como las proteínas insolubles en CO_2 SC (42).

En la coprecipitación se pueden utilizar disolventes diferentes para la sustancia activa y el aditivo, dependiendo de su solubilidad. Las dos disoluciones se mezclarían y se adicionaría el fluido supercrítico como antidisolvente. El proceso denominado SEDS (Supercritical Enhanced Dispersion of Solution) utiliza un orificio para inyectar varias disoluciones liquidas en el FSC (43). Los procesos de precipitación utilizando SAS permiten conseguir elevadas concentraciones. De-

pende de la concentración inicial de compuesto activo y aditivo, y de la afinidad entre estos dos compuestos. Cuando no se da esta afinidad entre los compuestos se puede conseguir que el aditivo precipite de forma amorfa, en otros casos precipita en forma cristalina, aunque se puede actuar mediante la utilización de tensoactivos en la precipitación de la mezcla (44).

Las variables del proceso que más influyen en la morfología de la formulación son la concentración inicial de sustancia activa y el aditivo. En la formulación de β-caroteno y el PEG es posible obtener diferentes morfologías como esferas huecas, carotenoides parcialmente cubiertos con partículas relativamente pequeñas, esferas de PEG, o partículas esféricas de superficie lisa, con cambios en la relación entre la concentración de polímero y los carotenoides (45). Si la sustancia activa se incorpora en un estado amorfo en el portador, el tamaño de las partículas obtenidas puede ser más pequeño que el tamaño de las partículas del material del compuesto activo puro precipitado en las mismas condiciones (46). La temperatura es otro parámetro clave en el proceso de coprecitación mediante SAS, ya que en algunos casos, la adición de disolventes orgánicos a la mezcla polímero CO_2 SC puede conducir a una separación en dos fases líquido-líquido a temperaturas moderadas (47).

Extracción de Emulsiones con Fluidos Supercríticos (SFEE)

La formulación mediante emulsiones es una vía usual de distribuir compuestos no polares en un medio acuoso. Esta formulación requiere la utilización de un agente emulsionante, normalmente un disolvente orgánico, aunque se han desarrollado formulaciones de emulsiones estabilizadas por impedimento estérico mediante biopolímeros modificados como almidones (48).

La aplicación de los fluidos supercríticos en la formulación mediante emulsiones aparece como una alternativa para evitar la presencia de disolvente orgánico en la formulación final, evitando el uso de elevadas temperaturas que requieren los procesos de separación convencionales. Por otra parte, los fluidos supercríticos no son normalmente capaces de producir partículas de tamaño nanométrico y frecuentemente los productos obtenidos presentan problemas de aglomeración. La combinación de estas dos tecnologías fue presentada por *Perrut et al* (49), que proponen un proceso basado en la formación de una emulsión agua/orgánico, seguido de extracción con CO_2. Un compuesto soluble en un medio acuoso se disuelve en la fase dispersa agua/orgánico, el CO_2 SC junto con el disolvente orgánico actúan como medio de secado para formar las partículas. Este proceso permite secar partículas de proteínas a temperaturas moderadas (50). *Chattopadhyay et al* (51, 52) proponen un proceso para producir micropartículas y nanopartículas a partir de una emulsión orgánico-agua, mediante la disolución del soluto en un disolvente orgánico, la formulación de la emulsión y posterior extracción del disolvente. Durante la extracción las primeras gotas de la fase dispersa se saturan con el CO_2 y, a continuación, el CO_2 extrae el disolvente. Durante la saturación con el CO_2, cada gota se comporta como un microprecipitador en el que se produce la precipitación del soluto mediante el

efecto antidisolvente del CO_2 (53). Generalmente el producto final obtenido por este método consiste en una suspensión de micro o nanopartículas en agua. Estos autores han patentado el proceso como "extracción de emulsiones con fluidos supercríticos" (SFEE), y es especialmente adecuado para producir nano-suspensiones de productos naturales que son poco solubles o insolubles en agua, en lugar de obtener partículas secas que requieren secado por spray, secado a vacío o liofilización para producir partículas de polvo. La encapsulación de partículas, usando este procedimiento, se presentó (54, 55) para producir compuestos activos formulados en polímeros que permiten la liberación controlada del compuesto activo. Una de las ventajas de la utilización de emulsiones para la encapsulación es que si la solución activa se disuelve en la fase dispersa y el aditivo en la fase continua, se puede obtener una formulación final en forma de microcápsulas. Este procedimiento se ha utilizado para formular β-caroteno en agua mediante la formación de una nanosuspensión del diclorometano en agua (56).

Este procedimiento puede operar en continuo o por cargas. Los equipos son equivalentes a los utilizados para los procesos de precipitación utilizando un gas como antidisolvente. La figura 7 presenta el diagrama de la operación en continuo. Una emulsión de la sustancia activa en fase dispersa se inyecta en el precipitador junto con una corriente de CO_2, obteniéndose una formulación liquida que requeriría de una etapa de secado para obtener la formulación en fase sólida. Las variables del proceso son las descritas en el proceso SAS (presión, temperatura, caudal y concentracion), pero además se cuenta con la distribución del tamaño de

Figura 7. Diagrama del proceso SFEE.

las gotas de emulsión, que limita el crecimiento de las partículas y permite obtener partículas de tamaños inferiores al de las gotas formadas (53). La formación de la emulsión de la sustancia activa requiere el uso de un material tensoactivo y técnicas de dispersión de alta energía. Para optimizar esta tecnología es importante comprender la variación de las propiedades de la emulsión durante la saturación con el fluido supercrítico, teniendo en cuenta parámetros como los cambios en el tamaño de gota de la fase dispersa, debido a la disolución de la CO_2 SC, o la posible pérdida de la estabilidad de la emulsión causada por el CO_2, y la relación entre la cinética de emulsificación y cristalización en el proceso.

Conclusiones

La obtención de sustancias naturales con FSC, y en particular con CO_2, presenta ventajas claras: la no-toxicidad y fácil eliminación de los solventes, o la operación a temperaturas moderadas y en una atmósfera inerte que evita la degradación del producto. Esta tecnología ha dado lugar a diferentes desarrollos industriales, principalmente en la industria alimentaria. La posibilidad de cambiar las propiedades de los fluidos supercríticos con variaciones de la presión y la temperatura, o por la adición de disolventes, ha dado lugar a diferentes técnicas de precipitación que son capaces de procesar una gran variedad de materiales con tamaño y morfología controlada. Además la capacidad de los fluidos supercríticos de modificar los materiales poliméricos que actúan de portadores como plastificación, hinchazón, reducción de la temperatura de fusión etc., así como las interacciones entre el portador y la sustancia activa, permite modificar y controlar la forma en que la sustancia activa se incorpora al portador, lo que aporta unas propiedades únicas a la formulación. Estas posibilidades están limitadas por el hecho de que la producción de formulaciones de la sustancia activa-portador están basadas, en gran medida, en conocimientos empíricos; y no se conocen los mecanismos que rigen la formulación del fluido supercrítico, el portador y la sustancia activa. Un estudio detallado de los fundamentos en que se basan estos procesos puede dar lugar a nuevas oportunidades de controlar las propiedades de las formulaciones de aditivos alimentarios mediante tecnologías basadas en la utilización de fluidos supercríticos.

Agradecimientos

Agradecemos a la Junta de Castilla y León por la financición de la línea de investigación en formulación de compuestos naturales. Proyecto GR11.

Bibliografía

1. Brunner G. Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Springer. 1994.

2. Cocero MJ. Procesos industriales con fluidos supercríticos. Ingeniería Química. 2006.

3. Brunner G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. J Food Engineering. 2005; 67:21-33.

4. Plan estratégico de la AEI de biotecnología agroalimentaria de Castilla y León. ADE Castilla y León. 2009.

5. King MB, Both TR. Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents. Blackie. Academic & Profesional. 1993.

6. Schütz E. Supercritical fluids and applications. A patent review. 3rd International

Meeting in High Pressure Chemical Engineering. Erlangen (Alemania). Mayo 2006.

7. Gehrig M. Extraction of foodstuff with carbon dioxide. Present status and potencial. Proceeding of the 5th Meeting in Supercritical Fluids Niza (Francia). 1998; 495-500.

8. Lack E, Seidlitz H. Economics of high pressure processes. High Pressure Process Technology. Bertucco A, Vetter G Eds. Elsevier. 2001; 437-52.

9. Fukuzato R. Current status of supercritical fluid technology in the East Asia. Proceeding of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids Versalles (Francia). 2003; 1-10.

10. Meireles A. Supercritical extraction from solids: process desing data 2001-2003. Current Opinion in Solid State and Materials Science. 2003; 7:321-30.

11. Alta Tecnología Extractiva. www.altex.es

12. IDOKI. www.idoki.es

13. Solutex. www.solutex.es

14. Superextractos. www.superextract.es

15. Lack E, Simandi B. Supercritical fluids extraction and fractionation from solids materials. High Pressure Process Technology. Bertucco A, Vetter G Eds. Elsevier. 2001; 537-75.

16. Cocero MJ, Rincón D. La extracción con fluidos supercríticos. Nueva tecnología consolidada. 1ª planta industrial para la separación de tricloro anisoles del corcho. Tecnología del vino. Febrero 2005; 87-92.

17. Lack E. Industrial cleaning of cork with supercritical CO_2. 3rd International Meeting in High Pressure Chemical Engineering. Erlangen (Alemania). 2006.

18. Desai K, Park HJ. Recent developments in microencapsulation of food ingredients, Drying Technol. 2005; 23:1361-94.

19. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, Food Res Int. 2007; 40:1107-21.

20. Georgetti SR, Casagrande R, Fernández CR, Pereira W, Vieira MJ. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity, LWT-Food science and technology. 2008; 41:1521-7.

21. Martín A, Cocero MJ. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. Adv Drug Deliv Rev. 2008; 60(3):339-50.

22. Cocero MJ, Martín A, Mattea F, Varona S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications J. of Supercritical Fluids. 2009; 47:546-55

23. Martín A, Cocero MJ. Precipitation processes with supercritical fluids: patents review. Recent Patents Eng. 2008; 2:9-20.

24. Jung J, Perrut M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. J Supercrit Fluids. 2001; 20(3):179-219.

25. Debenedetti PG, Tom JW, Kwauk X, Yeo SD. Rapid expansion of supercritical solutions (RESS): fundamentals and applications. Fluid Phase Eq. 1993; 82:311-21.

26. Kim JH, Pastón TE, Tomasko DL. Microencapsulation of naproxen using rapid expansion of supercritical solutions. Biotechnol Prog. 1996; 12:650-61.

27. Mishima K, Matsuyama K, Tanabe D, Yamauchi S, Young TJ, Johnston KP. Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a non-solvent, AIChE J. 2000; 46:857-65.

28. Mishima K. Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas. Adv Drug Deliv Rev. 2008; 60:411-32.

29. Rodríguez-Rojo S, López-Valdezate N, Cocero MJ. Residence time distribution studies of high pressure fluidized bed of microparticles. J Supercrit Fluids. 2008; 44:433-40.

30. Kikic I, Vecchione F. Supercritical impregnation of polymers. Curr Opin Solid State Mater Sci. 2003; 7(4-5):399-405.

31. Braga MEM, Pato MTV, Costa Silva HSR, Ferreira EI, Gil MH, Duarte CMM, de Sousa HC. Supercritical solvent impregnation of

ophthalmic drugs on chitosan derivativez. J Supercrit Fluids. 2008; 44:245-57.

32. Alessi P, Kikic I, Cortesi A, Fogar A, Moneghini M. Polydimethylsiloxanes in supercritical solvent impregnation (SSI) of polymers. J Supercrit Fluids. 2003; 27:309-15.

33. RAPS, CPF products. www.raps.de

34. Weidner E, Petermann M, Knez Z. Multifunctional composites by high pressure spray precesses. Curr Opin Solid State Mater Sci. 2003; 7:385-90.

35. Rodrigues M, Peirco N, Matos H, Gomes de Azevedo E, Lobato MR, Almeida AJ. Microcomposites theophylline/hydrogenated palm oil from a PGSS process for controlled drug delivery systems. J Supercrit Fluids. 2004; 29:175-84.

36. Weidner E, Brandin G, Wendt T, Nur für Erwachsene, Feines Schokoladenpulver mit mikroverkapseltem Kirschwassser. DEI 10 (2005) 28-29. ISSN:0343-9704.

37. Sievers RE, Huang ETS, Villa JA, Engling G, Brauer PR. Micronization of water-soluble or alcohol-soluble pharmaceuticals and model compounds with a low-temperature bubble dryer®. Journal of Supercritical Fluids. 2003; 26(1):9-16.

38. Reverchon E, Antonacci A. Drug-polymer microparticles produced by supercritical assisted atomization. Biotechnol Bioeng. 2007; 97:1626-37.

39. Shariati A, Peters CJ. Recent developments in particle design using supercritical fluids. Curr Opin Solid State Mater Sci. 2003; 7(4-5):371-83.

40. Wang Y, Wang Y, Yang J, Pfeffer R, Dave R, Michniak B. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. Powder Technol. 2006; 164:94-102.

41. Wang Y, Dave RN, Pfeffer R. Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process. J Supercrit Fluids. 2004; 28:85-99.

42. Whitaker MJ, Hao J, Davis OR, Serhatkulu G, Stolnik-Trenkic S, Howdle SM, Shakesheff KM. The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying. J Controll Rel. 2005; 101:85-92.

43. Hanna M, York P. Method and apparatus for the formation of particles. WO9501221. 1995.

44. Falk R, Randolph TW, Meyer JD, Kelly RM, Manning MC. Controlled release of ionic compounds from poly (L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent. J Controll Rel. 1997; 44:77-85.

45. Mattea F, Martín A, Cocero MJ. Co-precipitation of β-carotene and polyethylene glycol with compressed CO_2 as an antisolvent: effect of temperature and concentration. Ind Eng Chem Res. 2008; 47:3900-6.

46. Miguel F, Martín A, Mattea F, Cocero MJ. Precipitation of lutein and coprecipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. Chem Eng Proc 2008; 47:1594-602.

47. Martín A, Mattea F, Gutiérrez L, Miguel F, Cocero MJ. Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical antisolvent process. J Supercrit Fluids. 2007; 41:138-47.

48. Varona S, Martín A, Cocero MJ. Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. Chem Eng. Proc. 2009; 48:1121-28.

49. Perrut M, Jung J, Leboeuf F. Method for obtaining particles from at least a water soluble product. US2004110871. 2004.

50. Jung J, Leboeuf F, Perrut M. Preparation of inhalable protein particles by scf-emulsion drying, in: Proceeding of 6th International symposium on Supercritical Fluids, Versalles, France. 2003; p.1.837.

51. Chattopadhyay P, Shekunov BY, Seitzinger J, Huff RW. US6998051 B2. 2006.

52. Shekunov BY, Chattopadhyay P, Seitzinger J, Huff RW. Nanoparticles of poorly water-soluble drugs prepared by supercritical fluid extraction of emulsions. Pharm Res 2006; 23:196-204.

53. Mattea F, Martín A, Jaeger P, Eggers R, Cocero MJ. Behavior of an organic drop during the supercritical extraction of emulsion. AIChE J (en prensa, 2009).

54. Chattopadhyay P, Huff RW, Shekunov BY. Drug encapsulation using supercritical fluid extraction of emulsions. J Pharm Sci. 2006; 95:667-79.

55. DellaPorta G, Reverchon E. Nanostructured microspheres produced by supercritical fluid extraction of emulsions. Biotechnol Bioeng. 2008; 100:1020-33.

56. Mattea F, Martín A, Cocero MJ. Supercritical anti solvent precipitation of carotenoids from an emulsion. J Supercrit Fluids. 2009; 51:238-47.

Innovaciones en el envasado de los alimentos. Envasado activo y envasado inteligente

Dr. Joaquín Gómez Estaca, Dr. Rafael Gavara Clemente y Dr. Ramón Catalá Moragrega

Introducción

En una época de cambios como la actual, en la que están sucediendo importantes mutaciones en el escenario mundial en todos los ámbitos, los envases no han quedado al margen. Globalización, internacionalización, apertura de mercados, estabilidad económica en las áreas geográficas de mayor desarrollo, junto a factores sociales como el envejecimiento de la población, mayor poder adquisitivo, cambios en las formas de convivencia, tamaño de los hogares y usos familiares, cambios de usos y costumbres alimentarias, etc., están haciendo surgir nuevas formas de envases y tecnologías de envasado.

Las innovaciones son continuas, fruto de los muchos esfuerzos y recursos que cada día más dedican a la investigación y desarrollo los sectores productores y usuarios de envases y embalajes, tratando de satisfacer las demandas de los consumidores en unas sociedades cultural y económicamente avanzadas. En ese contexto, el envase ha pasado de ser entendido como un mero recipiente cuyo fin básico es contener el alimento actuando como barrera pasiva que separa el contenido del medio ambiente, a desempeñar un papel activo en el mantenimiento o incluso mejora de la calidad del alimento envasado.

Se entiende como envase activo un sistema alimento/envase/entorno que actúa de forma coordinada para mejorar la salubridad y la calidad del alimento envasado y aumentar su vida útil (*Catalá y Gavara, 2001*). En general, el objetivo del envase es proteger al alimento envasado contra los agentes responsables de la alteración física, química, enzimática o microbiológica, mediante interacciones beneficiosas creadas entre el alimento y el envase. Con el envase activo se trata de corregir las deficiencias del sistema de conservación, con diversas formas de actuación, bien sobre la composición de la atmósfera interior o con sustancias que emiten o retienen gases y vapores, o bien modificando la composición y/o características del alimento, liberando sustancias de acción positiva sobre el alimento o absorbiendo/reteniendo componentes indeseables.

Junto al término envase activo aparece generalmente el de envase inteligente. Ambos términos se han usado en muchas ocasiones como sinónimos, cuando realmente se refieren a conceptos diferentes, aunque muy próximos y que pueden ser en muchos casos complementarios. Se entiende por envase inteligente un envase capaz de efectuar una función inteligente como detectar, mostrar, registrar o comunicar una información sobre el esta-

do del alimento envasado o el entorno de éste, para facilitar una toma de decisiones que permita extender la vida útil, aumentar la seguridad, mejorar la calidad o prevenir posibles problemas. El envase inteligente implica siempre el sistema completo alimento/envase/entorno, de forma que el envase analiza el sistema, procesa la información y la presenta, sin ejercer generalmente ninguna acción. Por el contrario, el envase activo realiza la acción. Ambas funciones pueden ser, por tanto, complementarias y no excluyentes (*Yam et al, 2005*).

La utilización de los envases activos e inteligentes en los países de la Unión Europea está respaldada por el reciente Reglamento CE Nº 450/2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimento. En su artículo 3 define los materiales y objetos activos como los destinados a prolongar la vida útil o mejorar el estado del alimento envasado. Están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán sustancias en el alimento envasado o en su entorno o absorberán sustancias del alimento o de su entorno. También la misma reglamentación distingue y define el concepto de materiales y objetos inteligentes en contacto con alimentos como aquellos que controlan el estado de los alimentos envasados o de su entorno (CE Nº 450/2009).

Los envases activos e inteligentes han ido introduciéndose comercialmente y ya son muchos y muy diversos los usos, sobre todo en Japón, Australia y Estados Unidos. En Europa la difusión de estas tecnologías ha sido mínima hasta fechas recientes, si bien cabe esperar una rápida expansión. Sin duda, las tecnologías de envases activos e inteligentes constituyen ya en la actualidad una alternativa plenamente aceptada, con excelentes perspectivas de futuro para la mejora de la calidad y aumento de la vida útil de los alimentos industrializados.

En las presentes notas se comentan brevemente las tecnologías de mayor interés y su difusión actual.

Tecnologías de envases activos

Desde los inicios del desarrollo de estas tecnologías la forma más usual para introducir el elemento activo en el sistema ha sido la utilización de una pequeña bolsa, sobre o etiqueta, conteniendo dicho principio, por ejemplo, hierro para eliminar el oxígeno residual en el envase, o gel de sílice para eliminar la humedad. La bolsa se construye con material polimérico suficientemente permeable para permitir la liberación y/o actuación del principio activo, pero sin que entre en contacto, en general, con el producto. Por supuesto deben usarse materias activas que no pongan en peligro la salubridad del producto envasado. Actúan así la mayor parte de los sistemas que han constituido la primera generación de envases activos y aún sigue siendo una técnica ampliamente implantada *(Rooney, 1995)*.

Una alternativa ya ampliamente utilizada para algunos productos y que sin duda se generalizará en el futuro es la introducción del principio activo en el propio material de envase, bien formando parte del polímero, bien incorporado por medio de algún componente del mismo *(Kruif et al, 2002)*. Podría decirse que se hace un aprovechamiento positivo de los mecanis-

mos de transferencia de masa –migración, sorción y permeabilidad–; en lugar de ceder al alimento sustancias indeseables se ceden sustancias con efecto beneficioso, previamente incorporadas al mismo, o bien elimina por sorción componentes indeseables del alimento. Esta es, sin duda, la forma más atractiva para el consumidor, que así no encuentra nada extraño en el interior del envase que pueda llamarle la atención y hacerle dudar sobre la calidad sanitaria del alimento que va a consumir y, así mismo, simplifica la tecnología de envasado al eliminar la operación de introducción del sistema activo en el envase.

Se han propuesto muy diversas formas de envases activos para el control de diferentes problemas de deterioro o alteración de la calidad de los alimentos, tales como control de gases en el interior del envase, oxígeno, dióxido de carbono, etileno…, regulación de la humedad, adición de conservantes químicos, incorporación de aromas, eliminación de olores extraños y sustancias indeseables, o control de la contaminación microbiológica (*Rooney, 1995*).

Como materiales de base para el desarrollo de envases activos se ha utilizado papel y cartón, plásticos, metales o combinaciones de ellos, pero, en general, los desarrollos de tecnologías de envases activos emplean materiales plásticos. En cuanto a la naturaleza de los agentes activos que pueden ser objeto de interés es muy diversa: ácidos orgánicos, enzimas, nutrientes, extractos naturales de plantas, componentes aromáticos, bactericidas, fungicidas, antioxidantes, etc., con los que se trata de desarrollar envases activos para el control de muy diferentes problemas de deterioro o mejora de la calidad de los alimentos *(Rooney, 1995; Ahvenainen, 2003; Ozdemir y Floros, 2004; López Rubio et al, 2004; Almenar et al, 2006; Catalá et al, 2008)*.

Se presenta a continuación información básica sobre tecnologías de envases activos de interés e implantación comercial.

Envases activos para el control de oxígeno

El oxígeno es el reactivo necesario para la mayor parte de los procesos metabólicos y bioquímicos que tienen lugar en los alimentos. La presencia de altos niveles de O_2 da lugar a crecimiento de microorganismos, enranciamiento de componentes grasos, deterioro enzimático, oxidación de vitaminas o pérdida de aromas, causando en conjunto la reducción de la vida útil de los alimentos. Junto al oxígeno, la presencia de especies reactivas tales como los radicales libres, superóxido, hidróxilo, así como oxígeno singlete que se generan en los alimentos por diferentes mecanismos *(Kruk, 1998)* pueden estar implicados en reacciones de oxidación de lípidos y otros componentes del alimento, contribuyendo a su deterioro.

La presencia de oxígeno en los alimentos envasados puede limitarse en general con aplicación de vacío o envasado en atmósfera modificada, junto con la utilización de materiales de envase de alta barrera. No obstante, no siempre se consigue eliminar el oxígeno por completo de una manera efectiva, bien por su presencia residual o por permeación desde el exterior a través de la pared del envase.

La aplicación de absorbedores de oxígeno ("scavengers") es una de las mejores for-

mas de control directo del oxígeno presente en el espacio de cabeza del envase. El uso de sistemas absorbedores de oxígeno en combinación con la tecnología de envasado adecuada puede dar excelentes resultados consiguiendo reducirlo a niveles muy bajos (incluso < 0,01 %), imposibles de alcanzar en las líneas de envasado por aplicación de vacío o incorporación de gases.

Las tecnologías de absorción de oxígeno desarrolladas se basan en la oxidación de compuestos como polvo de hierro, ácido ascórbico, dienos fotosensibles, enzimas (glucosa oxidasa y etanol oxidasa), ácidos grasos insaturados, H_2-paladio, etc. *(Eskin y Robinson, 2001)*, materiales normalmente combinados e introducidos en bolsitas o etiquetas adhesivas de un material permeable al oxígeno, o bien lacados, dispersos, embebidos o inmovilizados en el propio material de envasado (usualmente en una de las capas de los complejos). Los sistemas basados en polvo de hierro mezclado con ácido ascórbico o enzimas son los más utilizados. Este polvo de hierro, en función de su cantidad, absorbe entre 5 y 2.000 ml de oxígeno, siendo más efectivo en combinación con materiales de envasado de buena barrera al oxígeno, que evitan su saturación y pérdida de eficacia. Sistemas comerciales absorbedores de O_2 en bolsas o etiquetas son, entre otros: Ageless® (Mitsubishi Gas Chemical, Japon), Freshilizer® (Toppan Printing, Japón), Vitalon (Toagosei Chem. Industry Co. Ltd., Japón), FreshMax (Multisorb Technologies, EE.UU.), ATCO (EMCO Packaging Systems, UK). Absorbedores de oxígeno también se encuentran ya en el mercado formando parte de los materiales de envase, constituyendo sistemas que actúan con buena efectividad, además de eliminar riesgos de rotura accidental o ingestión de contenido presentados por las bolsas. Sistemas comerciales bien introducidos son Darfresh® (Cryovac, Sealed Air Corporation, EE.UU.), Oxguard (Toyo Seikan Kaisa Ltd., Japón), Shelfplus O_2 (Ciba Speciality, Suiza), ZerO_2 (Food Science Australia), N/A (Chevron Chemical, USA) *(Hurme et al, 2002; Catalá et al, 2008; Coma, 2008; Day, 2008).*

Emisores/absorbedores de dióxido de carbono

Los emisores/absorbedores de dióxido de carbono encuentran aplicación para el control del CO_2 en la atmósfera de envasado. El aumento de la cantidad de CO_2 en el interior del envase resulta muy beneficioso para prolongar la vida útil de determinadas frutas y verduras, dado el retraso de su respiración, reducción de cambios de color, mejora de textura y retraso del desarrollo de bacterias, mohos y levaduras. La emisión de cantidades de dióxido de carbono del 20% o más, lleva a supresión del crecimiento microbiano, además de evitar el colapso del envase o un vacío parcial causado por el consumo de O_2, dada la alta tasa de respiración del producto hortofrutícola o el uso de un absorbedor de O_2.

Mediante la utilización de sobres con bicarbonato sódico se consigue generar el CO_2 necesario para controlar la respiración del producto. Estos sobres suelen prepararse con materiales sintéticos altamente impermeables al CO_2 como el PVdC. En ocasiones, se emplean los sobres con una doble función, es decir, la emisión del dióxido de carbono se acom-

paña de la absorción de oxígeno mediante el uso de carbonato ferroso o la mezcla de ácido ascórbico y bicarbonato sódico. Comercialmente se encuentran sobres de doble función como los producidos por Ageless® (Mitsubishi Gas Chemical, Japón), Freshmax® (Multisorb Technologies, EE.UU.), Freshilizer® (Toppan Printing, Japón).

Algunas frutas y verduras presentan tasas de respiración altas, que generan en el interior del envase concentraciones de CO_2 excesivas con la consiguiente aparición de olores anómalos, cambios de color, rotura de tejidos, etc. Para reducir estos niveles del gas se utilizan absorbedores de CO_2, cuyo agente activo es el hidróxido cálcico o el carbón activo. La mayor parte de los sistemas anteriormente citados actúan en la práctica de forma dual por emisión o absorción del CO_2 *(Coma, 2008)*.

Absorbedores de etileno

El etileno, hormona vegetal producida durante la maduración de frutas y verduras, es la encargada de modificar su calidad y longevidad por aumento de la tasa de respiración, ablandamiento de tejidos y aceleración de la senescencia. Además, promueve la degradación de la clorofila, dando lugar a una serie de desórdenes fisiológicos como manchas marronáceas en lechugas y amarillamiento de guisantes, sabor amargo en zanahorias o endurecimiento en los espárragos.

La incorporación de absorbedores de etileno en el envasado de productos hortofrutícolas está dando buenos resultados para prolongar su vida útil, facilitando por tanto su comercialización y exportación. Actualmente, las formas usuales de incorporar estos absorbedores es contenidos en el interior de una bolsita, o bien integrados en el propio material de envase o en la tinta de impresión.

Existen una gran cantidad de sustancias capaces de absorber etileno. Entre ellas, carbón activo, zeolitas o permanganato potásico. El permanganato (4-6%) embebido en un sustrato inerte como gel de sílice, alúmina o arcilllas es la sustancia base de la mayoría de los absorbedores de etileno comerciales. Este compuesto, que se presenta en el mercado en bolsitas, muestra una actividad y efectividad dependientes del área de superficie de la bolsa y de su cantidad. Su funcionamiento se basa en la oxidación del etileno a acetato y etanol, cambiando de color morado a marrón al alcanzar el estado de saturación. Aplicaciones comerciales de bolsitas absorbedoras de etileno son N/A (Stenda Life System, EE.UU.), Green Pack (Rengo Co., Japón), N/A (Ethylen Control Incorporated, USA), Power Pellet® (Ethylene Control Inc., EE.UU.), Retarder (Bioconservación, España). Como alternativa, también se comercializan absorbedores de etileno basados en carbón activo, como Neupalon (Sekisui Jushi Ltd., Japón), Sendo-Mate (Mitsubishi Gas Chemical Co., Japón), Hatofresh (Honshu Paper Ltd., Japón) *(Almenar et al, 2006; Day, 2008).*

Como alternativa al uso de absorbedores de etileno en bolsitas se está extendiendo la incorporación de dichos absorbedores en una matriz polimérica. Así, se introducen arcillas y zeolitas homogéneamente dispersas en concentraciones en torno al 5% en materiales de uso común en el envasado de alimentos como polietileno

o polipropileno. Al parecer, la acción de estos materiales puede deberse tanto a la captación del etileno por los materiales finamente dispersos en el polímero como a su pérdida por los poros generados por las finas partículas que pueden alterar las propiedades de intercambio gaseoso. El etileno difunde más rápido a través de los poros generados que por la permeabilidad del propio material, además estos poros hacen decrecer el CO_2 y aumentar el O_2 rápidamente, factores favorecedores de la disminución del etileno, afectando los tres conjuntamente la vida útil del producto envasado. Se están comercializando diferentes materiales con esta tecnología, entre muchos otros, Evert-Fresh (Evert-Fresh Coorporation, EE.UU.), Peakfresh® (Peakfresh Products, Australia), BO film (Odja Shoji Co. Ltd., Japón), ABC film (Asahi Glass Co, EE.UU.), Bio-fresh (Grofit Plastics, Israel) *(Almenar et al, 2006; Day, 2008).*

Envases activos para el control de la humedad

El control de la humedad en los alimentos envasados es otra aplicación de interés práctico de los envases activos. Se emplean ampliamente absorbedores de humedad para el control de la condensación de agua en el interior del envase de carnes, pescados o productos vegetales frescos, que puede afectar a la calidad y desvalorizar su presentación comercial. En los productos vegetales, como consecuencia de la transpiración se genera en el interior del envase una acumulación de vapor de agua que, dependiendo del producto, puede desarrollar cambios no deseados como endurecimiento por desecación, absorción de humedad en la superficie, generación y acumulación de agua líquida, y condensación sobre el material de envasado, con el consiguiente efecto en la presentación del producto que puede llevar a rechazo por parte del consumidor. Asimismo, en carnes y pescados frescos es común el exudado de líquidos que se acumulan en el fondo de los envases con los consiguientes problemas de crecimiento microbiano.

Se han desarrollado diferentes sistemas para controlar los inconvenientes asociados a la presencia de humedad. Con materiales desecantes, como gel de sílice, óxido de calcio, cloruro cálcico, arcillas naturales y almidón modificado, se consigue la disminución del contenido acuoso superficial de los productos, controlando así el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias. Son aplicaciones comerciales bolsitas desecantes como Tyvek, Natrasorb, Minipax, Strippax, DesiPak, DesiView (United Desiccant, EE.UU.), Sorb-it, Trisorb® (Multisorb Technologies Inc., USA), Peaksorb (Peakfresh Products, Australia). También se han desarrollado materiales que básicamente consisten en un polímero superabsorbente localizado entre dos capas de polímero microporoso, siendo las sales de poliacrilato y los copolímeros de almidón los más utilizados. Estos dispositivos se suelen colocar en las bandejas de comercialización del producto fresco *(Almenar et al, 2006)*.

Para evitar la condensación de la humedad sobre el material de envase y la formación de gotas que desvalorizan la presentación comercial del producto, se incorporan a los materiales plásticos que conformarán el envase antes de su extrusión aditivos antivaho tales como etoxilatos no iónicos o monoglicéridos. Estos

aditivos disminuyen la tensión interfacial entre polímero y agua condensada, logrando que las gotas condensen en la superficie del plástico hasta que finalmente se unen formando una fina película continua. Esto permite al consumidor ver claramente a través del material el contenido del envase, aunque no influye en el producto por no afectar a la cantidad de agua líquida del interior del envase. En el mercado con tal fin aparecen, entre otros, Atmer (Uniquema and Ciba Specialty Chemicals, UK) y Techspere (Techmer PM, EE.UU.) *(Day, 2008)*.

Envases activos antimicrobianos

Sin duda, la tecnología de envasado activo que recibe la mayor atención es el envase antimicrobiano. Como es bien sabido, el desarrollo de microorganismos es la principal causa de deterioro de los alimentos. Para su control, se utilizan habitualmente diferentes sustancias antimicrobianas, aplicadas directamente sobre el producto, como complemento o alternativa a las técnicas físico-químicas de conservación. No obstante, la aplicación directa de éstos sobre la superficie del producto mediante pulverización o inmersión puede ser poco efectiva, ya que el agente ejerce un efecto limitado sobre la microbiota superficial debido a su rápida difusión al interior del producto. La incorporación de las sustancias antimicrobianas al envase puede ser, sin duda, una alternativa para mantener su actividad de forma efectiva. Las aplicaciones potenciales de los envases activos antimicrobianos les han hecho objeto de gran atención por parte de muchos grupos de investigación, y ya hay desarrollados diferentes sistemas comerciales para la conservación de algunos alimentos.

La acción antimicrobiana en los envases activos puede estar basada en la emisión de sustancias volátiles al espacio de cabeza del envase o en la migración del componente activo del material de envase al alimento envasado; los polímeros antimicrobianos permiten una lenta liberación de sustancias bactericidas, fungicidas o aditivos antimicrobianos compatibles con los alimentos. Otra opción es la inmobilización química o física del agente activo en el material de envase, de forma que ejerza su acción por contacto directo del producto con la superficie del envase. Asimismo, existen polímeros que presentan por sí mismos capacidad antimicrobiana, como es el caso del quitosano, o bien capacidad antimicrobiana creada por la modificación de la superficie, como son algunas poliamidas tratadas por irradiación *(Appendini y Hotchkiss, 2003; Han, 2005; Coma, 2008)*,

Las sustancias volátiles antimicrobianas comunes como SO_2, ClO_2 o etanol incorporadas al material de envase permiten controlar el crecimiento de hongos y bacterias; el SO_2, incorporado al material como metabisulfito, es el más utilizado por su efectividad frente al crecimiento de mohos en frutas. Otros compuestos volátiles que han recibido atención son algunos componentes de alimentos; compuestos como el hexanal, 1-hexenol, benzoato de metilo, 2-nonanona, entre otros componentes de algunos aromas de alimentos, inhiben el crecimiento de hongos; la 2-nonanona, volátil propio del aroma de la fresa, muestra propiedades fungistáticas que aumentan la vida útil

de fresas y manzanas *(Almenar et al, 2007)*.

Un amplio número de sustancias no volátiles de acción antimicrobiana pueden incorporase a materiales poliméricos formando parte como componentes de los mismos, de donde pueden migrar al alimento envasado, o bien inmovilizando la sustancia activa sobre el material de envase, de forma que la acción se ejerce por contacto del producto envasado. Son muchas las sustancias antimicrobianas estudiadas: ácidos orgánicos débiles –acético, benzoico, sórbico, cítrico, propiónico, entre otros– o sus sales; enzimas –lisozima, glucosa oxidasa–; bacteriocinas –nisina, pediocina–; fungicidas sintéticos –imazalil–; metales –plata, cobre, zirconio–; extractos naturales de plantas –romero, tomillo, orégano–, etc. *(Appendini y Hotchkiss, 2002)*. En general, los materiales desarrollados utilizan como base polímeros sintéticos convencionales, mayoritariamente poliolefinas, pero actualmente hay un interés creciente en la utilización de biopolímeros. Biopolímeros basados en polisacáridos como celulosa y derivados, almidón, alginatos, carragenatos y quitosanos, y también derivados de proteínas como zeína de maíz, gluten de trigo, caseína, aislados de soja, o colágeno y gelatina, entre otros, han sido base para el desarrollo de biopolímeros activos antimicrobianos *(Catalá et al, 2008)*.

Envases inteligentes

Los envases inteligentes disponen de algún indicador interno o externo que detecta, muestra o comunica una información sobre aspectos del estado del alimento envasado, del propio envase o del entorno de éste, para facilitar una toma de decisiones que permita extender la vida útil, aumentar la seguridad, mejorar la calidad o prevenir posibles problemas.

En la práctica, cualquiera que sea la forma que tome un envase inteligente, consta de un dispositivo o forma de presentación, adquisición o procesado de datos, un sistema de comunicación de la información y un dispositivo receptor de la misma que permita la toma de decisiones. Todas estas funciones pueden incluso estar en un sistema único. Generalmente, el sistema inteligente está constituido por una etiqueta o placa situada sobre el propio envase que facilita la información y la comunicación. Hay dos formas básicas de envases inteligentes: a) sistemas portadores de datos –etiquetas de códigos de barras o placas de identificación por radio frecuencia– que se usan para almacenar o transmitir datos, y b) indicadores de incidencias en el envasado –indicadores tiempo/temperatura, indicadores de gases o biosensores– que permiten el control del medio y del producto envasado *(Yam et al, 2005)*.

Sistemas portadores de datos

El código de barras es, con mucho, la forma más simple y extendida de sistema inteligente. Actualmente su aplicación es general para la comercialización de todo tipo de productos envasados, pero la información que puede facilitar es limitada, aun con las nuevas formas de códigos de barras desarrollados, tales como los sistemas RSS expandido, PDF 417 o de simbología compuesta.

Las etiquetas o placas de identificación por radio frecuencia (RFID) son una forma más avanzada de almacenamiento e identificación automática de datos, que está empezando a ser aplicada en los productos envasados. Un sistema RFID consta de un emisor que emite ondas de radio frecuencia para captar la información de una etiqueta o placa situada en el envase, que es transferida a un sistema de lectura y elaboración de la información. Las placas o dispositivos RFID pueden ser, bien etiquetas pasivas que contienen la información y que se activan por la energía que suministra el lector, o pueden disponer de un circuito o microchip propio que emite las señales al lector. Cualquiera que sea el sistema, estos dispositivos no requieren la visualización por el lector para la transferencia de datos y pueden ser leídas con gran rapidez. Los dispositivos de RFID pueden almacenar gran cantidad de información comercial del producto, pero también información técnica, como las incidencias térmicas, características nutricionales del alimento o instrucciones de uso. La implantación de RFID en los envases puede aportar soluciones de gran interés práctico, como son el control de "stocks" y localización de productos envasados en almacenes y aun más el control de compra y cobro en puntos de venta.

La implantación de la RFID para el control de envases es en la actualidad incipiente, tanto por su precio que es aún muy elevado para ser asumido por la mayor parte de productos de consumo, como por dificultades técnicas para su posición e identificación aun no bien resueltas *(Clarke 2008)*. Las posibilidades que porta esta tecnología son realmente prometedoras y cabe esperar que en muy pocos años la identificación por radio frecuencia esté tan implantada en los envases como lo está actualmente el código de barras.

Indicadores de incidencias en el envasado

Otra línea de desarrollo de envases inteligentes para alimentos que suscita gran interés son los genéricamente calificados como indicadores de incidencias en el envasado. Así, la temperatura es uno de los factores medio ambientales de mayor incidencia en la conservación de los productos envasados. Es una constante aspiración de los consumidores conocer si un alimento congelado o refrigerado, por ejemplo, ha mantenido adecuadamente la temperatura durante todo el almacenamiento. Se trabaja activamente en el desarrollo de indicadores de tiempo-temperatura, con la finalidad de servir de alerta a los consumidores sobre las incidencias térmicas que ha sufrido un producto envasado durante el almacenamiento y comercialización, y ya hay en el mercado algunos de estos indicadores con buenos resultados prácticos, tales como Fresh Check® Indicator (Temptimecorp, EE.UU.), TT SensorTM (Avery Dennison, EE.UU.), Monitor Mark (3M, EE.UU.), CheckPoint (Vitsab International, Suecia), Food Sentinel SystemTM (SIRA Technologies, EE.UU.). En general están constituidos por etiquetas autoadhesivas que contienen un polímero sensible al tiempo y a la temperatura, que oscurece gradualmente y de forma irreversible con la exposición acumulativa a la temperatura *(Taoukis, 2008)*.

La composición del gas de espacio de cabeza de los envases se ve modificada constantemente como consecuencia de la actividad del propio alimento, de la natu-

raleza del envase o de las condiciones ambientales. El conocimiento de la evolución de dicha composición puede ser, por tanto, un buen indicador de las modificaciones de la calidad y vida útil del alimento envasado. Se comercializan ya indicadores, sobre todo de la concentración de oxígeno, vapor de agua o dióxido de carbono, aunque todavía su desarrollo es incipiente.

Otros desarrollos de envases inteligentes que están presentando resultados de interés práctico son los indicadores de contaminación microbiológica. Así, Spoiling Indicator (Avery Dennison, EE.UU.) está constituido por una etiqueta con un complejo con Pd que reacciona con volátiles que contienen compuestos con S o N que se forman en los procesos de alteración microbiológica; al reaccionar el complejo induce un cambio de ligando y crea una fluorescencia provocando un cambio de color de la etiqueta de rosa a amarillo indicando la alteración del producto. Otro desarrollo de interés es el FreshTagR (Cox Technology, EE.UU.), constituido por una etiqueta con colorante no tóxico indicador de presencia de aminas generadas por la alteración de pescado. La etiqueta tiene un pequeño orificio en el reverso por el que los vapores difunden a la etiqueta y reaccionan con el colorante, cambiando de color gradualmente, hasta indicar que el producto debe ser desechado *(Smolander, 2008).*

Aunque aún en estado de desarrollo muy incipiente, una forma de envase inteligente que suscita el mayor interés es el biosensor. De forma general, un biosensor es un mecanismo analítico compacto que detecta, registra y transmite información referente a las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el alimento envasado. El sistema consta de dos componentes, un bioreceptor que reconoce la presencia de un analito determinado y un transductor que identifica la señal y la convierte en identificable. El bioreceptor es generalmente un material biológico, tal como enzimas, hormonas, microorganismos, ácidos nucleicos, etc., específicos de la reacción que tiene lugar. Los biosensores se caracterizan sobre todo por su especificidad, sensibilidad y fiabilidad, por lo que pueden servir para alertar al consumidor del estado sanitario o nutritivo del producto envasado antes de su consumo y dar incluso una indicación del final de la vida útil del producto envasado. La idea es sin duda muy atractiva, aunque aún se está lejos del desarrollo comercial.

En conclusión, muchos son los frentes en los que se trabaja activamente y en los que se manifiesta la innovación en los envases. Si bien no cabe esperar desarrollos revolucionarios a corto plazo, aunque nunca son descartables, sí estamos frente a un desarrollo e innovación continuo que seguirá en los próximos años, tratando de contribuir a la mejora de la alimentación y, por tanto, de nuestra calidad de vida.

Bibliografía

Ahvenainen R. Active and intelligent packaging, an introduction. En Novel food packaging techniques. Ahvenainen R editor. Woodhead Publ Ltd, Cambridge, Gran Bretaña. 2003.

Almenar E, Del Valle V, Catalá R, Gavara R. Active package for wild strawberry fruit (Fragaria Vesca L). J Agric Food Chem. 2007; 55(6):2240-5.

Almenar E, Hernández P, Lagarón JM, Catalá R, Gavara R. Advances in packaging technologies for fresh fruits and vegetables. En

Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops. Noureddine B y Norio S editores. Research Signpost, Kerala, India. 2006; pp. 87-111.

Appendini P, Hotchkiss JH. Rewiew of antimicrobial food packaging. Innovative Food Sc & Emerging Tech. 2003; 3:113-26.

Catalá R, Gavara R. Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados. Arbor CLXVIII. 2001; 661:109-27.

Catalá R, Hernández P, Gavara R. Active environmentally compatible food packaging. En Environmentally-Compatible Food Packaging. Emo Chiellini, editor. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Gran Bretaña. 2008; pp. 419-38.

Catalá R, Hernández P, López-Carballo G. Materiales para el envasado de frutas y hortalizas con tratamientos mínimos. Horticultura Internacional nº 69 extra. 2009; 60-5.

CE 450/2009: Commission Regulation EC No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union L135/3.

Clark R. The influence of product and packaging. Characteristics on passive RFID readability. En Smart packaging Technologies. Kerry J y Butler P, editores. John Wiley & Sons Ltd. Gran Bretaña. 2008; pp. 167-95.

Coma V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. Meat Science. 2008; 78:90-103.

Day BP. Active Packaging of Food. En Smart Packaging Technologies. Kerry J y Butler P, editores. John Wiley & Sons Ltd. Gran Bretaña. 2008; pp. 1-18.

Eskin NAM, Robinson DS. Food shelf life stability: chemical, biochemical and microbiological changes. CRC Pres, Boca Raton FL, Estados Unidos. 2001.

Floros JD, Dock LL, Han JH. Active packaging technologies and applications. Food, Cosmetics and Drug Packaging. 1997; 20(1):10-7.

Han JH. Antimicrobial Packaging Systems. En Innovations in Food Packaging. Han editor, Elsevier Academic Press, Londres, Gran Bretaña. 2005; pp. 80-101.

Hurme E, Sipiläinen-Malm T, Ahvenainen R, Nielsen T. Active and intelligent packaging. En Minimal Processing Technologies in the Food Industry. Ohlsson T & Bengtsson N editores. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, Gran Bretaña. 2002; pp. 86.

Kruif ND, Beest MV, Rijk R, Sipilainen MT, Paseiro LP Meulenaer: Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. Food Additives & Contaminants. 2002. 19:144-62.

Kruk I. Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species. En The Handbook of Environmental Chemistry. Reaction and Processes. Part I. Hutzinger O y Kruk I, editores. Springer, New York, Estados Unidos. 1998.

López-Rubio A, Almenar E, Hernández P, Lagarón JM, Catalá R, Gavara R. Overview of Active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Applications. Food Review. International. 2004; 20(4):357-86.

Ozdemir M, Floros JD. Active Food Packaging Technologies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2004; 44(3):185-93.

Rooney ML. Overview of active food packaging, in Active Food Packaging. En Rooney ML editor. Editorial Blakie Academic & Professional, Glasgow, Gran Bretaña. 1995.

Smolander M. Freshness Indicator for Food Packaging. En Smart Packaging Technologies. Joseph Kerry y Paul Butler, editores. John Wiley & Sons Ltd. Gran Bretaña. 2008.

Taoukis PS. Application of time-temperature integrators for monitoring and management of perishable product quality in the cold chain. En Smart Packaging Technologies. Kerry J y Butler P, editores. John Wiley & Sons Ltd. Gran Bretaña. 2008; pp. 11-123.

Yam KL, Takhistov PT, Miltz J. Intelligent packaging: Concepts and applications. J Food Science. 2005; 70(1):R1-R10.

Evaluación de riesgos emergentes en seguridad alimentaria

Dr. Miguel Prieto Maradona, Dra. Rosa Capita González y Dr. Carlos Alonso Calleja

Introducción

La preocupación por la alimentación y la salud es una característica de nuestro tiempo y nuestra sociedad. Esta preocupación ha ido paradójicamente en aumento al mejorar la disponibilidad de alimentos, las condiciones sanitarias, el conocimiento científico, el bienestar y la esperanza de vida. Actualmente los problemas alimentarios están relacionados con intensificación, industrialización, globalización y abundancia. En un contexto global, se utiliza el término seguridad alimentaria para hacer referencia a una situación en la que existe una oferta y disponibilidad de alimentos adecuados, estable, sin fluctuaciones estacionales ni escasez, en la que la población tiene acceso a los alimentos o capacidad para adquirirlos, y los alimentos consumidos son inocuos y de calidad. En los países desarrollados, las tres primeras premisas se alcanzan de forma generalizada, por lo que es la inocuidad de los alimentos el aspecto de mayor relevancia y por supuesto el que más preocupa a autoridades sanitarias, industria y consumidor. En los últimos años el consumidor europeo se ha visto expuesto a las crisis o escándalos alimentarios, que han mermado su confianza y cuestionan la seguridad, el control alimentario y las maneras de producción intensiva e industrialización. Paralelamente se ha producido un aumento en las actitudes de rechazo ante los mensajes de las autoridades sanitarias y en la desconfianza ante determinados avances tecnológicos aplicados a la obtención, industrialización y preparación de alimentos.

A la pregunta de si estamos más expuestos a riesgos sanitarios por nuestra alimentación, las autoridades y la industria alimentaria responden que nunca la seguridad alimentaria ha estado más regulada legislativamente ni nunca la calidad y los controles de los alimentos y procesos han sido mayores. Sin embargo, la percepción de muchos consumidores es diferente. Por una parte se puede pensar que la "modernización alimentaria" ha aportado mayor vulnerabilidad en los sistemas de producción de alimentos, que la globalización aumenta los riesgos, o que éstos se perciben más claramente, o que existe un número mayor de individuos susceptibles. También hay sitio para aventuradas hipótesis sistémicas como la existencia de una conspiración industrial *(Cook, 2004)* o el modo de vida opuesto a las "pautas" de la Naturaleza. Según algunos sociólogos *(Beck, 2006)* nuestra sociedad puede definirse como una "sociedad de riesgo" que de manera creciente se preocupa por la seguridad y el futuro, y que pretende evitar o minimizar los peligros, lo cual genera la noción y la percepción acentuada de riesgo e incertidumbre.

Concepto de riesgo

El riesgo es definido como la contingencia o proximidad de un daño. Cuando se utiliza este término en relación con la seguridad alimentaria, se introduce generalmente la noción de probabilidad, y el riesgo se define como una estimación de la probabilidad y severidad de un efecto adverso en la salud en poblaciones expuestas como consecuencia de un peligro en un producto. Por su parte, el peligro es un agente biológico, químico o físico o una condición en un producto que puede causar un daño.

En los alimentos se pueden encontrar una amplia lista de peligros: microorganismos (bacterias, virus, parásitos, hongos), priones, toxinas microbianas o de origen animal y vegetal, contaminantes químicos (terapéuticos, plaguicidas, hormonas, etc.), productos del cocinado, etc. La dieta en su conjunto tiene una influencia obvia sobre enfermedades crónicas tales como la obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular, diversos tipos de cáncer, osteoporosis, etc., pero concurrente con otros factores como los hábitos y el estilo de vida (tabaquismo, sedentarismo, etc.) y no se incluye en este capítulo.

Percepción del riesgo y factores que modifican la percepción del riesgo

La percepción del riesgo por parte de los consumidores es muy variable, y depende en gran parte de factores culturales y psicológicos. Los aspectos subjetivos e irracionales tienen gran importancia e influyen poderosamente en una mayoría de los consumidores. Por supuesto, lo que se percibe puede estar muy alejado de una estimación real del riesgo. Existen además importantes diferencias en percepción que se observan entre individuos, regiones, grupos sociales, políticos, económicos, de edad, y culturales. A manera de ejemplo, estudios realizados en Alemania detectan que la afiliación política influye en la percepción de riesgo *(Roosen, 2004)*. Además se observan cambios temporales, de manera que la percepción evoluciona a lo largo del tiempo. Los medios de comunicación, incluyendo internet, tienen una gran influencia por su capacidad de amplificar los mensajes e incluso distorsionarlos. La percepción del riesgo resulta por tanto un factor irracional y complejo que no necesariamente responde a la situación real.

Entre los principales factores y circunstancias que modifican la percepción del riesgo, el conocimiento científico es un aspecto clave, ya que las personas que poseen información clara, objetiva y exacta perciben el riesgo de manera diferente y lo afrontan con mejor actitud, lo que resalta la importancia de la comunicación del riesgo. Cuando se trata de riesgos tecnológica o científicamente complejos los consumidores perciben el mensaje de distinta manera (priones, organismos modificados genéticamente, irradiación). Si las personas se exponen a un riesgo de manera voluntaria o el riesgo está asociado a su propio comportamiento o prácticas, la percepción disminuye (muchos consumidores lo asocian a la posibilidad de "control del riesgo" y aumenta su aceptación). Por el contrario, si el riesgo posee un potencial catastrófico la percepción de riesgo aumenta. La inmediatez entre la exposición y la aparición de los efectos, el número de perso-

nas expuestas, la equidad y las consecuencias posibles para futuras generaciones son otros aspectos importantes. Existen otros condicionantes menores. El contexto en el que se consumen los alimentos (hogar, trabajo, restaurante, etc.) influye y la sensación de riesgo frente a un producto puede verse incrementada o reducida dependiendo del lugar donde se consume (condiciones de higiene, origen de la comida, preparación). Las autoridades y la industria alimentaria, a través de marcas, distintivos de calidad o información como la fecha de caducidad/consumo preferente y la composición, aportan confianza o seguridad al consumidor. La percepción es también distinta dependiendo del consumidor. Algunos tienen una mayor percepción ante peligros de naturaleza química o tecnológica, mientras otros se preocupan más por los riesgos biológicos, como microorganismos o parásitos. Existen unos consumidores con "sesgo optimista" y amantes del riesgo (risk takers) y otros en los que las creencias influyen decisivamente en su percepción. En general, las mujeres tienden a preocuparse más por la seguridad de los alimentos que los hombres.

Analizar la percepción del riesgo por parte del consumidor implica abordar el tema desde un enfoque multidimensional. Son múltiples los factores que influyen en esa percepción de riesgo y en la seguridad que el consumidor aprecia en un producto.

Cambios en el sector agroalimentario

Los cambios experimentados en el sector agroalimentario en los últimos años son múltiples y en algunos casos constituyen verdaderas revoluciones *(Reza, 1998; Prieto et al, 2008)*. Estos cambios se han producido en producción animal y vegetal y en tecnologías de procesado e industrialización de alimentos, así como en métodos de control, inspección, analítica y epidemiología (por citar algunos ejemplos se puede hacer referencia a la nanotecnología, la clonación o los alimentos modificados genéticamente). Asimismo, la globalización implica la desaparición de las fronteras para personas, alimentos, agentes y noticias. Otro hecho evidente es la complejidad de la cadena alimentaria, que ha obligado a introducir sistemas de trazabilidad. Las crisis y escándalos alimentarios (colza, BSE, dioxinas, aceite de orujo, aceite de girasol, *Salmonella*, *Anisakis*, melamina, etc.) han sido en gran parte responsables de las profundas transformaciones en todos los sectores agroalimentarios.

Análisis del riesgo

El análisis de riesgos se ha convertido en una metodología fundamental en el desarrollo de los estándares de seguridad alimentaria. El análisis de riesgos tiene tres partes diferenciadas que son la evaluación, gestión y comunicación de los riesgos. Para evaluar los riesgos es necesario identificarlos y valorar de manera cualitativa y/o cuantitativa los efectos nocivos para la salud humana, así como la exposición (presencia en la dieta) al peligro que se produce en poblaciones o subpoblaciones (enfermos, ancianos, etc.). Un aspecto importante lo constituye la separación formal de las actividades de gestión, comunicación y evaluación de riesgos. Esta separación e independencia da credibili-

dad a las evaluaciones y reduce los conflictos de intereses. La evaluación del riesgo alimentario supone una estimación científica del riesgo alimentario y de las medidas de control. La gestión de riesgos permite controlar los mismos por medio de medidas a nivel de producción animal o vegetal, en la recolección, cosecha u obtención, mediante procedimientos de manipulación adecuados, sistemas de garantía de la calidad, normas de calidad e inocuidad, restricciones, inspecciones, sanciones, etc. La gestión se plasma mediante una acción legislativa y, en consecuencia, las decisiones políticas se basan no sólo en elementos científicos sino también en una valoración más amplia de los deseos y las necesidades de la sociedad. Requiere un control de la aplicación de la legislación, función que actualmente desempeñan la Comisión Europea, como guardiana de los Tratados, o los Estados miembros en el ámbito de sus competencias. La comunicación de riesgos consiste en el intercambio de información entre todos los sectores interesados. Los resultados del proceso de análisis de riesgos se comunican a los sectores afectados (agroindustria, consumidores). Por medio de esta comunicación los sectores públicos y privados obtienen la información necesaria para prevenir o reducir los riesgos, y pueden participar en el proceso de gestión exponiendo su punto de vista.

En la actualidad, la evaluación del riesgo alimentario implica una serie de premisas. Una característica importante es la iteratividad (figura 1). Una vez el problema se ha planteado, se identifican, seleccionan y aplican las medidas de gestión, y se monitorizan para comprobar su eficacia y, en su caso, reforzarlas, modificarlas, suprimirlas o acompañarlas de otras más eficaces. Los organismos encargados de emitir

Figura 1. Iteratividad en los procesos de evaluación y gestión de riesgos.

dictámenes o evaluaciones científicas, deben funcionar desde los niveles más elevados de independencia, excelencia científica y transparencia. La evaluación es necesariamente multidisciplinar ya que las cuestiones planteadas requieren del concurso de expertos en diferentes materias. Se precisa que el control de riesgos se ejerza de manera integral en toda la cadena alimentaria (from farm to fork). Esta filosofía se basa en el convencimiento de que la seguridad de los alimentos necesita de medidas conjuntas en los diversos eslabones de la cadena alimentaria, y no pueden alcanzarse resultados con medidas de gestión parciales en únicamente algunas de las fases. Otro aspecto es el enfoque preventivo (proactivo), actuando ante los posibles problemas con anticipación y evitando que éstos surjan, si es posible. En los últimos años, las políticas alimentarias han sido fundamentalmente reactivas, implementándose cuando el problema (p. ej. crisis alimentarias) ya ha surgido.

Existen muchas circunstancias condicionantes en la gestión de riesgos, pero el énfasis debe ponerse de manera fundamental en la Salud Pública. Al realizar una evaluación de riesgos, lo correcto es vincular los resultados al establecimiento de un nivel adecuado de protección. No obstante, y como ha sido mencionado anteriormente, debe reconocerse que la selección de las medidas de gestión del riesgo se funda no sólo en la evaluación científica sino también en otros condicionantes que incluyen necesidades y demandas sociales: la protección del medio ambiente, la sostenibilidad, el bienestar animal, la incertidumbre y desconocimiento sobre aspectos científicos (lo que es conocido como principio de precaución), la actitud socio-cultural, la aceptabilidad y la percepción del riesgo por los consumidores, y por último la relación coste-beneficio. En ocasiones, desgraciadamente, incluso las relaciones comerciales y políticas tienen un papel destacado en la toma de decisiones de gestión de riesgo.

Acuerdo SPS

Con el acuerdo de la Organización Mundial del Comercio (OMC), alcanzado en 1994, el mercado internacional de productos, incluidos los alimentos, experimentó un auge considerable. En materia alimentaria se alcanzaron dos importantes acuerdos, el "Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias" y el "Acuerdo sobre Barreras Técnicas al Comercio" ["The Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary (SPS) Measures";"Technical Barriers to Trade (TBT) Agreement"]. El acuerdo SPS es el que cubre el comercio internacional de alimentos y productos agrícolas, incluyéndose animales vivos y plantas, y su objetivo es mejorar la salud de hombre, plantas y animales. Se establece un marco multilateral para el desarrollo, adopción y entrada en vigor de las medidas SPS para minimizar el impacto sobre el comercio, y para conseguir la armonización de las medidas SPS entre países a través de la Comisión del *Codex Alimentarius* en el caso de los alimentos. El acuerdo SPS introduce el concepto de nivel adecuado de protección, también llamado nivel aceptable de riesgo. El acuerdo SPS señala que "no se puede impedir a los miembros la adopción de medidas necesarias para proteger la vida humana, animal o de las plantas, o su

salud, siempre sujetas al requisito de que estas medidas no sean aplicadas de tal manera que constituyan una manera de discriminación arbitraria o injustificable entre miembros donde las mismas condiciones imperan, o constituyan una restricción disfrazada del comercio internacional". Se establecen además las reglas básicas para la normativa sobre inocuidad de los alimentos y salud de los animales y conservación de los vegetales. Cuando los países implantan determinadas medidas sanitarias (incluyendo restricciones al comercio), éstas no deben discriminar de manera arbitraria o injustificable a otros Miembros y además deberán estar refrendadas por criterios científicos (análisis del riesgo).

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)

En el ámbito europeo la Ley Básica Alimentaria (Reglamento CE Nº 178/2002[1]) requiere que las disposiciones legales alimentarias se basen en el análisis de riesgos (art. 6). En este contexto, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) se encarga de proporcionar asesoramiento científico independiente (evaluación de riesgos) sobre las cuestiones que afectan directa o indirectamente a la seguridad alimentaria. Conforme a lo establecido en dicho Reglamento CE Nº 178/2002, entre sus misiones se encuentra explícitamente la determinación de riesgos emergentes. Otras funciones son la recogida y análisis de datos científicos (de enfermedades transmitidas por los alimentos, de exposición, ingesta), y el apoyo científico a la Comisión Europea, también en casos de crisis relacionadas con la seguridad de los alimentos. En su ámbito también se incluyen la salud y bienestar de los animales y la protección fitosanitaria. Además de la evaluación, la EFSA se encarga de la comunicación de riesgos que debe ser objetiva y transparente. El objetivo de las evaluaciones de riesgo es suministrar a los gestores de riesgo (la Comisión Europea, el Parlamento Europeo y el Consejo; también los Estados miembros) una sólida base científica para ayudar en el proceso de elaboración de medidas legislativas cuyo objetivo es garantizar un elevado nivel de protección de los consumidores.

La EFSA posee una Junta Directiva, responsable de controlar el presupuesto y los programas de trabajo, verificar su aplicación y dar el visto bueno a los reglamentos internos. También es competencia de la Junta designar al Director Ejecutivo de la EFSA, así como a los miembros del Comité Científico y de las Comisiones Técnicas. El Director Ejecutivo es nombrado por cinco años y es responsable de la administración cotidiana de la autoridad. El Director Ejecutivo es asesorado por un foro consultivo compuesto por representantes de organismos de los Estados miembros, interesados todos ellos en seguridad alimentaria (industria, asociaciones de consumidores, etc.). El Comité Científico y las Comisiones Téc-

[1] *Reglamento CE N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial N° L 031 de 01/02/2002.*

nicas elaboran dictámenes y prestan asesoramiento científico, cada una de ellas competente en un ámbito específico de la evaluación de riesgos. El Comité Científico coordina el trabajo de las comisiones y aborda cuestiones de ámbito multisectorial u horizontal que abarcan a varias comisiones. Existen 10 Comisiones Técnicas especializadas en diversos temas: salud y bienestar de los animales (AHAW), peligros biológicos (BIOHAZ), aditivos y nutrientes añadidos a los alimentos (ANS), materiales en contacto con alimentos, enzimas, adyuvantes tecnológicos (CEF), contaminantes de la cadena alimentaria (CONTAM), aditivos y productos o sustancias utilizados en piensos para animales (FEEDAP), organismos modificados genéticamente (GMO), nutrición, productos dietéticos, y alergias (NDA), salud vegetal (PLH), fitosanidad, productos fitosanitarios y sus residuos (PPR). El Director Ejecutivo y los miembros de todos los órganos de la autoridad deben comprometerse a actuar con independencia y en interés del público en general. Han de hacer una declaración de compromiso y una declaración de intereses en la que manifiesten no tener ningún interés directo o indirecto que pueda ir en perjuicio de su independencia, o manifestarlo en el caso de tenerlo. La autoridad debe llevar a cabo sus actividades con un alto grado de transparencia. Para ello, hace públicos los dictámenes, los órdenes del día y las actas de las reuniones del Comité y de las comisiones, los resultados de los estudios científicos, el informe anual de actividades y las declaraciones anuales de intereses de las personas anteriormente citadas. El Secretariado de EFSA presta apoyo científico a las comisiones de expertos, y entre las unidades de trabajo, la Unidad de Riesgos Emergentes (Emerging Risks unit, EMRISK) tiene como objetivo establecer procedimientos para monitorizar, recoger y analizar información y datos con el fin de identificar riesgos emergentes en relación con la seguridad de alimentos y piensos para su prevención.

Otros comités en Europa

Además, en la Unión Europea existe un Comité Científico de Riesgos Sanitarios Emergentes y Recientemente Identificados, cuya misión es emitir dictámenes sobre cuestiones relativas a dichos riesgos. El Comité Científico de Riesgos Sanitarios y Medioambientales trata de cuestiones relativas al examen de toxicidad y ecotoxicidad de los compuestos químicos, bioquímicos y biológicos cuyo uso pueda perjudicar la salud humana y el medio ambiente. Estos comités trabajan conjuntamente con los comités científicos de EFSA cuando las cuestiones planteadas se refieren a problemas amplios, complejos o multidisciplinares que requieran una evaluación global de los riesgos para la seguridad de los consumidores, la Salud Pública o el medio ambiente y sobre cuestiones relacionadas no abordadas por otros organismos comunitarios encargados de la evaluación del riesgo y también cuando las cuestiones a tratar requieren una aproximación desde distintos puntos de vista (p. ej. nanotecnologías en alimentos, resistencias antimicrobianas, etc.)

Riesgos emergentes en alimentos

Según los artículos 23f y 34 del Reglamento CE Nº 178/2002, la EFSA está en-

cargada de emprender acciones para identificar y caracterizar los riesgos emergentes en los ámbitos comprendidos en su cometido. Además la autoridad se encarga de crear procedimientos de control para buscar, recopilar, cotejar y analizar, de modo sistemático, la información y los datos con el fin de identificar riesgos emergentes en los ámbitos comprendidos en su cometido. EFSA debe transmitir la evaluación y la información recopilada sobre riesgos emergentes al Parlamento Europeo, a la Comisión y a los Estados miembros. El Comité Científico de la EFSA en su reunión del 10 de julio de 2007 (EFSA 2007) adoptó una definición de riesgos emergentes para su empleo en el ámbito del mandato de la EFSA, según la cual los riesgos emergentes serían los riesgos nuevos, derivados de identificaciones nuevas con exposición significativa, y los riesgos en aumento, derivados de un incremento significativo en la exposición y/o en la susceptibilidad. Hay que destacar que la evaluación de riesgos emergentes se distingue de la evaluación de riesgos en situaciones de emergencia (o de crisis), las cuales se tratan mediante procedimientos establecidos por la Comisión.

Según *Marvin et al (2009)*, se pueden encontrar tres metodologías para la identificación temprana de riesgos emergentes: los sistemas reactivos (p. ej. el sistema europeo Rapid Alert System for Food and Feed o RASFF), los sistemas predictivos de aviso temprano, y los sistemas basados en un enfoque global, estudiados por proyectos europeos tales como PERIAPT (www.periapt.net), SAFE FOODS (www.safefoods.nl) y SAFEFOODERA (www.safefoodera.net). Esta última categoría emplea información tanto de dentro como de fuera de la cadena alimentaria para la predicción. Generalmente, para la evaluación de riesgos emergentes se buscan indicadores predictivos relacionados con el riesgo que sirvan como sistemas de detección, con capacidad de predicción y que señalen tendencias en el tiempo y espacio. Estos indicadores se obtienen, bien de la investigación y/o de programas de monitorización y vigilancia, o bien de observaciones episódicas. La fiabilidad, sensibilidad y poder predictivo de los indicadores son aspectos clave para la calidad de la información proporcionada sobre la naturaleza y el origen del peligro. Se necesitan indicadores que sean capaces de aportar información de calidad y que puedan ser implantados como herramientas de detección. Los indicadores pueden funcionar de manera directa o indirecta al predecir los riesgos emergentes. Un ejemplo de indicadores directos lo constituye cualquier sistema de medida de riesgos químicos o biológicos en el medio ambiente, cuyo incremento conducirá probablemente a un incremento en la concentración en el alimento y en la exposición. Otros indicadores pueden ser indirectos, p. ej. un aumento en las temperaturas de aguas terrestres o marinas conduce a un mayor crecimiento o prevalencia de un patógeno de hábitat acuático. Algunos riesgos emergentes provienen del desarrollo y aplicación de tecnologías de rápido desarrollo e innovación y para los que las metodologías de evaluación no están completamente desarrolladas (nanotecnología, clonación). Por ejemplo, en el caso de la nanotecnología es preciso recabar más información sobre la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los nanomateriales.

Condiciones que propician la emergencia de riesgos

Se han señalado diversas causas que contribuirían a la emergencia de riesgos. Se puede hablar de modificaciones en el agente o los patógenos, en el consumidor y en el propio alimento o en su manera de producirlo. En algunas ocasiones los factores son variados, como veremos.

Cambios en el agente biológico o químico

Los microorganismos son capaces de desarrollar mecanismos de respuesta a estrés y de adquisición de tolerancias que les permiten sobrevivir en ambientes hostiles. En la mayor parte de las veces este cambio del patógeno es debido a una alteración en las condiciones intrínsecas de su hábitat (modificaciones medioambientales o en las etapas de producción animal y vegetal), como veremos más adelante.

En los últimos años se han señalado una serie de riesgos potenciales emergentes relacionados con el consumo de alimentos, incluyendo los norovirus o el virus de la hepatitis E, *Helicobacter* spp, *Chronobacter (Enterobacter) sakazakii, Arcobacter* spp, otras especies del género *Campylobacter* diferentes de *jejuni/coli*, y *Escherichia coli* no O157 productor de la toxina Shiga. Entre los parásitos tenemos la anisakidosis causada por el nematodo *Anisakis*, la espiroquetosis intestinal debida a *Brachyspira pilosicoli*, la gnathostomiasis por nematodos del género *Gnathostoma*. *Coxiella burnetti* es un microorganismo responsable de la fiebre Q y se ha detectado su emergencia en varios países europeos. *Salmonella enteritidis* o *Listeria monocytogenes* son buenos ejemplos del pasado de la capacidad de ciertos patógenos de adaptarse a un nicho ecológico y aumentar su prevalencia en alimentos e incidencia. La generalización del uso de antibióticos en el tratamiento, prevención y control de enfermedades animales así como de piensos medicamentosos en producción animal, ha provocado un aumento de las resistencias antibióticas en patógenos transmitidos por alimentos responsables de infecciones y toxiinfecciones. Por ejemplo, desde la aprobación del empleo de fluoroquinolonas como fármacos y piensos medicamentosos en animales de abasto, se detectan con mayor frecuencia cepas de *Campylobacter* resistentes a fluoroquinolonas en muestras medioambientales, animales y hombre. Otros ejemplos de la emergencia de patógenos antibiorresistentes los constituyen *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Salmonella typhimurium* DT104, y *Enterococcus* resistente a la vancomicina (VRE).

La presencia en alimentos de productos químicos puede deberse a la contaminación accidental de materias primas o ingredientes a lo largo de la cadena alimentaria por la presencia de compuestos químicos en agua, suelo y aire, desde donde alcanzan los alimentos, o bien por el uso intencionado de sustancias en producción animal vegetal o en la transformación de alimentos. Entre los riesgos químicos detectados en los últimos tiempos se puede citar la acrilamida, que se produce durante el procesado de los alimentos y que depende de las altas temperaturas de fritura, la cantidad y el tipo de carbohidratos y de aminoácidos presente (sobre todo el contenido en asparragina). Se ha

detectado acrilamida en alimentos como patatas fritas, patatas chips, frutos secos, tostadas, galletas y productos de panadería. La semicarbazida (metabolito de la nitrofurazona, formado a partir de la degradación térmica de la azodicarbonamida, presente en las juntas de plástico de cierres de envases de vidrio) puede estar presente en ciertos alimentos (p. ej. en preparados para recién nacidos), por migración desde los envases. El bisphenol A es usado en el envasado de alimentos, en concreto en la producción de botellas de plástico transparente y para forrar bandejas de hojalata y en las evaluaciones de riesgo realizadas se ha relacionado con alteraciones del sistema reproductor y el sistema inmunológico (abortos recurrentes y cáncer). Los contaminantes organoclorados, incluyendo bifenilos policlorados (PCBs), dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzo-furanos policlorados (PCDF), han sido detectados en diversos productos como peces, quesos, carne en diversas ocasiones en los últimos tiempos. Las dioxinas y los furanos, compuestos químicamente estables, liposolubles, bioacumulables y persistentes, se originan en procesos industriales o al combustionar productos clorados junto con compuestos orgánicos a altas temperaturas, y sus efectos tóxicos son bien conocidos.

Cambios en el consumidor

Ya se ha mencionado la paradoja existente sobre la disparidad entre el sentimiento de riesgo, y los avances científicos en nutrición, salud y alimentación, y el esfuerzo en seguridad alimentaria. El consumidor se encuentra desorientado por la multitud de mensajes y noticias con consejos alimentarios o información de validez cuestionable. La dieta en nuestra sociedad es un factor cambiante. En el momento actual existen una serie de tendencias tales como las preferencias por alimentos mínimamente procesados y con vida útil extendida, determinados alimentos "exóticos" (steak tartare, sushi, carne de reptiles), o técnicas de preparación de los mismos ("nueva cocina", cocción al vacío, al vapor, al papilote, etc.). Algunos de estos alimentos se consumen crudos y otros reciben tratamientos térmicos suaves. Otro factor de cambio lo representa el turismo, la inmigración, y no debe olvidarse la modificación de la pirámide de población, con el crecimiento de grupos de riesgo como ancianos.

Cambios en los sistemas de producción y en el alimento

En muchas ocasiones se ha constatado que las modificaciones en las condiciones medioambientales o las etapas de producción animal y vegetal permiten una mayor presencia de agentes biológicos o químicos en los alimentos, provocando un aumento en la exposición. El cambio climático ha sido señalado como un factor decisivo (indicador indirecto) debido al aumento en temperaturas y al cambio de hábitat de patógenos y vectores *(Miraglia et al, 2009)*. EFSA y OMS lo emplean como posible indicador indirecto y se prevé que influya en la alimentación y la producción de los cultivos así como en las enfermedades de los animales. Algunos de los riesgos emergentes que se prevén en el futuro son un aumento en la presencia de micotoxinas en piensos y alimentos, de residuos de pesticidas y elementos traza tóxicos en cose-

chas, de biotoxinas marinas en moluscos y otros animales marinos y de patógenos en alimentos, piensos y agua. El aumento de las temperaturas se ha relacionado también con la diseminación de enfermedades (lengua azul, gripe aviar) por la mayor presencia y distribución de vectores en el medio ambiente. Otros efectos climáticos con posible repercusión sobre la presencia de agentes químicos o biológicos en alimentos los representan la escasa disponibilidad de agua tanto para bebida como para su empleo en la industria alimentaria que fomenta su reutilización, el uso de efluentes fecales y el aprovechamiento de las aguas del subsuelo. Todos estos sistemas conllevan riesgos como la presencia de patógenos o la movilización de elementos químicos en acuíferos.

La necesidad de preservar el bienestar animal en los sistemas modernos de producción animal puede ser también un factor (p. ej. al permitir el contacto animal-parásito). Determinadas prácticas agrícolas y ganaderas intensivas producen un enorme impacto sobre el suelo, el abastecimiento de agua o la contaminación ambiental y podrían constituir un riesgo para alimentos y cultivos. Cada sector de producción está sujeto a condicionantes propios. P. ej., la acuicultura, que representa el sector de producción animal con mayor crecimiento, y que probablemente se convertirá en un futuro a medio plazo en la fuente principal de pescado de consumo, necesita resolver cuestiones relacionadas con el medio ambiente.

Otro factor de emergencia lo puede constituir las modificaciones en las etapas de transformación industrial. Son innumerables los ejemplos de innovación industrial mediante la cual se modifican los alimentos tradicionales (nuevos alimentos, alimentos "con", alimentos "sin"). También se ha producido un enorme desarrollo de tecnologías de procesado, tales como las altas presiones hidrostáticas, la cocción al vacío, los pulsos eléctricos, los pulsos lumínicos. Las aplicaciones nanotecnológicas en alimentos están surgiendo con desarrollo en campos como los biosensores o el envasado activo (agentes que captan oxígeno, absorben humedad, controladores de aroma y olor, agentes antivaho, antimicrobianos), el envasado inteligente (envase para detectar, mostrar, registrar o comunicar una información sobre el estado del alimento envasado o su entorno). También pueden mencionarse los recubrimientos comestibles, películas biodegradables adheridas a la superficie del alimento creando una microatmósfera pobre en oxígeno. Los cambios en los factores extrínsecos e intrínsecos del alimento pueden ser evaluados para la prevención de riesgos microbiológicos.

Bibliografía

Beck U. La sociedad del riesgo: hacia una nueva modernidad. Barcelona, Paidós. 2006.

Cook CD. Diet for a dead planet: how the food industry is killing us. The New Press. 2004.

EFSA. Scientific Committee Adopts Definition of Emerging Risks. EFS – European Food Safety Authority, Parma. 2007.

Marvin HJP, Kleter GA, Prandini A, Dekkers S, Bolton DJ. Early identification systems for emerging foodborne hazards. Food and Chemical Toxicology. 2009; 47:915-26.

Miraglia M, Marvin HJ, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E, Cubadda F, Croci L, De Santis B, Dekkers S, Filippi L, Hutjes RWA, Noordam MY, Pisante M, Piva G, Prandini A, Toti L, Van

den Born GJ, Vespermann A. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. Food and Chemical Toxicology. 2009; 47:1009-21.

Prieto M, Mouwen DJM, López S, Cerdeño A. Concepto de calidad en la industria agroalimentaria. Interciencia. 2008; 33:258-64.

Reza L. The Agro-Food Sector in the 21st Century. The OECD Observer. 1998; 210:28-31.

Roosen J, Thiele S, Hansen K. Food risk perceptions by different consumer groups in Germany. Working Paper EWP 0407. Department of Food Economics and Consumption Studies. University of Kiel, Alemania. 2004.

UNIVERSIDAD
DE BURGOS

INSTITUTO **TOMÁS PASCUAL**
para la nutrición y la salud

CÁTEDRA TOMÁS PASCUAL SANZ
Universidad de Burgos

ISBN 978-847867055-0