

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

ESTUDIO de las INTERACCIONES
entre AGENTES ANTIMICROBIANOS
y OTROS ADITIVOS y/o COMPONENTES:
EFECTOS sobre la ESTABILIDAD de
SISTEMAS ACUOSOS y EMULSIONES
que MODELAN ADEREZOS para ENSALADA

ING. MARCELA PAOLA CASTRO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LÍA NOEMÍ GERSCHENSON

DIRECTORA ASISTENTE: DRA. CARMEN ADRIANA CAMPOS

2006

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

STUDY of the INTERACTIONS between
PRESERVATIVES and OTHER ADDITIVES and/or
FOOD COMPONENTS: its EFFECTS on the
STABILITY of AQUEOUS MODEL SYSTEMS and
EMULSIONS RESEMBLING SALAD DRESSINGS

ING. MARCELA PAOLA CASTRO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LÍA NOEMÍ GERSCHENSON

DIRECTORA ASISTENTE: DRA. CARMEN ADRIANA CAMPOS

2006

A Sergio.

A mis hijos, Francisca y Emiliano.

A mis padres, Susana y Luis.

A la memoria de mis abuelos, Francisco y Susana.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), al CONICET, a la Fundación Antorchas y a la Universidad Nacional del Nordeste, por el apoyo financiero brindado para la realización de la tesis.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Agroindustrias de la Universidad Nacional del Nordeste por facilitar el uso de sus instalaciones.

A las Dras. Lía Noemí Gerschenson y Carmen Adriana Campos, quienes dirigieron este trabajo, por la dedicación, el apoyo, la comprensión y el estímulo que me brindaron siempre y, sobre todo, por su esfuerzo en la corrección de esta Tesis.

Al Dr. Oscar Garro, quien co-dirigió mi beca de CONICET, por su colaboración.

A los Sres. Carlos Rey y Alberto Toletini, de Refinerías de Maíz, Planta Pilar, por brindarme la posibilidad de realizar los estudios de determinación de tamaño de partícula en el Laboratorio de Control de Calidad de dicha planta.

A mis compañeros de la Facultad, por haberme acompañado durante estos años. En particular, a Cecilia, Mónica y Germán, por sus palabras de aliento.

A mis compañeros del Departamento de Industrias, por brindarme sus espacios y su buena onda.

A la Dra. Fernanda Gliemmo, por su hospitalidad, generosidad y empuje contagioso, y por su ayuda en la compaginación de este trabajo.

A la Ing. María Elisa Cayré, por estar siempre "ahí", dispuesta a escuchar y dar un consejo. Por su colaboración en las tareas de microbiología y, muy especialmente, por ayudarme a transitar este camino, compartiendo buenos y malos momentos.

A mis amigos, por aguantarme todos estos años con la palabra "tesis" adosada a mi persona.

A Ana, por brindarme un lugarcito afectuoso en mi paso por Buenos Aires.

A Niní, por cuidar a los que quedaban en casa.

A mis abuelos, que me enseñaron a creer en los sueños.

A mis viejos, por su eterno apoyo y comprensión infinita. A mis hermanos, por bancarse la huésped.

A mis hijos, a quienes les he robado un montón de sonrisas para poder seguir adelante.

A Sergio, mi compañero del alma, porque gracias a su apoyo incondicional durante este largo recorrido, he llegado al final del camino.

Ing. Marcela Paola Castro

Resumen

Los aderezos para ensalada son emulsiones aceite en agua, cuyo contenido oleoso es variable, estando constituidos, entre otros, por: ácido acético, sales, azúcares, hidrocoloides, surfactantes y agentes antimicrobianos, siendo el ácido sórbico uno de los antimicrobianos comúnmente utilizados. Desde una perspectiva tecnológica, los aderezos son sistemas químicos complejos. Consecuentemente, son muchos los factores que, actuando en conjunto, proveen a este alimento de las condiciones necesarias para asegurar su vida útil. En este estudio se abordan algunos de esos factores, y sus interacciones, a fin de establecer las condiciones que mejor determinen su conservación y seguridad alimenticia.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de las interacciones entre los agentes antimicrobianos sorbatos (ácido sórbico y sorbato de potasio) y nisina y otros aditivos y/o componentes, en sistemas acuosos y emulsiones que modelaban aderezos para ensalada. Para ello se evaluó el efecto de dichas interacciones sobre la estabilidad química y el reparto entre fases de los sorbatos y la actividad antimicrobiana de sorbatos y nisina.

Los sorbatos se degradaron durante el almacenamiento, en sistemas acuosos y en emulsiones, dependiendo ello de la composición del sistema y de sus características físico-químicas. El reparto del antimicrobiano en las fases de la emulsión se vió afectado por la presencia de algunos componentes y por el nivel de surfactante presente. La nisina aumentó la destrucción de los sorbatos y el aceite tendió a disminuir dicha velocidad.

La composición del sistema también condicionó la efectividad antimicrobiana del sorbato sobre la levadura *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas acuosos y en emulsiones. El uso conjunto de sorbato de potasio y nisina resultó efectivo en la inhibición del crecimiento de la bacteria *Lactobacillus fructivorans* en sistemas acuosos, pero se vió fuertemente afectado por la composición del sistema en emulsiones.

Los resultados obtenidos aportan información esencial para elegir correctamente los aditivos a utilizar en la formulación y procesamiento de aderezos, contribuyendo así a la obtención de alimentos estables desde el punto de vista microbiológico, organoléptico y nutricional.

Palabras clave: aderezos, emulsiones, sorbato de potasio, nisina, surfactantes, *Zygosaccharomyces bailii*, *Lactobacillus fructivorans*.

Abstract

Salad dressings are oil-in-water emulsions, with variable oil concentration, being constituted, among others, by: acetic acid, salts, sugars, hydrocolloids, surfactants and preservatives; being sorbic acid commonly used to preclude microorganism development. From a technological point of view, dressings are complex chemical systems. Consequently, many factors, in combination, are responsible for the stability of these products. In this study, many of these factors are analyzed, together with the interactions among them, in order to ascertain the best conditions to assure the shelf-life of dressings.

The aim of this work was the study of the interactions between preservatives sorbates (sorbic acid and potassium sorbate) and nisin and other additives and/or components, in aqueous model systems and emulsions resembling salad dressings. This goal was achieved by means of the evaluation of the chemical stability and the partition between phases of sorbates and the biological activity of sorbates and nisin.

In aqueous systems and emulsions, sorbate destruction was dependent on system composition and physico-chemical characteristics. The partition of the antimicrobial between phases of the emulsion was affected by the presence of different components as well as by the level of surfactant. Nisin increased sorbate destruction and oil tended to decrease that rate.

System composition conditioned sorbate effectiveness against *Zygosaccharomyces bailii* growth in aqueous systems and emulsions. The joint use of nisin and sorbate was effective against *Lactobacillus fructivorans* growth in aqueous systems, but it was strongly affected by system composition in emulsions.

Results gathered in this study provide essential information for the right selection of additives to be used in the formulation and processing of dressings, helping in the obtention of microbiological, organoleptical and nutritional stable foods.

Key words: dressings, emulsions, potassium sorbate, nisin, surfactants, *Zygosaccharomyces bailii*, *Lactobacillus fructivorans*.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS. PERSPECTIVAS ACTUALES	2
1.2 EMULSIONES ALIMENTICIAS	5
1.2.1 Fenómenos de inestabilidad de una emulsión	6
1.2.2 Fenómenos de partición de ingredientes de una emulsión	7
1.2.3 Complejidad de las emulsiones alimenticias	8
1.2.3.1 Estabilizantes	9
1.2.3.1.a Emulsificantes	9
1.2.3.1.b Agentes espesantes	10
1.2.3.1.c Agentes complejantes	11
1.3 ADEREZOS PARA ENSALADA	13
1.3.1 Generalidades	13
1.3.2 Deterioro de aderezos con especial referencia al de tipo microbiológico	14
1.3.2.1 <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	16
1.3.2.2 <i>Lactobacillus fructivorans</i>	17
1.3.3 Factores de estrés microbiano utilizados para la preservación de aderezos	17
1.3.3.1 Disminución del pH y depresión de la actividad de agua	18
1.3.3.2 Agregado de aditivos antimicrobianos	18
1.3.3.2.a Antimicrobianos derivados de ácidos orgánicos débiles	19
1.3.3.2.b Antimicrobianos de origen bacteriano	21
1.3.3.2.c Otros aditivos que contribuyen a la actividad antimicrobiana en aderezos con especial referencia a las sustancias secuestrantes	23
1.4 EL ÁCIDO SÓRBICO Y SU SAL DE POTASIO	24
1.4.1 Descripción: propiedades físicas y químicas	24
1.4.1.1 Distribución del ácido sórbico entre fases	26
1.4.1.1.a Sistemas aceite-agua	26
1.4.1.1.b Sistemas aceite-agua-surfactante	27
1.4.2 Estabilidad química	28
1.4.2.1 Generalidades	28
1.4.2.2 Degradación oxidativa	29
1.4.3 Acción antimicrobiana	31

1.4.3.1	Generalidades	31
1.4.3.2	Modo de acción	31
1.4.3.3	Espectro de acción	32
1.4.3.4	Marco regulatorio y aplicación en alimentos	33
1.4.3.5	Factores que afectan la acción antimicrobiana de los sorbatos	33
1.4.3.5.a	Influencia de los componentes del alimento	35
1.4.3.5.b	Influencia de la microflora	35
1.4.3.5.c	Influencia de la actividad de agua y de los humectantes	36
1.4.3.5.d	Influencia del pH	36
1.4.3.5.e	Influencia del grado de disociación	36
1.4.3.5.f	Influencia de los aditivos	37
1.4.3.5.g	Influencia del método de preservación empleado	38
1.4.3.5.h	Influencia de las condiciones de almacenamiento	38
1.5	LA NISINA	39
1.5.1	Descripción. Propiedades físicas y químicas.	39
1.5.2	Proceso de elaboración	40
1.5.3	Modo de acción	40
1.5.4	Espectro de actividad	41
1.5.5	Marco regulatorio y sus aplicaciones en alimentos	41
1.5.5.1	Usos de la nisina como parte de un sistema de barreras múltiples	42
1.6	FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LOS ADEREZOS PARA ENSALADA	44
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS		47
2.1	OBJETIVOS GENERALES	48
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES	48

CAPÍTULO 3 - ESTABILIDAD de los SORBATOS	
en SISTEMAS MODELO ACUOSOS	50
3.1 DEGRADACIÓN OXIDATIVA del ÁCIDO SÓRBICO	51
3.1.1 Introducción	51
3.1.1.1 Cinética de degradación oxidativa	51
3.1.1.2 Influencia de la degradación de los sorbatos sobre el pardeamiento no enzimático	52
3.1.2 Objetivos	53
3.1.3 Materiales y Métodos	54
3.1.3.1 Sistemas modelo. Composición.	54
3.1.3.1.1 Preparación de los sistemas modelo	55
3.1.3.2 Condiciones de almacenamiento	56
3.1.3.3 Determinación de ácido sórbico	56
3.1.3.4 Determinación del pardeamiento no enzimático	57
3.1.3.5 Análisis estadístico de los resultados	58
3.1.4 Resultados y Discusión	58
3.1.4.1 Degradación del ácido sórbico	58
3.1.4.2 Pardeamiento no enzimático de los sistemas modelo acuosos	61
3.1.5 Conclusiones	62
3.2 EFECTO de la PRESENCIA de EDTA, de DIFERENTES MATERIALES de EMPAQUE y del pH en la DEGRADACIÓN OXIDATIVA de los SORBATOS	63
3.2.1 Introducción	63
3.2.2 Objetivos	64
3.2.3 Materiales y Métodos	64
3.2.3.1 Sistemas modelo: composición y preparación.	64
3.2.3.2 Condiciones de almacenamiento	64
3.2.3.3 Determinación de sorbato de potasio y hierro	65
3.2.3.4 Análisis estadístico de los resultados	65
3.2.4 Resultados y Discusión	65
3.2.5 Conclusiones	72
3.3 CONCLUSIONES GENERALES	72

CAPÍTULO 4 - ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA de los SORBATOS y de la NISINA en SISTEMAS que MODELAN la FASE ACUOSA de ADEREZOS para ENSALADA	73
4.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA de los SORBATOS en SISTEMAS que MODELAN la FASE ACUOSA de ADEREZOS para ENSALADA	74
4.1.1 Introducción	74
4.1.2 Objetivos	75
4.1.3 Materiales y Métodos	75
4.1.3.1 Sistemas modelo: composición y preparación	75
4.1.3.2 Preparación del inóculo, inoculación y almacenamiento de los sistemas	76
4.1.3.2.1 <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	76
4.1.3.2.2 <i>Lactobacillus fructivorans</i>	76
4.1.3.3 Muestreo y análisis	77
4.1.3.3.1 Función de corrección	78
4.1.3.4 Determinación de ácido sórbico	79
4.1.4 Resultados y Discusión	79
4.1.4.1 Efectos del sorbato de potasio y de algunos aditivos sobre la inhibición del crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	79
4.1.4.2 Efecto del sorbato de potasio sobre el crecimiento de <i>Lactobacillus fructivorans</i>	80
4.1.5 Conclusiones	82
4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA de la NISINA en SISTEMAS que MODELAN la FASE ACUOSA de ADEREZOS para ENSALADA	83
4.2.1 Introducción	83
4.2.2 Objetivos	84
4.2.3 Materiales y Métodos	84
4.2.3.1 Sistemas modelo: composición y preparación	85
4.2.3.2 Muestreo y análisis	85
4.2.4 Resultados y Discusión	86
4.2.5 Conclusiones	93

4.3	CONCLUSIONES GENERALES	94
	CAPÍTULO 5 - ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA y CARACTERIZACIÓN de EMULSIONES MODELO	95
5.1	FORMULACIÓN y CARACTERIZACIÓN de EMULSIONES que MODELAN ADEREZOS para ENSALADA	96
5.1.1	Introducción	96
5.1.2	Objetivos	99
5.1.3	Materiales y Métodos	99
5.1.3.1	Estabilidad visual	99
5.1.3.1.1	Sistemas modelo. Composición.	100
5.1.3.1.2	Preparación de los sistemas modelo	102
5.1.3.2	Determinación de la distribución de tamaño de gota	103
5.1.3.2.1	Preparación de los sistemas modelo	104
5.1.3.2.2	Análisis estadístico de los resultados	104
5.1.4	Resultados y Discusión	105
5.1.5	Conclusiones	111
5.2	COEFICIENTE DE REPARTO DEL SORBATO EN EMULSIONES	112
5.2.1	Introducción	112
5.2.2	Objetivos	115
5.2.3	Materiales y Métodos	116
5.2.3.1	Composición y preparación de los sistemas modelo	116
5.2.3.2	Determinación del coeficiente de reparto del ácido sórbico	116
5.2.3.3	Análisis estadístico de los resultados	116
5.2.4	Resultados y Discusión	117
5.2.5	Conclusiones	119
5.3	DEGRADACIÓN OXIDATIVA DEL SORBATO EN EMULSIONES	120
5.3.1	Introducción	120
5.3.2	Objetivo	121
5.3.3	Materiales y Métodos	121

5.3.3.1	Sistemas modelo. Composición, preparación y almacenamiento	121
5.3.3.2	Determinación de ácido sórbico	121
5.3.3.3	Cinética de degradación oxidativa del ácido sórbico	122
5.3.3.4	Análisis estadístico de los resultados	122
5.3.4	Resultados y Discusión	124
5.3.5	Conclusiones	128
5.4	CONCLUSIONES GENERALES	128

CAPÍTULO 6 –ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE EMULSIONES QUE MODELAN ADEREZOS PARA ENSALADA

	Introducción-Estabilidad microbiológica de emulsiones	130
6.1	ACTIVIDAD de los SORBATOS sobre <i>Zygosaccharomyces bailii</i> en EMULSIONES que MODELAN ADEREZOS	133
6.1.1	Objetivos	133
6.1.2	Materiales y Métodos	133
6.1.2.1	Sistemas modelo: composición y preparación	133
6.1.2.2	Inoculación y almacenamiento de los sistemas	134
6.1.2.3	Determinación de las constantes de velocidad de muerte. Análisis estadístico de los datos	134
6.1.2.4	Determinación del coeficiente de reparto y de la distribución de la forma no disociada del ácido sórbico	135
6.1.3	Resultados y Discusión	136
6.1.3.1	Actividad del sorbato de potasio	136
6.1.3.2	Efecto de la concentración de aceite	137
6.1.3.3	Efecto de la concentración de Tween® 20	142
6.1.4	Conclusiones	145
6.2	ACTIVIDAD de los SORBATOS y de la NISINA sobre <i>Lactobacillus fructivorans</i> en EMULSIONES que MODELAN ADEREZOS	146
6.2.1	Objetivos	146
6.2.2	Materiales y Métodos	146
6.2.2.1	Preparación del inóculo	146
6.2.2.2	Sistemas modelo. Composición y preparación.	147

6.2.2.3	Inoculación, almacenamiento y muestreo de los sistemas modelo	147
6.2.2.4	Tratamiento estadístico de los datos	148
6.2.3	Resultados y discusión	150
6.2.3.1	Efecto de la nisina sobre el desarrollo de <i>L. fructivorans</i>	150
6.2.3.2	Efecto del sorbato sobre el desarrollo de <i>L. fructivorans</i> .	154
6.2.3.3	Efecto del contenido de aceite sobre el desarrollo de <i>L. fructivorans</i>	155
6.2.3.4	Efecto del Tween sobre el desarrollo de <i>L. fructivorans</i>	157
6.2.4	Conclusiones	158
6.3	CONCLUSIONES GENERALES	159
CAPÍTULO 7- CONCLUSIONES GENERALES		160
APÉNDICE 1		166
APÉNDICE 2		169
REFERENCIAS		174

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS. PERSPECTIVAS ACTUALES.

En la producción de alimentos es crucial que se tomen medidas apropiadas para garantizar la seguridad y estabilidad del producto durante su vida útil. En particular, las tendencias impuestas por los consumidores y el cumplimiento de la legislación alimentaria han hecho que el logro exitoso de este objetivo sea mucho más que un desafío para la industria de los alimentos. Primeramente, los consumidores requieren alimentos de elevada calidad parecidos a los naturales, libres de antimicrobianos, seguros y con una extensa vida útil. Esto conlleva a que los alimentos debieran ser preservados sin someterlos a grandes cambios en el pH ni a tratamientos térmicos severos. Como la acidificación y los tratamientos de esterilización constituyen dos factores esenciales en el control del crecimiento de bacterias patógenas formadoras de esporas, tales como *Clostridium botulinum*, atender los requerimientos de los consumidores demanda alternativas innovadoras que aseguren la salubridad de los productos (Gould, 1995; Schellekens, 1996; Peck, 1997; Brul y Coote, 1999). Como segundo aspecto, la legislación estipula máximos permitidos en los preservadores aceptados, hasta el presente, en diferentes alimentos.

La preservación de alimentos implica el desarrollo de un ambiente hostil para los microorganismos a fin de inhibir su crecimiento, acortar su supervivencia o causar su muerte. Las distintas respuestas de los microorganismos a este ambiente hostil determinarán si éstos podrán crecer o morir. La seguridad y estabilidad microbiológica como así también la calidad sensorial y nutricional pueden alcanzarse por la aplicación de factores de preservación combinados (llamados obstáculos) (Leistner, 2000).

Cuando la preservación de alimentos falla, las consecuencias van desde un riesgo y peligro extremo, como sería el desarrollo de organismos toxigénicos, si éstos no son controlados, a pérdidas de calidad como las pérdidas de color, las cuales son también de gran importancia ya que reducen la vida de anaquel de los productos y pueden producir pérdidas económicas de cuantía (Tapia y col., 1994).

Mientras la mayoría de las técnicas de preservación han tenido una trayectoria exitosa de uso, los medios para su aplicación efectiva han sido derivados en su mayor parte empíricamente y sólo en pocos casos sus mecanismos de acción son conocidos. Sin embargo, en las últimas décadas ha resurgido el interés y ha habido un aumento en la atención dada por los investigadores al estudio de los mecanismos por los cuales las técnicas de preservación actúan a nivel celular y molecular. Las razones de este renovado interés son de diversa índole, pero es indudable que se ha percibido claramente la necesidad de contar con una base científica más sólida que posibilite mejorar las técnicas de preservación utilizadas hoy en día en la industria alimentaria. Estas mejoras apuntan a una misma dirección: el logro de una reducción general en la severidad de los tratamientos y un mejor

control de los mismos en lo que se conoce actualmente como "procesamiento mínimo". De acuerdo a Gould (1992), las ventajas obtenidas se reflejarán en los siguientes aspectos:

- Calidad de los productos: sabor, textura, apariencia y valor nutricional
- Extensión de vida útil: seguridad y alta calidad
- Eficiencia en la producción y distribución
- Conveniencia para el consumidor
- Reducción en pérdidas post-cosecha y post-proceso
- Disminución en los riesgos de infecciones e intoxicaciones alimenticias
- Reducción en el uso de preservadores

Las tecnologías de preservación de alimentos disponibles en la actualidad, así como las de uso potencial, se resumen en la Tabla 1.1.1. De las principales técnicas de preservación en uso en la actualidad:

- a) sólo unas pocas operan mediante la eliminación total de los microorganismos,
- b) la mayoría se basa en el retardo (inhibición) del crecimiento de organismos patógenos o deteriorativos en los alimentos,
- c) los diferentes métodos de preservación están basados en relativamente pocos parámetros: temperatura, actividad de agua (a_w), pH, potencial redox (Eh), adición de preservadores y presencia de flora acompañante (para la mayoría de los procesos), mientras que la radiación, presión y choque eléctrico, se usan en procesos muy particulares.
- d) La mayoría de los factores de estrés antimicrobianos operan en combinación (Russel y Gould, 1991).

Los factores de estrés microbiano citados en la Tabla 1.1.1 forman la base de gran parte de los procedimientos de preservación que se aplican con el propósito deliberado de conservar los alimentos. Sin embargo, son las formas en las que son aplicados las que están cambiando y además, factores ecológicos completamente nuevos están apareciendo en el panorama de la preservación de alimentos. Además, debe considerarse que la preservación de los alimentos debe tener en cuenta las necesidades de los consumidores y que estas necesidades están cambiando.

Tabla 1.1.1 Tecnologías de preservación microbiana de los alimentos. Adaptada de Gould (1992).

Objetivo	Factor	Modo de obtención
<i>Retardo o inhibición de crecimiento</i>	Reducción de temperatura.	Almacenamiento en frío, congelación.
	Reducción de a_w .	Secado, liofilización, curado y salado, azucarado, etc.
	Control de microestructura.	Compartimentalización de fase acuosa en emulsiones agua en aceite.
	Disminución de oxígeno.	Envasado al vacío y en atmósfera de N_2 .
	Aumento de CO_2 .	Carbonatación, atmósferas controladas/modificadas.
	Acidificación.	Adición de ácidos, fermentación.
	Cultivos iniciadores.	Adición de microorganismos.
	Aumento de etanol.	Fermentación alcohólica, cervecera, vinificación, etc.
	Uso de enzimas u otras proteínas.	Adición de lisozima, lactoperoxidasa, lactoferrina.
	Uso de preservadores.	Inorgánicos: sulfitos, nitritos. Orgánicos: sorbatos, propionatos, etc. Lantibióticos: nisina y otros.
<i>Inactivación de microorganismos</i>	Calor.	Pasteurización, esterilización.
	Agentes químicos.	Tratamiento de ingredientes con: dióxido de etileno; tratamiento de materiales de empaque con: H_2O_2 .
	Enzimas.	Agregado de lisozima.
	Presión.	Alta presión hidrostática.
	Choque eléctrico.	Pulsos de alto voltaje.
<i>Restricción del acceso de microorganismos</i>	Envasado.	Envasado en latas, plásticos semi-rígidos y flexibles. Envasado aséptico sin recontaminación.

Durante las últimas dos décadas, los hábitos alimenticios han cambiado, dirigidos al logro de una meta que parece haber sido adoptada como bandera de estos tiempos: una alimentación "sana". De esta manera el gran público está cada vez más preocupado por los efectos perjudiciales al organismo que pueden tener las sustancias preservantes químicas, popularmente denominadas como "artificiales". En consecuencia, se ha observado una marcada reducción de los niveles de preservadores en una gran cantidad de productos, hecho al que ciertas fuentes atribuyen un aumento en las cifras reportadas de los casos por infecciones e intoxicaciones alimenticias.

La Tabla 1.1.2 presenta algunas de las tendencias que representan cambios importantes en las necesidades de los consumidores y que tendrán un impacto en el futuro de la preservación de los alimentos.

Tabla 1.1.2 Principales tendencias de los consumidores que tendrán impacto directo en tecnologías de preservación futuras. Adaptada de Gould (1992).

Los consumidores requerirán productos que sean:

- Convenientes:
 - Fáciles de almacenar
 - Con vida útil satisfactoria
 - De alta calidad
 - De procesamientos menos severos:
 - Calentados menos intensamente
 - Con daño mínimo en la congelación
 - De preservación menos intensa
 - Más libres de "aditivos artificiales"
 - Más frescos
 - Más naturales
 - Nutricionalmente más saludables:
 - Con menos sal
 - Con menos grasas (saturadas)
 - Con menos azúcar
 - Con menos calorías
 - Más seguros
-

Existe preocupación entre los microbiólogos de alimentos en relación a que la mayoría de las tendencias señaladas tienden a una pérdida de la preservación intrínseca, por ejemplo, uso de menos sal, azúcar, preservadores químicos, etc., y a una pérdida potencial de protección por efectos de procesamiento, como podría ocurrir en los productos procesados menos severamente o sometidos a procesamiento mínimo. Por todo esto, es realmente muy importante el conocimiento y uso de los principales factores, tecnologías y principios ecológicos disponibles, para mantener en los alimentos niveles de seguridad adecuados (Tapia y col., 1994).

1.2 EMULSIONES ALIMENTICIAS

Una emulsión es un sistema de dos fases que consta de dos líquidos parcialmente miscibles uno de los cuales es dispersado en el otro en forma de glóbulos. Las emulsiones se clasifican de acuerdo a la distribución de las fases oleosa y acuosa. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina *emulsión aceite en agua* ("oil-

in-water emulsion" ó emulsión O/W), como por ejemplo: mayonesa, aderezos, leche, crema, sopas y salsas. Un sistema que consiste de gotas de agua dispersas en una fase oleosa se denomina *emulsión agua en aceite* ("water-in-oil emulsion" ó emulsión W/O), entre las que se pueden citar: margarina, manteca y sus sucedáneos. La sustancia que constituye las gotas de una emulsión se llama *fase dispersa o interna*, mientras que la sustancia que constituye el líquido circundante se llama *fase continua o externa*.

Una emulsión podría formarse homogeneizando agua y aceite, pero las dos fases se separarían rápidamente. Esto sucede porque las gotas tienden a unirse con sus homólogas cuando colisionan, lo que eventualmente conlleva a una completa separación de las fases. La fuerza que conduce este proceso viene dada por el hecho que el contacto entre las moléculas de aceite y agua es energéticamente desfavorable (Israelachvili, 1992), lo cual hace a las emulsiones sistemas *termodinámicamente inestables*. Resulta posible formar emulsiones que sean cinéticamente estables (metaestables) por un período de tiempo razonable (días, semanas, meses o años) si se incluye sustancias conocidas como *emulsificantes y/o agentes espesantes* antes de la homogeneización. Los emulsificantes son moléculas de superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotas recién formadas durante la homogeneización, previniendo que las gotas se acerquen lo suficiente como para unirse. La mayoría de los emulsificantes utilizados en la industria alimentaria son moléculas anfífilas como proteínas, surfactantes y fosfolípidos. Los agentes espesantes son ingredientes que se emplean para incrementar la viscosidad de la fase continua de las emulsiones, mejorando su estabilidad debido a que retardan el movimiento de las gotas. Los agentes espesantes más comúnmente usados en la industria de los alimentos son los polisacáridos. Un *estabilizante* es cualquier ingrediente que se utilice para mejorar la estabilidad de una emulsión y puede ser, entonces, tanto un emulsificante como un agente espesante.

1.2.1 Fenómenos de inestabilidad de una emulsión

El término "estabilidad" de una emulsión es ampliamente utilizado para describir la habilidad de una emulsión para resistir cambios en sus propiedades a lo largo del tiempo. Hay una variedad de mecanismos fisicoquímicos que pueden ser responsables de las alteraciones en las propiedades de una emulsión. Los mecanismos físicos más importantes involucrados en la desestabilización de una emulsión se muestran esquemáticamente en la figura 1.2.1. El *cremado* y la *sedimentación* son formas de *separación gravitacional*. El cremado describe un movimiento hacia arriba de las gotas de fase dispersa debido a que éstas presentan una menor densidad que la fase dispersante, mientras que la sedimentación describe un movimiento hacia abajo debido a que las gotas presentan mayor densidad que

el líquido circundante. La *floculación* y la *coalescencia* son ambos fenómenos de agregación de gotas. La *floculación* ocurre cuando dos o más gotas se acercan para formar un agregado en el cual las gotas retienen su integridad individual, mientras que la *coalescencia* es un fenómeno en el cual dos o más gotas se juntan para formar una gota de mayor tamaño. La *inversión de fases* es el proceso mediante el cual una emulsión aceite en agua, se convierte en una emulsión agua en aceite, o viceversa. Además de los procesos físicos mencionados, debe destacarse que también existen varios procesos químicos, bioquímicos y microbiológicos que ocurren en las emulsiones alimenticias que también afectan su vida útil y calidad (Mc Clements, 1999).

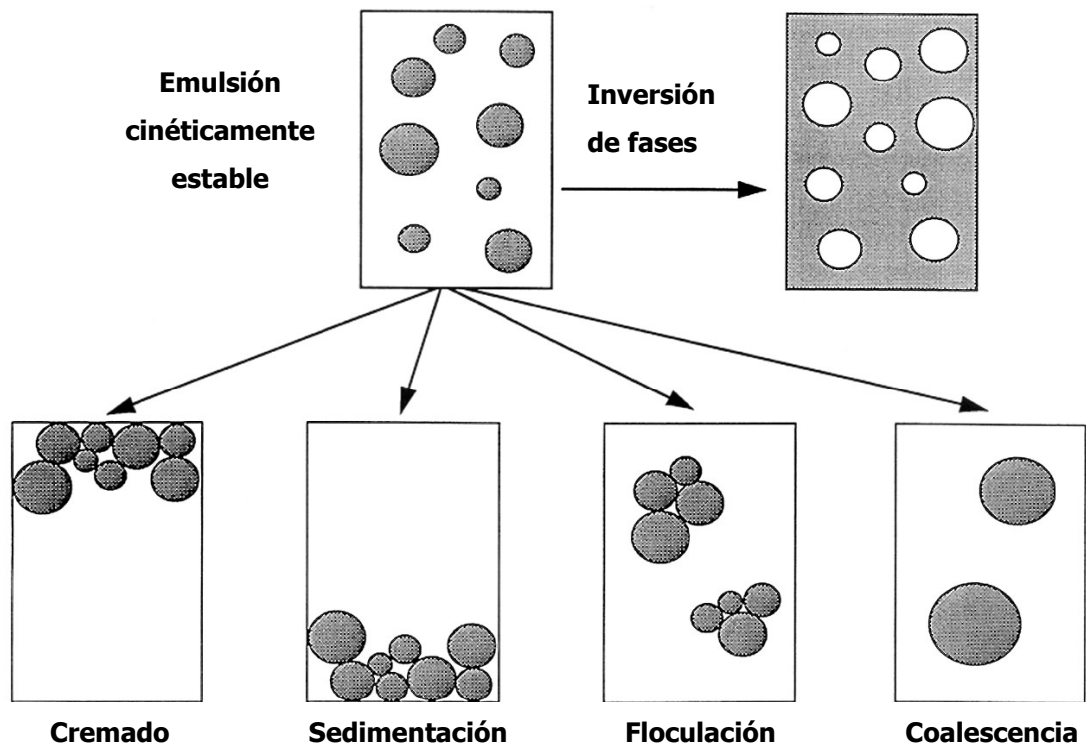


Figura 1.2.1 Las emulsiones pueden desestabilizarse a través de una variedad de mecanismos físicos, que incluye: cremado, sedimentación, floculación, coalescencia e inversión de fases. Adaptado de Mc Clements (1999).

1.2.2 Fenómenos de partición de ingredientes de una emulsión

La mayoría de las emulsiones están constituidas por tres regiones que poseen diferentes propiedades fisicoquímicas: el interior de las gotas, la fase continua y la interfase

(figura 1.2.2). Las moléculas en una emulsión se distribuyen entre estas tres regiones de acuerdo a su concentración y polaridad (Wedzicha, 1988). Las moléculas no polares tienden a localizarse en la fase oleosa, las moléculas polares en la fase acuosa y las moléculas anfífilas en la interfase. Debe destacarse que, incluso en el equilibrio, hay un intercambio continuo de moléculas entre las diferentes regiones, el cual ocurre a una velocidad que depende de la transferencia de masa de las moléculas a través del sistema. Las moléculas también pueden moverse de una región a la otra cuando hay alguna alteración en las condiciones medioambientales de la emulsión (por ejemplo, cambios en la temperatura de almacenamiento o dilución, dentro de la boca). La ubicación y la transferencia de masa de las moléculas dentro de una emulsión tienen una influencia significativa sobre el aroma, la liberación de flavor, la textura y la estabilidad fisicoquímica de los alimentos (Dickinson y Stainsby, 1982; Wedzicha y col., 1991; Coupland y Mc Clements, 1996; Landy, 1996). Cabe destacar que la estabilidad microbiológica de la emulsión también podría verse afectada por esta partición de aditivos entre las fases e interfase, ya que algunos preservadores utilizados en estos sistemas alimenticios tienden a particionarse entre las distintas fases del sistema con la consiguiente pérdida de actividad antimicrobiana en la fase acuosa de la emulsión donde debieran ejercer su acción (Kurup y col., 1991b; Wedzicha y Ahmed, 1994). Ejemplos claros de este fenómeno lo constituyen los ácidos orgánicos débiles como el sórbico y el benzoico.

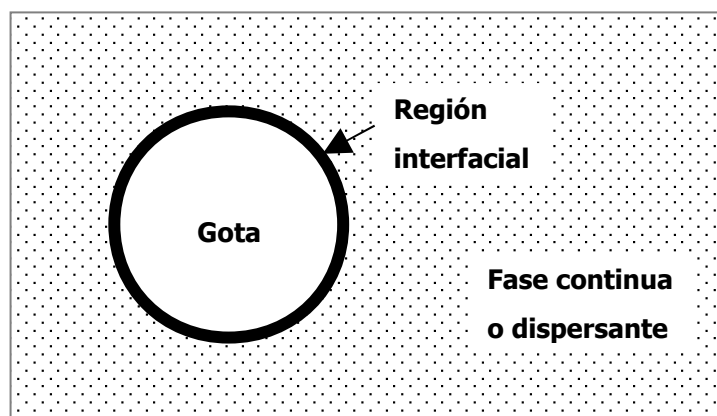


Figura 1.2.2 Regiones que constituyen una emulsión.

1.2.3 Complejidad de las emulsiones alimenticias

Generalmente, las emulsiones alimenticias son mucho más complejas que el sistema de tres componentes (aceite, agua y emulsificante) descrito previamente. La fase acuosa puede contener una gran variedad de ingredientes solubles en agua, incluyendo azúcares,

sales, ácidos, proteínas y otros carbohidratos, tal el caso de los aderezos para ensalada. La fase oleosa usualmente contiene una compleja mezcla de componentes lipofílicos, tales como ácidos grasos libres, esteroides y vitaminas. La región interfacial puede contener una mezcla de varios componentes de superficie activa como proteínas, fosfolípidos, surfactantes, alcoholes y partículas sólidas. Un factor adicional a tener en cuenta es que los alimentos están sujetos a variaciones de temperatura, presión y agitación mecánica durante su producción, almacenamiento y manipulación, los cuales pueden causar alteraciones significativas en sus propiedades generales.

1.2.3.1 Estabilizantes

Según el C.A.A. (2004), los aditivos estabilizantes son sustancias que hacen posible el mantenimiento de una dispersión uniforme de dos o más sustancias inmiscibles en un alimento (Res GMC Nº 088/93). Estos aditivos conforman un amplio grupo de sustancias cuyas propiedades físico-químicas y funcionales difieren considerablemente. Dentro de este grupo, se citan a continuación aquellos aditivos comúnmente utilizados en las emulsiones que son objeto de estudio en esta presentación, los aderezos para ensalada.

1.2.3.1.a Emulsificantes

Los emulsificantes, también denominados surfactantes, son sustancias que se agregan al alimento para aumentar su estabilidad y alcanzar una vida útil aceptable. La función de un emulsificante es unir las fases acuosa y oleosa de una emulsión para dar una preparación homogénea y estable (Waginaire, 1997). Por definición, un surfactante es una molécula anfifílica que tiene una "cabeza" hidrofílica, con una alta afinidad por el agua, y una "cola" lipofílica con una alta afinidad por la fase oleosa (Myers, 1988). Las características de un surfactante en particular dependen de la naturaleza de sus extremos hidrofílicos y lipofílicos. La "cabeza" hidrofílica puede ser: aniónica, catiónica, anfotérica y no-iónica (Myers, 1988; Zielinski, 1997). La selección del emulsificante se basa en las características finales del producto, la metodología empleada para la preparación de la emulsión, la cantidad de emulsificante añadido, las características físicas y químicas de cada una de las fases y la presencia de otros componentes funcionales en la emulsión. Los emulsificantes cubren un amplio rango de funciones en los alimentos. El más obvio es el de asistir a la estabilización y formación de emulsiones por reducción de la tensión superficial en la interfase aceite-agua. Los ejemplos más comunes de esta función son la mayonesa y la margarina. Una función adicional es la de alterar las propiedades funcionales de otros componentes del alimento. Por ejemplo, el uso de emulsificantes en productos de panadería

donde actúan como ablandadores de migas y de masas. En golosinas, se usan para modificar la cristalización de las grasas, evitando alteraciones en su aspecto (Mahungu y Artz, 2001).

Los surfactantes se agregan espontáneamente en solución para formar una serie de estructuras estables conocidas como coloides de asociación. Éstos pueden ser micelas, bicapas, vesículas y micelas revertidas. Estas estructuras se adoptan porque minimizan el área de contacto desfavorable entre las colas no polares de las moléculas de surfactante y el agua (Hiemenz, 1986; Evans y Wennerstrom, 1994). Los coloides de asociación se mantienen juntos por interacciones físicas que son relativamente débiles comparadas con la energía térmica y, por lo tanto, sus estructuras son altamente dinámicas y flexibles (Israelachvili, 1992). Un surfactante forma micelas en solución acuosa cuando su concentración excede un nivel crítico, conocido como *concentración micelar crítica* ó CMC (Myers, 1988). Por debajo de la CMC, las moléculas de surfactante están dispersas, predominantemente como monómeros, pero una vez que se excede la CMC, cualquier molécula adicional de surfactante forma micelas y la concentración de monómeros permanece bastante constante (Hiemenz, 1986). Cuando un surfactante se añade a una solución por encima de su CMC, el *número* de micelas tiende a aumentar (McClements, 1999).

Dentro de los emulsificantes no-iónicos, los ésteres del sorbitano polioxietilenados (compuestos denominados comúnmente Tween®) poseen características hidrofílicas debido a la presencia de las cadenas de oxietileno, que en general están compuestas por veinte residuos de este óxido. Pueden estar esterificados por una o tres moléculas de ácido graso. Conocidos mayormente como polisorbatos, se nombran como: polisorbato 20, 60 u 80; estos se encuentran esterificados por una molécula de ácido láurico, esteárico y oleico, respectivamente. El Tween®20 es el emulsificante empleado habitualmente en la producción de aderezos. Tanto el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) (2004), como el Codex Alimentarius y la United States Food and Drug Administration (FDA), aprueban su empleo en este tipo de productos alimenticios (Mahungu y Artz, 2001).

1.2.3.1.b Agentes espesantes

Las gomas constituyen los agentes estabilizantes y espesantes por excelencia en la producción de alimentos; como son sustancias hidrofílicas y se dispersan en solución como los coloides, se han denominado hidrocoloides. Muchos hidrocoloides se utilizan ampliamente por las singulares características texturales, estructurales y funcionales que imparten a los alimentos, proporcionando estabilidad a emulsiones, suspensiones y espumas y por sus propiedades espesantes en general. La mayoría de estos productos proceden de fuentes naturales, como semillas, exudados de plantas, algas y

microorganismos, aunque otros se modifican químicamente para conseguir las características deseadas. Muchos estabilizantes y espesantes son polisacáridos, como la goma arábica, goma guar, goma xántica, carboximetilcelulosa, carragenato, almidón y pectinas (Lindsay, 1993). La gelatina, proteína derivada del colágeno, es uno de los pocos estabilizantes no carbohidratos de amplia utilización, junto con la caseína. Las propiedades generales de los hidrocoloides incluyen el alto grado de solubilización en agua, la capacidad de incrementar la viscosidad y, en ocasiones, la de formar geles. Algunas funciones específicas de los mismos incluyen mejora y estabilización de la textura, inhibición de la cristalización (azúcar y hielo), estabilización de las emulsiones y espumas y mejora de la formación del recubrimiento de azúcar (disminuyen su pegajosidad) en algunos productos de pastelería (Klose y Glicksman, 1972). Los hidrocoloides se utilizan generalmente a concentraciones del 2%, o inferiores, ya que muchos presentan una capacidad limitada de dispersión y la funcionalidad deseada se logra a esas concentraciones. En muchas ocasiones la eficacia de los hidrocoloides está relacionada con su capacidad de aumentar la viscosidad. Por ejemplo, este es el mecanismo por el cual los hidrocoloides estabilizan las emulsiones aceite en agua (Lindsay, 1993).

La goma xántica es un exopolisacárido producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* y puede considerarse un polielectrolito aniónico. Su estructura primaria consiste en un esqueleto de glucosas unidas por enlaces β -1,4, como en la celulosa, pero cada dos residuos de glucosa existe una cadena lateral constituida por un trisacárido cargado de unidades de β -D-manopiranosil- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucuronopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-o-acetil- β -D-manopiranosil y, aproximadamente la mitad de ellos tienen un ácido pirúvico unido al acetal cíclico (BeMiller y Whistler, 1996). El éxito comercial de esta goma se debe a su elevada viscosidad, tolerancia al NaCl, estabilidad térmica y compatibilidad para ser utilizada en alimentos (Kwon y col., 1987). Cada molécula está constituida por unos 7000 pentámeros, su peso molecular se encuentra en el rango comprendido entre 0,9-1,6 millones Da y es menos polidispersa que la mayoría de los hidrocoloides. Las moléculas de goma xántica que poseen mayor proporción de ácido pirúvico son las que originan soluciones de mayor viscosidad y estabilidad térmica (BeMiller y Daniels, 2002).

1.2.3.1.c Agentes complejantes

Los agentes complejantes, quelantes o secuestrantes, desempeñan un papel fundamental en la estabilización de los alimentos al reaccionar con los iones metálicos y alcalinotérreos para formar complejos que alteran las propiedades de los iones y sus efectos sobre los alimentos. Muchos de los agentes quelantes empleados en la industria alimentaria son sustancias naturales, como los ácidos policarboxílicos (cítrico, málico, tartárico, oxálico y succínico), ácidos polifosfóricos (trifosfato de adenosina y pirofosfato) y macromoléculas

(porfirinas y proteínas). Muchos metales se encuentran naturalmente en forma de complejos. Algunos ejemplos son: el magnesio en la clorofila; cobre, hierro, zinc y manganeso en diferentes enzimas; hierro en proteínas como la ferritina y también el hierro en el anillo porfirínico de la mioglobina y hemoglobina. Cuando estos iones son liberados por reacciones de tipo hidrolítico u otros procesos degradativos, participan en estado libre en reacciones que originan cambios de color, rancidez oxidativa, turbidez y cambios del sabor de los alimentos. Los agentes quelantes se añaden para formar complejos con estos iones metálicos y estabilizar así los alimentos (Lindsay, 1993).

Cualquier molécula o ión con un par de electrones no compartidos se puede coordinar o formar complejos con los iones metálicos. De este modo, los compuestos que contengan dos o más grupos funcionales, como $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{S}-$, y $-\text{O}-$, en la disposición espacial apropiada entre sí, pueden complejar metales en un medio físico favorable. Los agentes secuestrantes más comúnmente utilizados en los alimentos son el ácido cítrico y sus derivados, diferentes fosfatos y las sales del ácido etilendiaminotetracético (EDTA). El EDTA forma quelatos de gran estabilidad con el calcio, debido a la coordinación inicial en la que participan los pares de electrones de sus átomos de nitrógeno y los pares de electrones libres de los átomos de oxígeno aniónico de los dos grupos carboxilo restantes, resultando así la formación de un complejo sumamente estable que utiliza sus seis grupos donadores de electrones (Skoog y col., 1996).

Además de las consideraciones estéricas y electrónicas, factores tales como el pH influyen en la formación de quelatos metálicos fuertes. El grupo ácido carboxílico no ionizado no es un eficaz grupo donador, pero el ión carboxilato reacciona eficazmente. El aumento moderado del pH (es decir, la reducción de la concentración de H^+ en el medio) permite la disociación del grupo carboxilo y mejora la eficacia de la complejación (Lindsay, 1993).

Los sustancias secuestrantes no son antioxidantes en el sentido de que impidan la oxidación porque actúen de consumidores de oxígeno; sin embargo, se comportan como valiosos antioxidantes sinérgicos porque eliminan los iones metálicos que catalizan el proceso de oxidación (Furia, 1972). Las sales de EDTA son empleadas comúnmente en la formulación de mayonesas y aderezos para ensalada, ya que son solubles en la fase acuosa de la emulsión y actúan como eficaces antioxidantes. Las sales del ácido cítrico protegen las cadenas laterales insaturadas de triglicéridos y otros componentes y previenen su oxidación por el aire.

1.3 ADEREZOS PARA ENSALADA

1.3.1 Generalidades

Los aderezos para ensalada fabricados comercialmente comenzaron a aparecer en el mercado alrededor de 1912 (Worrel, 1951). Las mayonesas, los aderezos a base de mayonesa y los aderezos vertibles son los productos más comúnmente comercializados. Cualquier proceso térmico destruiría la integridad física de estos productos (produciría la ruptura de la emulsión), por lo que la preservación de los mismos usualmente depende de la disminución del pH, por agregado de ácido acético y/o cítrico, de la depresión de la actividad de agua, por adición de cloruro de sodio, y de la inclusión de preservadores tales como ácido sórbico y/o benzoico y de EDTA. El pH del producto oscila habitualmente entre 2,9 y 4,4 (Meyer y col., 1989), condición de la cual resulta principalmente responsable la presencia de ácido acético.

El ácido acético y otros ácidos orgánicos, como el cítrico, resultan importantes ya que confieren al producto su flavor característico y a su vez constituyen los agentes preservadores primarios.

El contenido de aceite de los aderezos varía ampliamente desde valores cercanos a 0,5% hasta 60%. Los valores más altos corresponden a formulaciones de mayonesas, los cuales pueden alcanzar el 85% de contenido de aceite. Los aderezos se diferencian por poseer un menor contenido de aceite y estar mucho más sazonados (Sheldrake, 2003). La amplitud de niveles de aceite atiende a necesidades del mercado ya que permite a los consumidores seleccionar el producto de acuerdo al contenido calórico, los niveles de grasas y, por supuesto, el sabor y textura del producto (Pszczola, 2001). Los aceites comestibles más comúnmente utilizados son los de girasol y maíz, aunque actualmente se han introducido fuentes de ácidos grasos omega-3 y alfa-linolénico tales como los aceites de oliva, canola y soja, los cuales pueden ayudar a prevenir el riesgo de enfermedades coronarias, de acuerdo a un estudio publicado en 1999 en el *American Journal of Clinical Nutrition* (Pszczola, 2001).

Tradicionalmente, los aderezos se elaboran con aceite, vinagre, agua y varios ingredientes adicionales que proveen el flavor particular de cada tipo de aderezo. Tales ingredientes resultan tan variados como tomates, especias, vegetales en trozos, frutas secas, quesos, miel, etc. A partir de la década del '80, se comenzaron a elaborar aliños menos ácidos (con menor contenido de vinagre) y reducidos en calorías (con menor contenido lipídico). Con ambas reducciones, la estabilidad microbiológica del producto puede verse comprometida puesto que al descender el contenido de ácido acético, el pH aumenta, y, al disminuir el contenido de aceite, se incrementa la fase acuosa, lo que a su vez

disminuye la concentración de sales y de ácidos orgánicos en esta fase (Smittle y Cirigliano, 1994).

Worrel (1951) sugiere que la vida útil de un aderezo correctamente preparado debe ser de 3 a 6 meses. Sin embargo, es común que la industria disponga tiempos más prolongados de vida útil para estos productos (entre 9 y 12 meses). Smittle y Cirigliano (1994) informaron que la vida de anaquel de los distintos aderezos se halla dictada mayormente por las características físicas y químicas del producto más que por su estabilidad microbiológica.

1.3.2 Deterioro de aderezos con especial referencia al de tipo microbiológico

Los aderezos pueden deteriorarse por: i) desestabilización de la emulsión, ii) oxidación e hidrólisis de los aceites por procesos estrictamente químicos y iii) debido al crecimiento de microorganismos (Frazier, 1967).

Los microorganismos presentes en los aderezos provienen de los ingredientes, del equipamiento utilizado en su elaboración y del ambiente. Pocas especies son capaces de sobrevivir al bajo pH de estos productos y, estas pocas especies aparecen generalmente en reducidas cantidades (Fabian y col., 1950; Kurtzman y col., 1971). La flora microbiana aislada de nueve marcas comerciales de aderezos por Muriana y Kanach (1995) incluyó bacilos (*Lactobacillus* spp. y otros), cocos (*Micrococcus* spp. y otros), y levaduras (*Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*); en todos los casos, los recuentos microbianos obtenidos fueron menores a 10^2 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC.g⁻¹). De un total de 10 aderezos no deteriorados examinados por Kurtzman y col. (1971), nueve resultaron estériles y uno contenía *B.subtilis* y *B.licheniformis*, pero con menos de 50 organismos por gramo.

De acuerdo con Smittle (1987), el deterioro microbiano de mayonesas ha sido representado por especies de *Hansenula*, *Pichia*, *Geotrichium*, *Saccharomyces* y *Lactobacillus*. La fuente de contaminación se atribuye a equipamiento no higiénico tales como máquinas de mezclado, bombeo y alimentación que no se limpian frecuentemente. Probablemente, tal equipamiento se contamina inicialmente por niveles bajos de organismos deteriorativos presentes en los ingredientes y, en raras ocasiones, a partir de los aerosoles que se crean durante las operaciones de limpieza. La contaminación superficial de aderezos también puede resultar de contaminantes presentes en el aire. En una oportunidad se encontraron mohos y levaduras formadoras de película en aderezos cuyos recipientes contaban con grandes espacios de cabeza o tapas cerradas parcialmente, donde las cantidades de aire disponibles eran óptimas para su crecimiento.

En cuanto al crecimiento de microorganismos patógenos, hay cuatro bacterias que podrían estar presentes en los aderezos: *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157 (Pourkomailian, 2000). Sin embargo, varios autores aseguran que en los últimos años no se han reportado incidentes que involucren el crecimiento de patógenos en aderezos producidos comercialmente (Smittle, 2000; Smittle y Cirigliano, 1994).

La acidez de los aderezos para ensalada (pH promedio: 3,6) es el factor responsable de la ausencia de microorganismos patógenos. Los productos formulados con valores de pH superiores a 4,6 debieran ser examinados para evaluar la presencia de microorganismos riesgosos para la salud (Smittle y Cirigliano, 1994). El mezclado de los aderezos en ensaladas que contienen carne, papas o diversos vegetales diluye el contenido de ácido acético y, por lo tanto, disminuye sus propiedades inhibitorias (Gould y col., 1976; Brocklehurst y Lund, 1984). Sin embargo, según otros autores (Rappaport y col., 1975; Smittle, 1977), la mayonesa y los aderezos frecuentemente retienen muchas de sus características inhibitorias cuando se mezclan con carne y vegetales, e incluso se recomienda que, cuando se usan estos ingredientes en ensaladas, se los mezcle tan pronto como sea posible y se los refrigere a fin de retardar el crecimiento microbiano (Smittle, 1977).

El deterioro microbiológico se manifiesta frecuentemente por la formación de gas que empuja el contenido del producto hacia fuera y provoca la apertura del recipiente que lo contiene. Pueden presentarse también otros indicadores de deterioro tales como off-flavor y cambios en el color, olor o textura del aderezo (Smittle y Cirigliano, 1994).

Las levaduras frecuentemente causan deterioro en una variedad de aliños. Fabian y Wethington (1950) encontraron una especie de *Saccharomyces* en un aderezo tipo "French" y en mayonesa y, Williams y Mrak (1949) mostraron que una levadura similar a *Saccharomyces globiformis* (*Z.bailii*?) causó el deterioro de aderezos a base de almidón. Dos tercios de las muestras de aderezos contaminados examinadas por Kurtzman y col. (1971) contenían *Zygosaccharomyces bailii*. Dichas muestras provenían de distintas áreas de Estados Unidos, por lo que se infiere que *Z.bailii* es la levadura primordialmente responsable del deterioro de aderezos.

Lactobacillus fructivorans fue aislado por primera vez de un aderezo deteriorado por Charlton y col. (1934) y luego se comprobó que éste era un organismo deteriorativo habitual que requiere un medio especial de aislamiento (Kurtzman y col., 1971). Cirigliano (1985) y Smittle (1987) han reportado que los aderezos para ensalada se contaminan frecuentemente por *L.plantarum*, *L.buchneri*, *L.fermentum*, *L.brevis*, *L.fructivorans* y, ocasionalmente, por *L.cellobiosus*. La fermentación productora de gases puede no hacerse evidente en los aderezos contaminados hasta después de varias semanas de elaborados. *L.fructivorans* y los demás lactobacilos mencionados crecen lentamente y necesitan un tiempo considerable para

que se produzca un aumento de la población microbiana y una concentración de gases visible. El deterioro puede detectarse, algunas veces, sólo por un incremento en el sabor ácido o cambios en el flavor, especialmente cuando el deterioro se debe a lactobacilos homofermentativos, tales como *L.casei* y *L.plantarum*. Este crecimiento lento se hace particularmente evidente en las placas de aislamiento, ya que se requieren entre 10 y 14 días antes de poder observar las colonias bacterianas (Kurtzman y col., 1971). Pareciera que este hecho, sumado a la falta de un medio adecuado de aislamiento, es el responsable de los escasos reportes acerca de *L.fructivorans* en aderezos deteriorados (Smittle y Cirigliano, 1994).

En base a lo anteriormente expuesto, *Z.bailii* y *L.fructivorans* son los principales responsables del deterioro microbiológico de los aderezos para ensalada y por ello resulta de interés su estudio. En la siguiente sección se mencionan las principales características de estos microorganismos.

1.3.2.1 ***Zygosaccharomyces bailii***

Esta levadura tiene una excepcional tolerancia a: preservadores, alto contenido de azúcar, elevada acidez y regímenes de pasteurización (Thomas y Davenport, 1985). Pitt (1974) reportó que *Z.bailii* es muy resistente a preservadores tales como los ácidos acético y benzoico. Esto se debe primariamente a un mecanismo excretorio dependiente de energía (Warth, 1977). Esta levadura ha sido capaz de crecer incluso a pH 3,0 en presencia de 250 mg.L⁻¹ de ácido sórbico (Praphailong y Fleet, 1997).

En general, los productos contaminados por *Z.bailii* tienen bajo pH, baja actividad de agua, contienen suficientes cantidades de azúcares fermentables y/u otros compuestos carbonados asimilables (por ejemplo, alcohol, glicerol y ácido acético), una fuente de nitrógeno, una fuente de vitaminas esenciales del grupo B y preservadores tales como los ácidos acético, benzoico y sórbico ó dióxido de azufre. La naturaleza y extensión del deterioro causado varían con la composición química, las condiciones físicas de envasado y el almacenamiento de cada producto; puede producirse suficiente presión debida a la formación de gas como para explotar botellas, romper latas y reventar tetrapaks. Las modificaciones sensoriales incluyen cambios de color, formación de aerosoles, carbonatación y off-flavor por producción de H₂S, ácido acético y ésteres frutados (Thomas y Davenport, 1985).

Z.bailii fermenta la fructosa y la glucosa rápidamente, pero puede presentar una fermentación demorada de sacarosa. Esto explica el largo período entre la elaboración y el deterioro de los productos contaminados con esta levadura cuando la sacarosa es el azúcar utilizado como endulzante. Kurtzman y col. (1971) mostraron que 9 de 13 cepas de *Z.bailii*

fermentaron sacarosa en aderezos para ensalada, pero esta fermentación no comenzó hasta los 12 a 56 días después de su inoculación.

1.3.2.2 *Lactobacillus fructivorans*

Esta bacteria láctica heterofermentativa fue aislada por primera vez a partir de aderezos y mayonesas (Charlton y col., 1934); no obstante, su presencia se reportó también en salsas a base de tomate (Bjorkroth y Korkeala, 1997), alimentos preservados con vinagre (Dakin y Radwell, 1971), sake, vinos de postre y aperitivos (Hammes y col., 1995). *L.fructivorans* presenta entonces una gran tolerancia a ambientes en los cuales la elevada acidez, presencia de los ácidos acético y sórbico (o benzoico) y/o etanol son característicos.

El aislamiento de este lactobacilo resulta difícil y la identificación de la especie del género *Lactobacillus* usando métodos clásicos de testeo fisiológico no es siempre suficiente (Hammes y col., 1995). Por lo general, se utilizan métodos microbiológicos tradicionales junto con técnicas moleculares para su caracterización (Bjorkroth y Korkeala, 1997). El crecimiento de esta bacteria en agar nutritivo es muy lento, alcanzándose períodos de incubación superiores a los diez días. Es por ello que la enumeración de las colonias puede facilitarse si se incuban las placas en una atmósfera enriquecida con CO₂ y se suplementa el medio de cultivo con fructosa (Smittle y Flowers, 1982); esto permite obtener un recuento confiable al cabo de sólo cinco días de almacenamiento.

1.3.3 Factores de estrés microbiano utilizados para la preservación de aderezos

Los factores de estrés empleados para prevenir la proliferación microbiana en aderezos para ensaladas incluyen:

* Disminución del pH, alcanzada por la utilización de ácido acético, como ácido predominante, cuya presencia establece el pH final del producto. Pueden emplearse también ácido cítrico, por lo general aportado por jugo de limón, ácido láctico o tartárico. El pH de estos alimentos se encuentra en el rango de 2,9 a 4,4 (Meyer y col., 1989).

* Depresión de la actividad de agua (hasta valores de 0,925, según Smittle y Cirigliano, 1994). Los ingredientes más usados para alcanzar esta condición son cloruro de sodio y sacarosa, pero se ha reportado también el empleo de miel, cloruro de potasio y polioles, tales como sorbitol y manitol (Pszczola, 2001).

* Agregado de aditivos antimicrobianos. Los más comúnmente utilizados son sorbato de potasio y benzoato de sodio. Si bien se emplean ambos agentes antimicrobianos, el sorbato de potasio resultaría más inhibitorio en este tipo de productos, ya que la cantidad de ácido no disociado, al pH de los aderezos, es mayor para el ácido sórbico que para el benzoico (Wind y Restaino, 1995). También se ha reportado el uso de bacteriocinas, como pediocina (Cleveland y col., 2001) y nisina (Pourkomialian, 2000; Deem, 2006).

1.3.3.1 Disminución del pH y depresión de la actividad de agua

Según Meyer y col. (1989), el límite aparente de crecimiento para *Z. bailii* en aderezos es de aproximadamente pH 3,5 y a_w 0,89. *L. fructivorans* es capaz de crecer en aderezos a valores de pH tan bajos como 3,5, pero sólo cuando la a_w se halla por encima de 0,95. La figura 1.3.1 revela las condiciones bajo las cuales estos microorganismos contaminantes se desarrollan, o no lo hacen, en un aderezo. El polígono ABCDE encierra las combinaciones de pH y a_w que asegurarían la estabilidad microbiológica de los aderezos a la vez que se consiguen buena palatabilidad y bajos costos de producción. Si el pH de un aderezo está por debajo de aproximadamente 3,2, el flavor del producto es indeseable y debe ser mejorado, seguramente con la inclusión de azúcares. Esto puede ser desfavorable en la producción de aderezos reducidos en calorías. La reducción de la a_w a valores por debajo de los representados por el polígono, requiere que el aderezo contenga concentraciones relativamente altas de solutos o de aceite vegetal (Troller y Christian, 1978). Esto puede tener implicancias comerciales y también puede resultar desfavorable en la elaboración de aderezos bajos en calorías. La región dentro del polígono ABCDE representa un balance entre estabilidad microbiológica, flavor y costo de producción.

1.3.3.2 Agregado de aditivos antimicrobianos

Los conservantes juegan un importante papel para prevenir las alteraciones y asegurar la calidad higiénica de muchos alimentos. Dentro de este gran grupo de compuestos se encuentran: sulfitos y dióxido de azufre, nitritos y nitratos y ácidos orgánicos débiles, entre otros. Dada la magnitud de la información que hace referencia a estos compuestos, se abordan en el presente texto sólo aquellos agentes antimicrobianos utilizados en este trabajo, esto implica a los preservadores derivados de ácidos orgánicos débiles como los sorbatos, a los antimicrobianos naturales de origen bacteriano, como la nisina, y a otros aditivos con actividad antimicrobiana usualmente presentes en los aderezos.

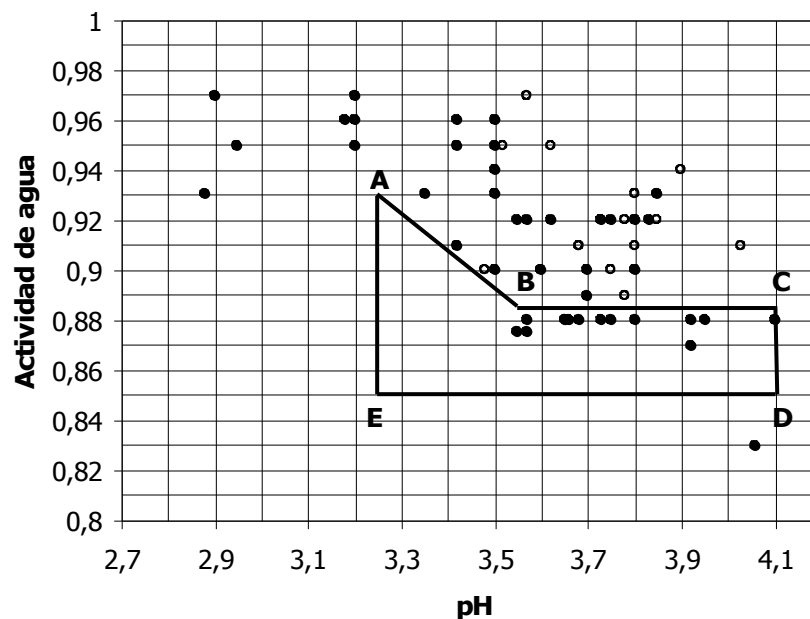


Figura 1.3.1 Efectos del pH y la a_w sobre el crecimiento de la flora deteriorativa de aderezos. Los círculos llenos representan ausencia de crecimiento y los vacíos representan crecimiento. El polígono ABCDE representa la zona dentro de la cual el aderezo se mantiene estable. Adaptado de Meyer y col. (1989).

1.3.3.2.a Antimicrobianos derivados de ácidos orgánicos débiles

Los antimicrobianos derivados de ácidos orgánicos débiles utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos y bebidas constituyen el ejemplo más común y clásico del uso de agentes conservantes químicos. Entre ellos, los más utilizados son los ácidos benzoico y sórbico. Estas moléculas inhiben el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias; el ácido sórbico también es capaz de inhibir la germinación y el desarrollo de esporas bacterianas (Sofos y Busta, 1981; Blocher y Busta, 1985).

Los antimicrobianos de ácidos débiles parecen compartir un modo común de acción, a pesar de sus variadas estructuras químicas. Todos se hacen más potentes como agentes antimicrobianos a valores de pH ácido. En solución acuosa, los ácidos débiles existen en un equilibrio, dependiente del pH, entre moléculas del ácido sin carga y sus respectivos aniones cargados, por ejemplo: ácido benzoico/benzoato. La proporción de ácido sin disociar aumenta a medida que el pH disminuye. Se acepta generalmente que sólo los ácidos no disociados poseen actividad antimicrobiana, aunque se ha sugerido que los aniones también poseen cierta actividad (Eklund, 1989).

En presencia de sustancias antimicrobianas, el desarrollo de los microorganismos presenta fases de latencia muy extendidas, que duran días e incluso

semanas, el crecimiento es pobre y la duplicación celular se ve ampliamente reducida. Freese y col. (1973) han reportado una inhibición de la respiración y el transporte activo. Se cree que el mecanismo de acción de los ácidos débiles involucra la difusión de moléculas de ácidos lipofílicos (HA) a través de la membrana plasmática hasta el citoplasma (Stratford y Rose, 1986). Allí, las moléculas de ácido encuentran un pH cercano a la neutralidad y se ven forzadas a disociarse en iones cargados (A^-). Estos iones no pueden atravesar la membrana plasmática y por lo tanto se concentran dentro de la célula (Figura 1.3.1). La disociación de cada molécula de ácido débil dará un protón y el citoplasma se tornará progresivamente más ácido. La acidificación del citoplasma puede prevenir el crecimiento por inhibición de la glicólisis (Krebs y col., 1983), por prevención del transporte activo (Freese y col., 1973) o por interferencia con las señales de transducción (Thevelein, 1994). La respuesta celular a la inhibición causada por ácidos débiles podría involucrar la remoción de estos preservadores por un eflujo de bombeo (Warth, 1989), aunque la evidencia de este fenómeno es discutida (Cole y Keenan, 1987). De mayor importancia resultaría la enzima unida a la membrana, H^+ -ATPasa. Ésta ha sido presentada como responsable del mecanismo de resistencia a los ácidos débiles (Cole y Keenan, 1987; Vallejo y Serrano, 1989), aunque este rol continúa siendo cuestionado dado que si el pH interno fuera aumentado por un bombeo de protones hacia afuera de la célula, moléculas adicionales de ácidos débiles podrían penetrar la célula y re-acidificar el citoplasma. En conclusión, la molécula de preservador difunde dentro de la célula hasta que se alcanza el equilibrio de acuerdo con el gradiente de pH a través de la membrana, resultando en una acumulación de aniones y protones dentro de la célula (Booth y Kroll, 1989). Entonces, la inhibición del crecimiento mediado por ácidos débiles puede ser debida a una serie de acciones, dentro de las cuales se han propuesto: rotura de membrana (Freese y col., 1973 y más recientemente, Stratford y Anslow, 1998; Bracey y col., 1998), inhibición de reacciones metabólicas esenciales (Krebs y col., 1983), stress sobre la homeóstasis del pH intracelular (Salmond y col., 1984; Cole and Keenan, 1987; Bracey y col., 1998) y la acumulación de aniones tóxicos (Eklund, 1985). En levaduras, también se ha propuesto que la acción inhibitoria de los ácidos débiles propiamente dichos podría ser debida a la inducción de una respuesta al estrés, energéticamente costosa, que atendería a restaurar la homeóstasis y resultaría en la reducción de la energía disponible para el crecimiento y otras funciones metabólicas esenciales (Hoyoak y col., 1996; Bracey y col., 1998).

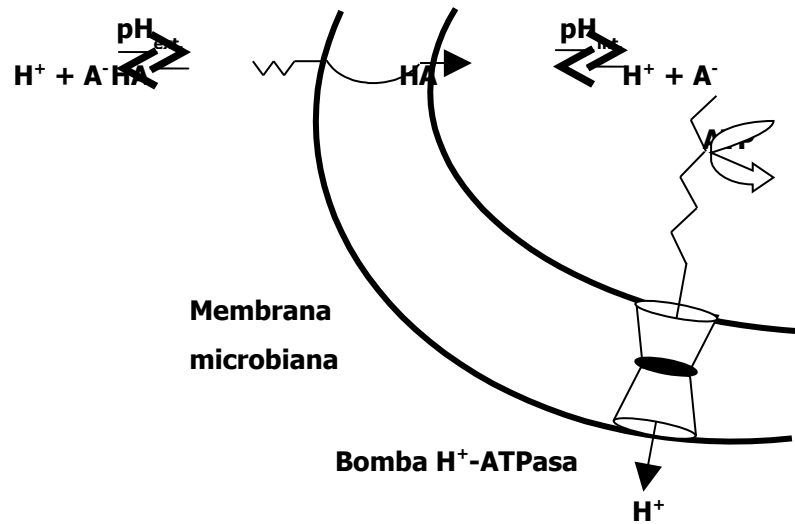


Figura 1.3.2 Comportamiento de un ácido lipofílico débil en presencia de una célula microbiana. Adaptado de Lambert y Stratford (1999).

1.3.3.2.b Antimicrobianos de origen bacteriano

Las bacterias representan una fuente natural de péptidos antimicrobianos, los cuales han sido incorporados a la preservación de alimentos con la denominación de "bacteriocinas". Éstas conforman un grupo heterogéneo que varía en el espectro de actividad, el modo de acción, los pesos moleculares, el origen genético y las propiedades bioquímicas (Abee y col., 1995). Fueron caracterizadas primariamente a partir de bacterias gram-negativas, siendo las colicinas de *E. coli*, las más estudiadas (Lazdunski, 1988). Entre las bacterias gram-positivas, las bacterias ácido-lácticas (BAL) han sido cabalmente explotadas como un reservorio de péptidos antimicrobianos con aplicaciones en la industria alimentaria (Cleveland y col., 2001). Las principales bacteriocinas producidas por BAL incluyen: (I) lantibióticos, (II) péptidos pequeños termoestables, (III) grandes proteínas termolábiles y (IV) proteínas complejas cuya actividad requiere la asociación a carbohidratos o lípidos (Klaenhammer, 1993). La actividad inhibitoria de estas sustancias está limitada a bacterias gram-positivas y la inhibición de las bacterias gram-negativas no ha sido demostrada hasta el presente, una observación que puede ser explicada mediante el análisis y la comparación detallados de la composición de las paredes celulares de las bacterias gram-positivas y gram-negativas (Abee y col., 1995). En ambos tipos, la membrana

citoplasmática que forma el límite entre el citoplasma y el ambiente externo está rodeada por una capa de peptidoglicano que es significativamente más delgada en las bacterias gram-negativas que en las gram-positivas. Las bacterias gram-negativas poseen una capa adicional, denominada membrana externa, la cual está compuesta de fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (LPS); esta membrana resulta impermeable a la mayoría de las moléculas. Sin embargo, la presencia de porinas en esta capa permite la libre difusión de moléculas con una masa molecular por debajo de 600 Da. Las bacteriocinas más pequeñas producidas por las BAL son de aproximadamente 3kDa y por lo tanto resultan demasiado grandes para alcanzar su objetivo, la membrana citoplasmática (Klaenhammer, 1993; Stiles y Hastings, 1991). De todos modos, Stevens y col. (1991), Ray (1993) y Gänzle y col. (1999), entre otros, han demostrado que especies de *Salmonella*, *E. coli* (incluida la cepa enterohemorrágica O157:H7) y otras bacterias gram-negativas, se tornan sensibles a la nisina después de la exposición a tratamientos que cambian las propiedades de permeabilidad de la membrana externa. Algunos de los tratamientos incluyen el empleo de EDTA, propilparabenos y cloruro de sodio, la aplicación de presión hidrostática, calor, congelación y descongelación (Kalchayanand y col., 1994; Hauben y col., 1996; Schved y col., 1996).

En general, las bacteriocinas se sintetizan en los ribosomas e inactivan a las bacterias que están relacionadas estrechamente con las bacterias productoras (Klaenhammer, 1993). Como se aíslan a partir de alimentos como carne y productos lácteos, los cuales normalmente contienen BAL, las bacteriocinas han sido consumidas por siglos, ignorándose su presencia. Un estudio de 40 cepas salvajes de *Lactococcus lactis* mostró que 35 de ellas producían nisina (Hurst, 1981). La nisina ha sido aprobada en aproximadamente 40 países y se emplea como preservador de alimentos hace más de 50 años. Sin embargo, no se considera "natural" cuando es aplicada en concentraciones que exceden las cantidades que se encuentran naturalmente en alimentos fermentados con una cepa iniciadora productora de nisina. El término "natural" también se halla comprometido cuando la bacteriocina es producida por bacterias genéticamente modificadas (Cleveland y col., 2001).

Los "antibióticos" comparten un mecanismo común de acción que involucra la disipación de la Fuerza Protón Motriz (FPM) de la célula sensibilizada (Bruno y Montville, 1993). Se conoce que la nisina actúa sobre vesículas de membrana energizadas para interferir con la FPM, inhibe a su vez la toma de aminoácidos y promueve la salida de los aminoácidos previamente acumulados en la célula (Jung y Sahl, 1991).

Las bacteriocinas son moléculas cargadas positivamente con sitios hidrofóbicos. Se estima que las interacciones electrostáticas con los grupos fosfato cargados negativamente sobre las membranas celulares contribuyen a la unión inicial con la célula "target" (Chen y col., 1997 a y b). Es probable que la porción hidrofóbica se inserte dentro de la membrana, formando poros. Existe un debate respecto al tipo de poros formados por

la nisina y se presentan dos modelos distintos propuestos por varios grupos de investigadores: el modelo de "barrel-stave" (duela de barril) y el de "wedge" (cuña). En el primero, se postula que cada molécula de nisina se orienta perpendicularmente a la membrana, formando un canal de iones que la expande (Ojcius y Young, 1991). De acuerdo al modelo de "wedge", después de que un número crítico de moléculas de nisina se asocia a la membrana, se insertan una al lado de la otra, formando una cuña (Driessen y col., 1995). La composición fosfolípídica de las cepas target y las condiciones medioambientales de pH influyen los valores de Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) (Chen y col., 1997 a y b). Estudios más recientes demostraron la complejidad de la actividad de la bacteriocina (Breukink y col., 1999). En vez de que la formación de poros ocurra indiscriminadamente, pareciera que ciertas "moléculas de anclaje", sobre las membranas de las células target, facilitan la interacción con la bacteriocina, aumentando consecuentemente su efectividad. Este mecanismo ha sido claramente demostrado para nisina, la cual utiliza el lípido II, un precursor del peptidoglicano, como molécula de anclaje sobre la membrana celular susceptible para poder ejercer su acción (Brotz y col., 1998 a y b; Breukink y col., 1999). Por otro lado, un contenido reducido de fosfolípidos celulares, así como también una membrana cuya composición en ácidos grasos haya sido alterada, son factores que han sido asociados con cierta resistencia bacteriana a la nisina (Ming y Daeschel, 1995; Mazzotta y Montville, 1997; Crandall y Montville, 1998).

1.3.3.2.c Otros aditivos que contribuyen a la actividad antimicrobiana en aderezos con especial referencia a las sustancias secuestrantes

Dentro del amplio rango de aditivos disponibles en la industria alimentaria, cierto grupo de compuestos tiene la particularidad de, además de cumplir un rol tecnológico específico en el alimento, contribuir a la efectividad antimicrobiana de los compuestos comúnmente utilizados a tal efecto. En este sentido, las sustancias secuestrantes que se utilizan como estabilizantes del alimento, entre las cuales se incluye al ácido cítrico y a las sales disódicas y de calcio del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), juegan también un importante papel como sustancias que favorecen la actividad de determinados agentes antimicrobianos (Russel, 1991). El EDTA es conocido por potenciar el efecto de los ácidos débiles contra bacterias gram-negativas, mientras que el ácido cítrico inhibe el crecimiento de la bacteria proteolítica *C. botulinum* debido a su actividad quelante de Ca^{2+} (Graham y Lund, 1986).

Parente y col. (1998) reportaron que el efecto bactericida de nisina y leucocina F10 sobre *L. monocytogenes* se incrementó cuando estas bacteriocinas se emplearon en combinación con EDTA.

Helander y col. (1997) discutieron el rol de los quelantes como agentes permeabilizantes de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. De hecho, se sabe que la exposición a ácido cítrico potencia el efecto del monolaurato contra bacterias gram-negativas (Shibasaki y Kato, 1978). Branen y col. (2004) reportaron que bajos niveles de EDTA actúan sinérgicamente con nisina y lisozima contra *L. monocytogenes* y que varias combinaciones de nisina, lisozima y monolaurina con EDTA fueron bactericidas para bacterias gram-negativas como *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas fluorescens*. Por otro lado, el efecto sinérgico del EDTA sobre la actividad de las bacteriocinas se ve completamente anulado por la adición de Calcio y Magnesio (Cutter y Siragusa, 1995).

Con respecto a las levaduras, Brul y col. (1997) han mostrado que el EDTA y la 1,10-o-fenantrolina inhiben el crecimiento de levaduras presumiblemente mediante un efecto inhibitorio sobre la biogénesis normal de la pared celular. Los agentes quelantes intervienen en este efecto a través de su unión con el zinc más que a través de la captación de calcio. Finalmente, los agentes quelantes podrían estar involucrados en la resistencia contra el peróxido de hidrógeno como agente antimicrobiano. Es de destacar que los radicales activos formados en los sitios celulares se encontrarían también disponibles para estos agentes secuestrantes (Marquis, 1994).

1.4 EL ÁCIDO SÓRBICO Y SU SAL DE POTASIO

1.4.1 Descripción: propiedades físicas y químicas

El ácido sórbico (2,4-hexadienoico) y su sal de potasio son denominados, usualmente, sorbatos. Constituyen los preservadores de mayor importancia comercial y se los emplea en numerosas áreas, entre las que se encuentran la alimentación humana y animal, las áreas farmacéutica y cosmética. Su utilidad como antimicrobianos depende de sus propiedades químicas, su reactividad, su solubilidad en agua y su estabilidad.

El ácido sórbico es un compuesto natural presente en el aceite de bayas de serba (fruto del árbol serbal, familia de las rosáceas). Es un ácido monocarboxílico α - β insaturado de cadena lineal (Figura 1.4.1), cuya forma comercial corresponde al isómero trans-trans. El grupo carboxilo es altamente reactivo, pudiendo formar varias sales y ésteres. Las sales de importancia comercial son el sorbato de calcio, de sodio y potasio.

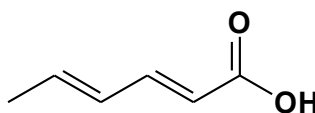


Figura 1.4.1 Estructura química del ácido sórbico.

En la Tabla 1.4.1 se detallan las principales propiedades físicas y químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio, la sal más frecuentemente usada.

El ácido sórbico es arrastrable por vapor, propiedad que es de gran utilidad para su aislamiento e identificación (Lueck, 1976).

Como puede observarse en la Tabla 1.4.2, el ácido sórbico es más soluble en lípidos que en agua y, a medida que se incrementa el pH de una solución acuosa, la solubilidad del preservador en agua aumenta (Lueck, 1976). Este incremento en la solubilidad se debe a la conversión parcial del ácido en sales más solubles.

El conocimiento de la solubilidad del ácido sórbico en diferentes solventes permite estimar la forma más adecuada de adicionar el preservador y optimizar la concentración que será retenida en el medio, en función de la composición del sistema.

Las sales del ácido sórbico son solubles en agua, razón por la cual tienen gran aplicación en alimentos, en especial, el sorbato de potasio por ser la que presenta mayor solubilidad (Tabla 1.4.3), además esta sal presenta mejores características organolépticas y no se han reportado casos de alergenicidad por ella provocados (Sofos, 1989).

Tabla 1.4.1 Propiedades físicas y químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Propiedad	Ácido sórbico	Sorbato de potasio
Masa molar (g/mol)	112,13	150,22
Punto de inflamación (°C)	126	—
Constante de ionización a 25°C	$1,73 \cdot 10^{-5}$	—
Densidad a 20°C (g/ml)	—	1,36
Rango de fusión (°C)	132 – 137	Descomposición por encima de 270°C
Calor de combustión a 25°C (Btu/lb)	11,927	—
Alcalinidad – acidez	—	1,1 ml de NaOH 0,1N a 0,8 ml de HCl 0,1N por cada 1,1g
Presión de vapor a 20°C (mm Hg)	< 0,001	—
Presión de vapor a 120°C (mm Hg)	10	—
Punto de ebullición a 760 mm Hg (°C)	descomposición	—
Punto de ebullición a 50 mm Hg (°C)	143	—

Tabla 1.4.2 Solubilidad porcentual del ácido sórbico y del sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Solvente	Ácido sórbico	Sorbato de potasio
Agua, 20°C (pH 3,1)	0,15	58,20
Agua, 20°C (pH 4,4)	0,22	—
Agua, 20°C (pH 5,9)	1,02	—
Aceite de maíz, 20°C	0,80	0,01
Aceite de soja, 20°C	0,52	—
Aceite de algodón, 20°C	1,00	0,01
Sacarosa, 10%	0,15	58,00
Sacarosa, 60%	0,08	28,00
Cloruro de sodio, 5%	0,11	47,00
Cloruro de sodio, 15%	0,04	12,00 – 15,00
Ácido acético glacial	11,50 – 12,30	—
Ácido cítrico, 50%	0,26	—
Ácido láctico, 85,5%	2,26	—
Etanol, 5%	0,16	57,40
Propilenglicol, 20°C	0,20	55,00
Glicerol, 20°C	0,31	0,20

Tabla 1.4.3 Solubilidad de los sorbatos (Sofos, 1989).

Sorbatos	Solubilidad en agua a 20°C (% m/v)
Sorbato de potasio	58
Sorbato de sodio	28 - 32
Sorbato de calcio	1 - 2

1.4.1.1 Distribución del ácido sórbico entre fases

1.4.1.1.a Sistemas aceite-agua

Una característica esencial de la molécula de ácido sórbico, en función de su actividad como preservador de alimentos, es la habilidad del ácido no disociado de disolverse tanto en agua como en solventes orgánicos, ya que esta propiedad le permite atravesar las membranas microbianas (Eklund, 1989). Entonces, si se tiene ácido sórbico en un sistema aceite-agua, éste se distribuirá entre las dos fases. En el equilibrio esta distribución estará representada por el coeficiente de reparto, P ($P =$ concentración de ácido sórbico en fase oleosa/concentración de ácido sórbico en fase acuosa). La cantidad y naturaleza de los lípidos y la presencia de otros componentes afectan al coeficiente de reparto. Éste es más bajo en sistemas formados por grasas cristalinas y agua que en aquellos formados por aceites y agua (Lubieniecka-von Shelhorn, 1967a y b). Por otra parte, el agregado de componentes solubles como glucosa, sacarosa ó NaCl lo incrementa marcadamente, tal como se aprecia en la Tabla 1.4.4. Es de destacar que es frecuente medir el valor del coeficiente de reparto aparente, P_{app} , el cual considera la cantidad total dada por la suma de las formas disociada y no disociada del ácido al pH de interés, en ambas fases.

Tabla 1.4.4 Coeficientes de partición del ácido sórbico (Sofos, 1989).

Solutos adicionados		Coeficiente de reparto
Sacaros	Cloruro de Sodio	
a		
-	-	3,0
25	-	2,7
50	-	7,0
-	5	3,5
-	10	5,0

1.4.1.1.b Sistemas aceite-agua-surfactante

La mayoría de los alimentos contienen surfactantes. Cuando éstos se encuentran por encima de su concentración micelar crítica, forman grandes agregados conocidos como micelas. Las micelas son entidades químicas formadas por moléculas de surfactante en constante movimiento. A medida que la concentración de surfactante aumenta, estas entidades adoptan formas de plato o disco a diferencia de la conformación esférica que poseen normalmente. El interior no polar de las micelas presenta un ambiente bastante similar al de un solvente orgánico y solutos tales como el ácido sórbico, tenderán a particionarse dentro del interior de las micelas. Por lo tanto, además del reparto del antimicrobiano en aceite y agua, se debe considerar su reparto entre el agua y las micelas, ya que las moléculas de ácido sórbico libres en la fase acuosa estarán en equilibrio con aquéllas disueltas dentro de la micela. En la figura 1.4.2 puede observarse el efecto sobre el

coeficiente de partición aparente aceite-agua del agregado de un surfactante (Tween® 80) al sistema aceite de girasol-agua que contenía ácido sórbico. Allí se hace evidente cómo la adición del surfactante causa una mayor afinidad del preservador por la fase acuosa debido al valor reducido del P_{ap} (Wedzicha y col., 1990). Esta tendencia puede influir de manera diversa en la acción antimicrobiana del preservador.

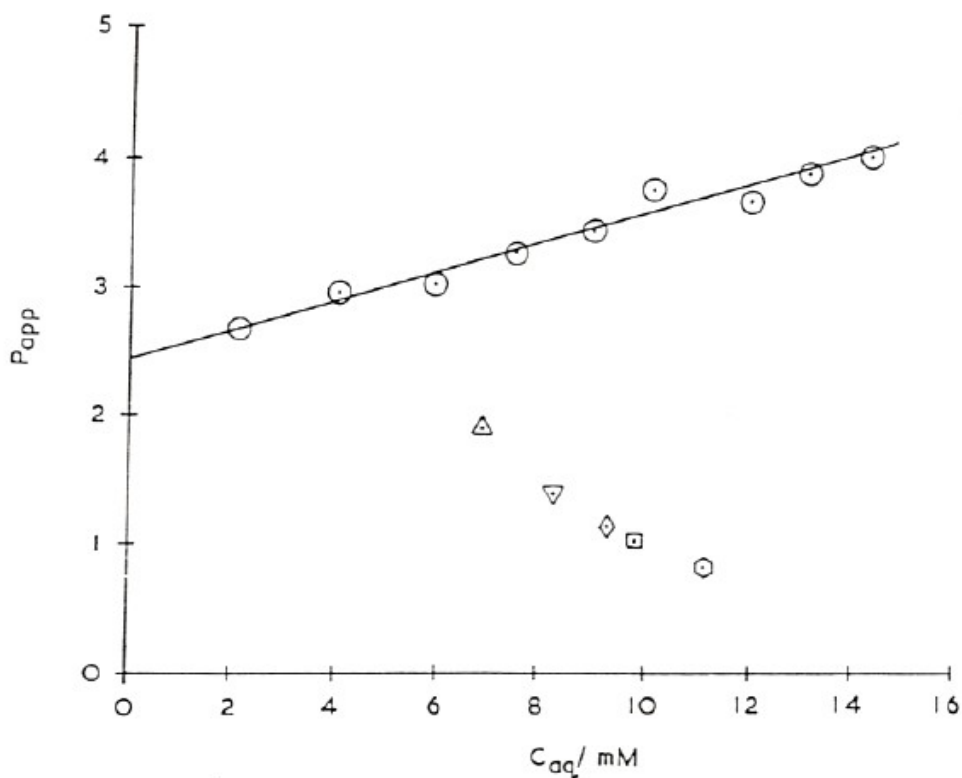


Figura 1.4.2 Distribución del ácido sórbico en el sistema aceite de girasol-Tween® 80-agua. P_{ap} es el coeficiente de partición aparente aceite-agua cuando la concentración total de ácido sórbico en la fase acuosa es C_{aq} . Las concentraciones de Tween fueron las siguientes: □ cero, △ 2%, ▽ 4%, ◻ 6%, ◻ 8%, ◻ 10%. El pH de la fase acuosa fue 2,2 y todas las mediciones se realizaron a $(25,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. (Wedzicha y col., 1990).

1.4.2 Estabilidad química

1.4.2.1 Generalidades

La presencia de dobles enlaces conjugados es una característica que determina el comportamiento químico altamente reactivo del ácido sórbico y sus sales. Como consecuencia de ello, el preservador puede reaccionar con otros componentes presentes en el alimento, y por ende se puede ver comprometida la estabilidad microbiológica y organoléptica del producto.

El ácido sórbico reacciona con amonio, alquilaminas, aminas aromáticas y bencilaminas a altas temperaturas (150 – 200°C). Por lo tanto, debería considerarse que en algunas situaciones, como por ejemplo la cocción del queso a las brasas, podrían formarse compuestos de adición entre el ácido sórbico y las aminas presentes en el producto (Khandelwal y Wedzicha, 1990).

El sistema de dobles enlaces conjugados presente en el ácido sórbico lo hace susceptible al ataque nucleofílico, resultando por lo general en productos mutagénicos. Ferrand y col. (2000) analizaron los derivados cíclicos que resultan de la reacción de adición doble que se da entre el ácido sórbico y varias aminas, bajo condiciones típicas del procesamiento de alimentos (50-80°C), encontrando que ninguno de los productos estudiados presentó actividad mutagénica o genotóxica.

En aditivos saborizantes y aromatizantes pueden encontrarse tioles o residuos de péptidos que contengan cisteína, los cuales pueden interactuar con el ácido sórbico. Además, Wedzicha y Zeb (1990 y 1991) informaron que la presencia de surfactantes (lecitina y Tween® 80) y de seroalbúmina bovina actúan como catalizadores de la reacción entre el ácido sórbico y los tioles.

En un estudio realizado por Namiki y col. (1983) se encontró que, bajo ciertas condiciones, el ácido sórbico y el nitrito de sodio reaccionan conduciendo a la formación de compuestos tales como ácido etilnitroso y el 1,3 dinitrometilpirrol, con actividad genotóxica sobre las bacterias. Binstok y col. (1998) han verificado la formación de ácido etilnitroso por reacción entre sorbato de potasio y nitrito de sodio en sistemas cárnicos.

Sugihara y col. (1997) estudiaron la citotoxicidad de algunos preservadores alimenticios en cultivos de hepatocitos de ratas cargados con ácido linoléico. El sorbato de potasio produjo daño celular en las células cargadas con ácido α -linoléico debido a que indujo a la peroxidación de los lípidos celulares. La ocurrencia de esta peroxidación fue acompañada, a su vez, por una disminución de los niveles celulares de glutatión reducido.

1.4.2.2 Degradación oxidativa

Los sorbatos son estables en estado puro y al abrigo de la humedad, pero, en solución acuosa presentan inestabilidad, degradándose mediante un mecanismo oxidativo (Arya, 1980; Gerschenson y col., 1986), el cual es su principal vía de degradación.

La degradación del ácido sórbico depende del pH, la actividad de agua, la presencia de otros aditivos, las condiciones de almacenamiento y procesamiento (Gerschenson y Campos 1995; Campos y Gerschenson 1996).

Pekkarinen (1969) propuso el mecanismo en cadena de la oxidación del ácido sórbico que se muestra en la Figura 1.4.3.

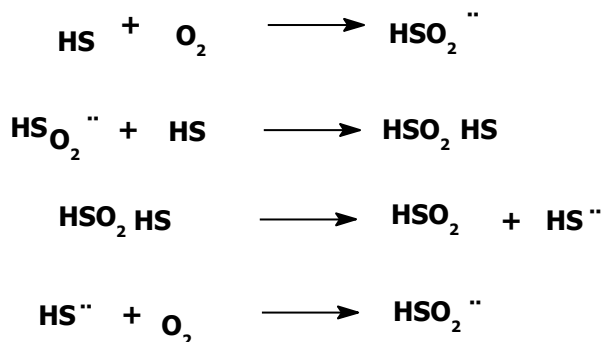


Figura 1.4.3 Mecanismo de oxidación del ácido sórbico. HS: ácido sórbico; $\text{HSO}_2^{\cdot\cdot}$: diradical.

Se conoce que la degradación del sorbato en sistemas acuosos está acompañada de un concomitante incremento en las concentraciones de carbonilos. Arya y Thakur (1988) establecieron que el acetaldehído y la β -carboxiacroleína constituyen alrededor del 80% de los carbonilos totales encontrados en soluciones acuosas de ácido sórbico almacenadas. Además, los carbonilos formados pueden polimerizar rápidamente dando como resultado la formación de pigmentos pardos.

La estructura del di-radical podría ser la que se muestra en la Figura 1.4.4. Este peróxido es lábil y se transformaría en 4,5-cicloperóxido, el cual se descompondría a acetaldehído y β -carboxiacroleína, o bien polimerizaría.

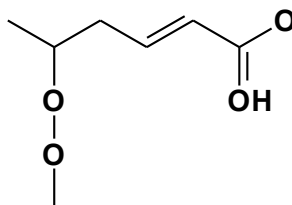


Figura 1.4.4 Estructura química del di-radical intermediario del mecanismo de oxidación del ácido sórbico (Pekkarinen, 1969).

En presencia de aminoácidos, la β -carboxiacroleína se polimeriza rápidamente formando pigmentos pardos. Según Thakur y Arya (1991), cuando hay glicina presente, la

β -carboxiacroleína (aldehído α - β insaturado) se polimeriza más rápidamente que el acetaldehído saturado y, en consecuencia, se obtiene una mayor proporción de acetaldehído que de β -carboxiacroleína. Debido al rápido decaimiento de los aldehídos insaturados, la concentración de carbonilos totales es significativamente menor cuando hay aminoácidos presentes (Arya, 1980).

1.4.3 Acción antimicrobiana

1.4.3.1 Generalidades

Diversos estudios realizados en todo el mundo han reportado que los sorbatos retrasan el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias. Las concentraciones de sorbato usadas en los alimentos usualmente detienen la actividad microbiana, mientras que niveles más altos pueden causar la muerte celular.

La acción inhibitoria de los sorbatos es generalmente más pronunciada contra levaduras y hongos, comparada con la acción que ejercen sobre las bacterias (Sofos y Busta, 1983). Este hecho se sostiene en que cuando los sorbatos son empleados como agentes fungistáticos se inhibe el crecimiento de un número superior de especies y el alcance inhibitorio es mayor (Sofos, 1989).

1.4.3.2 Modo de acción

La acción antimicrobiana del ácido sórbico se basa en diversos factores, entre los cuales se pueden citar: inhibición de varias enzimas de la célula microbiana, destrucción parcial de la membrana celular e inhibición de los mecanismos de transporte intracelular, con la consiguiente reducción de los niveles de ATP (Lück y Jager, 2000).

Las enzimas del metabolismo de los carbohidratos, tales como la enolasa y la lactato deshidrogenasa (Azukas, 1962), se ven particularmente afectadas por la acción del ácido sórbico. El preservador también interviene, con relativa actividad aunque no muy específicamente, en el ciclo del ácido cítrico, inhibiendo la malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y aspartasa (York y Vaughn, 1964), entre otras enzimas. Además, el ácido sórbico forma enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilos (SH) de las enzimas mediante sus propios dobles enlaces, siendo así inactivados dichos grupos (Martoadiprawito y Whitaker, 1963). A su vez, se sabe que el ácido sórbico actúa frente a los microorganismos catalasa-positivos, dando cuenta de su influencia sobre la catalasa y la peroxidasa (Lück, 1993). Es poco

probable que el efecto inhibitor del ácido sórbico se deba a la inhibición de una enzima única. Es de destacar que los puntos de ataque en las células bien pueden diferir en bacterias, levaduras y hongos (Liewen y Marth, 1985).

En cuanto a la acción del ácido sórbico sobre la pared celular, la destrucción parcial de la membrana celular incrementa el flujo de protones hacia el interior de la célula, que tiene que utilizar una mayor cantidad de energía para contrarrestar las diferencias de potencial que se producen (Eklund, 1980, 1981, 1985).

Para que el ácido sórbico sea capaz de desarrollar su acción dentro de la célula microbiana, tiene que penetrar primero a través de la pared celular. Cuando esto sucede, es principalmente el componente ácido no disociado el que entra a la célula, tal lo descrito en la sección 1.3.3.3.a, figura 1.3.1. El preservador es más efectivo cuando se encuentra en forma no disociada (constante de disociación, pKa, 4,75). Consecuentemente, es más efectivo en alimentos ácidos, aunque su acción se manifiesta hasta pH comprendidos entre 6,0 y 6,5, que es superior al rango de actividad de los ácidos propiónico y benzoico (Sofos, 1989).

Algunos microorganismos son capaces de metabolizar el ácido sórbico si se presenta en concentraciones subletales y la población microbiana es abundante. Consecuentemente, el ácido sórbico no es apropiado para la "conservación" de sustratos con alto contenido microbiano, por lo que su uso se limita a conservar alimentos de buena calidad higiénica. Algunos estudios describen la descomposición del ácido sórbico por aspergilos y penicilios (Finol y col., 1982; Kinderlerer y Hatton, 1990).

En el rango de pH alcalino se ha observado la formación de metilcetonas. *Penicillium roqueforti* es capaz de formar 1,3-pentadieno (Marth y col., 1966), que tiene un olor muy desagradable. Unas pocas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de reducir el ácido sórbico al alcohol correspondiente, hexadienol (Radler, 1976), que puede reaccionar químicamente con el etanol para dar 1-etoxi-2,4-hexadieno y 2-etoxi-3,5-hexadieno (Crowell y Guymon, 1975; von Rymon Lipinski y col., 1975).

1.4.3.3 Espectro de acción

La acción del ácido sórbico va dirigida fundamentalmente a las levaduras y los hongos, incluyendo los microorganismos formadores de micotoxinas (Wallhäuber y Lück, 1970). Entre las bacterias, las catalasa-positivas resultan inhibirse más por acción de los sorbatos que las catalasa-negativas y las bacterias estrictamente aeróbicas más que las BAL y los clostridios (Lück y Jager, 2000).

El efecto del ácido sórbico sobre distintas cepas de microorganismos ha sido investigado en diversos estudios generales (Sofos y Busta, 1981; Liewen y Marth, 1985;

Sofos, 1992). Las Mínimas Concentraciones Inhibitorias (MCI) del ácido sórbico, cuando se utiliza frente a algunas levaduras, hongos y bacterias, implicados en la alteración de alimentos, se muestran en la Tabla 1.4.5. (Lück y Jager, 2000). La mayoría de las MCI que se observan en la tabla se basan en ensayos sobre medio nutritivo. Debido a que la acción antimicrobiana de los sorbatos se halla condicionada por muchos factores (sección 1.4.3.5), estas concentraciones únicamente constituyen una estimación para la conservación industrial o comercial de alimentos.

1.4.3.4 Marco regulatorio y aplicación en alimentos

Tanto el ácido sórbico como su sal de potasio son considerados sustancias inocuas (GRAS: generally recognized as safe) para uso en alimentos regulados por la FDA. Ambos son objeto de la β -oxidación lipídica típica de los ácidos grasos, siendo metabolizados en el organismo como tales. Actualmente, se observa una tendencia mundial hacia el uso del ácido sórbico en lugar de otros conservantes, menos ensayados, debido a su evaluación como inocuo para la salud (Lück y Jager, 2000). En nuestro país, el C.A.A. (2006) autoriza su empleo en una gran variedad de alimentos. En la Tabla 1.4.6 se citan algunos ejemplos y los niveles de sorbato de potasio permitidos en cada caso.

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) es la cantidad de un aditivo, agregado a un alimento, que puede ingerir el hombre diariamente, en la dieta, durante toda la vida, sin riesgo. En el caso del ácido sórbico, la IDA es de 25 mg por kg de peso corporal (FAO/WHO, 1973). Entonces, a modo de ejemplo, para una persona de 70 kg, la IDA de ácido sórbico es de 1750 mg.

1.4.3.5 Factores que afectan la acción antimicrobiana de los sorbatos

En general, la acción antimicrobiana de los preservadores está influenciada por numerosos factores, entre los cuales se encuentran:

- factores ambientales, como las condiciones de almacenamiento;
- tipo de proceso de preservación utilizado, es decir: tratamiento térmico, refrigeración, irradiación, etc.;
- factores intrínsecos, como los componentes del alimento, la flora microbiana, la actividad de agua, el pH y la presencia de otros aditivos.

Todos estos factores pueden actuar en forma sinérgica, antagónica o aditiva con los preservadores por lo que resulta difícil estimar o predecir la contribución del preservador

en la inhibición de los microorganismos debido a que, en los alimentos, estas interacciones son complejas.

En cuanto a la acción antimicrobiana de los sorbatos, los factores más importantes que afectan su efectividad se detallan a continuación.

Tabla 1.4.5 Acción inhibitoria del ácido sórbico frente a distintos microorganismos. Adaptada de Lück y Jager (2000).

Microorganismo	Valor de pH	Mínima concentración inhibitoria (MCI) en ppm
<u>Levaduras</u>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,0	250
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	3,5	500-2000
<i>Saccharomyces</i> spp	3,2-5,7	300-1000
<i>Hansenula anomala</i>	5,0	5000
<i>Brettanomyces versatilis</i>	4,6	2000
<i>Byssoschlamys fulva</i>	3,5	500-2500
<i>Rhodotorula</i> spp	4,0-5,0	1000-2000
<i>Torulopsis holmii</i>	4,6	4000
<i>Torula lipolytica</i>	5,0	1000-2000
<i>Kloeckera apiculata</i>	3,5-4,0	1000-2000
<i>Candida krusei</i>	3,4	1000
<i>Candida lipolytica</i>	5,0	1000
<u>Hongos</u>		
<i>Rhizopus</i> spp	3,6	1200
<i>Mucor</i> spp	3,0	100-1000
<i>Geotrichum candidum</i>	4,8	10000
<i>Oospora lactis</i>	2,5-4,5	250-2000
<i>Penicillium</i> spp	3,5-5,7	200-1000
<i>Penicillium digitatum</i>	4,0	2000
<i>Penicillium glaucum</i>	3,0	1000-2500
<i>Aspergillus</i> spp	3,3-5,7	200-1000
<i>Aspergillus flavus</i>		1000
<i>Aspergillus niger</i>	2,5-4,0	1000-5000
<i>Botrytis cinerea</i>	3,6	1200-2500
<i>Fusarium</i> spp	3,0	1000
<i>Cladosporium</i> spp	5,0-7,0	1000-3000
<u>Bacterias</u>		
<i>Pseudomonas</i> spp	6,0	1000
<i>Micrococcus</i> spp	5,5-6,4	500-1500
<i>Lactobacillus</i> spp	4,4-6,0	2000-7000
<i>Achromobacter</i> spp	4,3-6,4	100-1000
<i>Escherichia coli</i>	5,2-5,6	500-1000
<i>Serratia marcescens</i>	6,4	500
<i>Bacillus</i> spp	5,5-6,3	500-10000
<i>Clostridium</i> spp	6,7-6,8	>1000
<i>Salmonella</i> spp	5,0-5,3	500-10000

Tabla 1.4.6 Ejemplos de alimentos en los cuales se autoriza el empleo de sorbato de potasio como aditivo preservador y sus niveles permitidos (C.A.A., 2006).

Alimento	Nivel permitido en ppm (como ácido sórbico)
Salsas y Aderezos para ensalada	1000
Mayonesas	1000
Pickles	600
Salsas y extractos de tomates	500
Margarinas	1000
Mermeladas	1500

1.4.3.5.a Influencia de los componentes del alimento

La solubilidad, la distribución y la partición de los preservadores en un alimento dependen de la composición del producto, por lo tanto, la acción antimicrobiana se verá afectada por estas propiedades.

En comparación con otros preservadores, los sorbatos poseen un coeficiente de partición lípidos / agua más favorable (más bajo), razón por la cual son empleados en la elaboración de mayonesas, margarinas y aderezos (Sofos, 1989).

La presencia de ácidos en el alimento disminuye la solubilidad en agua de los sorbatos, ya que disminuye la solubilidad del ácido sórbico, pero mejora la capacidad antimicrobiana al aumentar la fracción de ácido no disociado.

1.4.3.5.b Influencia de la microflora

En general, el tipo y la cantidad de microorganismos presentes en el alimento afectan la capacidad antimicrobiana de los sorbatos. La misma siempre se ve disminuida por altos niveles de contaminación.

Muchas levaduras pueden sobrevivir, adaptarse y crecer en presencia de los niveles máximos de preservadores ácido débiles permitidos en alimentos (Veiga y Madeira-Lopes, 2000; Cheng y col., 1999; Guerzoni y col., 1990; Warth, 1977). *Saccharomyces*

Cerevisiae es capaz de sobrevivir en un medio de pH 4,5 conteniendo un nivel de aproximadamente 0,453 g.L⁻¹ de sorbato de potasio (Cheng y col., 1999).

1.4.3.5.c Influencia de la actividad de agua y de los humectantes

En general, la acción inhibitoria de los antimicrobianos se incrementa si se deprime la actividad de agua del producto. Guerzoni y col. (1990) observaron el incremento significativo de la fase de latencia del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de 200 ppm de benzoato de sodio debido al descenso de la actividad acuosa de 0,995 a 0,890. La presencia de 25 ppm de ácido sórbico junto con el descenso de la actividad acuosa a 0,93 fueron necesarios para inhibir el crecimiento de la misma levadura (An-Erl King, 1993).

Sin embargo, debe considerarse el efecto "per se" de los solutos involucrados. Así, el empleo de solutos como NaCl y sacarosa, puede reducir o aumentar la acción antimicrobiana de los sorbatos. Ellos tienden a reducir la solubilidad del ácido sórbico en agua y elevar el coeficiente de partición lípidos / agua, lo que podría explicar la reducción de la actividad de los sorbatos. Por ejemplo, las células de *Salmonella typhimurium* en un sistema constituido por soja y almidón permanecen viables durante más tiempo a actividad de agua 0,79 que a 0,97 (Beuchat, 1981 a). El agregado de sacarosa a jugos de fruta conteniendo sorbato de potasio y benzoato de sodio retardó la acción inhibitoria de los mismos frente al crecimiento de levaduras (Beuchat, 1982).

1.4.3.5.d Influencia del pH

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos débiles se incrementa cuando el pH del medio disminuye, y es proporcional a la concentración de la forma no disociada del ácido (ver 1.4.3.5.e).

Los sorbatos presentan la ventaja de ser efectivos aún en el rango de pH comprendido entre 6,0 – 6,5, a diferencia de otros preservadores, como el propionato y el benzoato cuyo pH máximo para inhibir el crecimiento microbiano es 5,0 – 5,5 y 4,0 – 4,5, respectivamente (Sofos y Busta, 1981). El sorbato de potasio es inefectivo a pH 7,0 ó mayor (Smoot y Pierson, 1981; Seward y col., 1982; Praphailong y col., 1997).

Batthey y col. (2002) reportaron la existencia de interacciones entre el pH y el benzoato de sodio o el sorbato de potasio, concluyendo que la acidez que poseen las bebidas permitiría utilizar menor cantidad de preservador para inhibir el crecimiento de levaduras.

1.4.3.5.e Influencia del grado de disociación

La acción antimicrobiana de un ácido débil depende del grado de disociación del mismo, el cual es función del pH del sistema y está influenciado por la solubilidad en agua y la actividad acuosa. Por ejemplo, a pH 7,0 el porcentaje de ácido sórbico no disociado es 0,6%, mientras que a pH 3,0 es del 98% (Sofos y Busta, 1981). Por ende, para poder predecir la efectividad de un preservador de esta naturaleza en un alimento, se debe conocer el pH, la solubilidad y la constante de disociación en ese producto en particular.

La información acerca de los valores de la constante de disociación del ácido sórbico en presencia de distintos solutos es limitada, con excepción del caso de soluciones de glicerol – agua (Pethybridge y col., 1983). Sobre la base de los datos reportados, no se observa un gran cambio en el grado de disociación en el rango de actividad de agua entre 0,8 – 1,0.

Algunos estudios han concluido que la forma disociada del ácido tiene capacidad antimicrobiana, pero ésta es de 10 a 600 veces menor que la de la forma no disociada. Sin embargo, a pH 6,0 ó mayor, más del 50% de la acción inhibitoria se debe a la forma disociada (Eklund, 1983).

1.4.3.5.f Influencia de los aditivos

Diferentes estudios indican que los distintos aditivos normalmente incorporados en los alimentos afectan la acción antimicrobiana de los preservadores.

El tipo de ácido agregado, no sólo ejerce su efecto por modificar el pH, sino que también hay una acción específica del anión (Juven, 1976). La inactivación de *Salmonella typhimurium* por acción del sorbato de potasio es mayor en presencia de ácido acético que de láctico (Park y col., 1970). El tipo de alimento también puede modificar el efecto del acidificante sobre el sorbato, por ejemplo, el ácido cítrico incrementa la acción antimicrobiana del sorbato en pavo y, en cambio, no ejerce ningún efecto en salchichas de pollo (Huhtanen y Feinberg, 1980). En general, los ácidos cítrico y láctico potencian la capacidad antimicrobiana de los sorbatos en mayor medida que otros ácidos.

Para impedir la oxidación de lípidos y el desarrollo de rancidez se adicionan antioxidantes. Los más utilizados son butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno, butil-hidroquinona, propilgalato. Se encontraron efectos sinérgicos entre estos aditivos y los sorbatos (Robach y Stateler, 1980).

Ciertos estudios indican que la interacción de los sorbatos con los fosfatos mejora la capacidad antimicrobiana de los primeros. Ivey y Robach (1978) reportaron que tanto el pirofosfato ácido de sodio como el hexametáfosfato de sodio mejoran la acción de los sorbatos en la inhibición de *Clostridium botulinum* en carne de cerdo enlatada.

Svorcova (1980) reportó que el ácido sórbico y el ascórbico en combinación resultan más efectivos que cada uno de ellos por separado en la preservación de jugos de frutas.

La resistencia frente al sorbato de potasio de *Zygosaccharomyces rouxii* es mayor en presencia de polietilenglicol que de glucosa (Lenovich y col., 1988).

En la literatura se citan numerosas patentes que proponen el uso de distintos aditivos en combinación con los sorbatos para lograr la estabilidad microbiológica de distintos productos.

1.4.3.5.g Influencia del método de preservación empleado

Los preservadores lipofílicos, en conjunto con el tratamiento térmico, pueden afectar la latencia de las esporas, la velocidad y la extensión de la destrucción térmica y la recuperación de las esporas dañadas por acción del calor.

Los ácidos sórbico y benzoico tienen importante influencia sobre la respuesta frente al tratamiento térmico de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens* y *Saccharomyces rouxii*. Dicha influencia depende fuertemente del pH del medio (Veiga y Madeira-Lopes, 2000; Cheng y col., 1999; Makdesi y Beuchat, 1996; Guerzoni y col., 1990; Bills y col., 1982; Beuchat, 1981 b). Por ejemplo, luego de un tratamiento a 25°C en presencia de 9 mM de ácido sórbico, *Zygosaccharomyces bailii* incrementa su resistencia frente a un tratamiento a 52°C durante 10 minutos cuando el pH es cercano a la neutralidad, pero a pH 3,5, la termotolerancia se reduce significativamente (Cheng y col., 1999). La presencia de ácido benzoico incrementa la velocidad de inactivación térmica de *Pichia membranifaciens* en jugo de manzana (Veiga y Madeira-Lopes, 2000).

Bajos niveles de sorbatos (0,01%) podrían estimular la ruptura del estado de latencia de las esporas en el transcurso del tratamiento térmico. Este comportamiento se observó en ascosporas de *Byssochlamys nivea* en jugo de pomelo (Beuchat, 1976).

En general, el tratamiento térmico y los sorbatos actúan sinérgicamente en la inactivación por calor de hongos, levaduras y bacterias (Sofos, 1989).

En algunos estudios se ha sugerido que el uso combinado de bajas dosis de irradiación y la adición de sorbatos, permiten aumentar la vida útil de diversos alimentos ya que ambos factores de preservación actúan sinérgicamente en la inhibición de microorganismos (Sofos, 1989). Sin embargo, debido a que la irradiación y el tratamiento térmico afectan la estabilidad del sorbato, más estudios son necesarios para conocer las ventajas y desventajas de la combinación de estos tratamientos.

1.4.3.5.h Influencia de las condiciones de almacenamiento

Numerosos estudios han demostrado que los sorbatos inhiben a los microorganismos más efectivamente a bajas temperaturas de almacenamiento que a altas (Pederson y col., 1961). La combinación de sorbatos y nitrito posee una mayor capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano en salchichas a 7-9°C que a 20°C. Además, la inhibición de la toxina botulínica en homogenatos de cerdo es más pronunciada a 15°C que a 35°C (Roberts y col., 1982). Sin embargo, Golden y Beuchat (1992) reportaron que la presencia conjunta de sorbato de potasio y sacarosa incrementó la resistencia al congelamiento de *Zygosaccharomyces rouxii*.

Campos y col. (2000) observaron que los productos de degradación de sorbato de potasio almacenado a 70°C durante 7 días inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

La acción antimicrobiana de los sorbatos es también influenciada por el tipo de envase y la atmósfera gaseosa que rodea el producto. En general, tanto el envasado como el uso de atmósfera modificada (aumento del nivel de dióxido de carbono) mejoran el efecto inhibitor de los sorbatos. Varios estudios han demostrado que la combinación de dióxido de carbono y sorbatos es una efectiva inhibidora del desarrollo microbiano (Liewen y Marth, 1985).

1.5 LA NISINA

1.5.1 Descripción. Propiedades físicas y químicas.

La nisina es un lantibiótico. El término *lantibiótico* deriva de "antibiótico conteniendo lantionina", ya que contiene aminoácidos inusuales y distintivos tales como la lantionina con puentes tioéter, 3-metillantionina, 2,3-didehidroalanina y 2,3-didehidrobutirina (van Kraaij y col., 1999), que hacen un total de 34 péptidos (figura 1.5.1). Estos residuos insaturados o deshidratados representan centros electrofílicos que pueden reaccionar con grupos nucleofílicos cercanos (McAuliffe y col., 2001). Consecuentemente, los lantibióticos presentan estructuras policíclicas que son muy importantes en las propiedades de inserción en las membranas de las bacteriocinas. Se cree que estas estructuras anilladas retienen la rigidez del péptido (Kuipers y col., 1996) así como también protegen a la bacteriocina de las enzimas proteolíticas y la desnaturalización térmica (Hurst, 1981). La nisina está categorizada como una bacteriocina clase I y como lantibiótico tipo A (esto es, péptidos elongados con una carga neta positiva).

El peso molecular de la nisina es de 3488 Da. Su molécula permanece estable a 121°C por períodos prolongados de calentamiento a pH 2. Se hace menos estable a medida

que el pH asciende a 5-7 (Hurst y Hoover, 1993). Es sensible a algunas enzimas proteolíticas como la α -quimotripsina, pero es resistente a la acción de tripsina, elastasa, carboxipeptidasa A, pepsina y erepsina (Delves-Broughton y col., 1996). La nisina es 228 veces más soluble a pH 2 que a pH 8 (Liu y Hansen, 1990).

1.5.2 Proceso de elaboración

La nisina se obtiene por fermentación a partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en un medio a base de leche. El polipéptido producido es concentrado, separado y secado por spray. Posteriormente se muele en finas partículas y se estandariza adicionando cloruro de sodio. El producto final tiene una composición aproximada a la siguiente (Aplin & Barret, 1996):

- Nisina	2,5%
- Cloruro de sodio	> 50%
- Sólidos de leche desnaturalizados	23,8%
- Humedad	< 3%

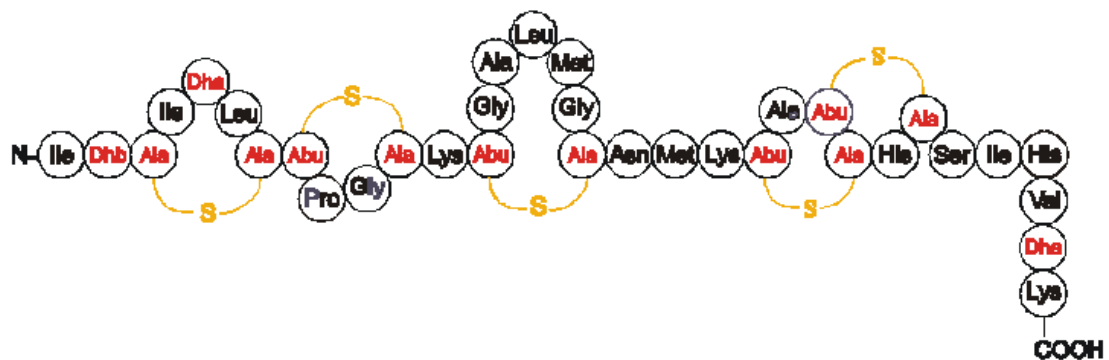


Figura 1.5.1 Estructura primaria de la molécula de nisina Z. Dha: 2,3-didehidroalanina; Dhb: 2,3-didehidrobutirina; Abu-S-Ala: β -metillantionina; Ala-S-Ala: lantionina.

1.5.3 Modo de acción

El mecanismo de acción de la nisina está caracterizado por la formación de poros en la membrana celular de acuerdo al modelo de "wedge", descrito previamente (sección 1.3.3.3.b). La nisina usualmente se compara con un detergente catiónico de superficie activa

en cuanto a que la adsorción a la cubierta celular es el primer paso necesario para la ruptura de la membrana. Bruno y col. (1992) mostraron que la nisina disipa completamente la fuerza protón motriz de *L.monocytogenes* Scott A, y que otras especies de *L.monocytogenes* son igualmente sensibles a la nisina, exhibiendo una respuesta deteriorativa del gradiente de pH y del potencial de membrana.

1.5.4 Espectro de actividad

La nisina no tiene usualmente efecto sobre bacterias gram-negativas, levaduras y mohos, aunque las bacterias gram-negativas pueden ser sensibilizadas por permeabilización de la capa externa de la membrana por calentamiento subletal, congelamiento y agentes secuestrantes (Delves-Broughton y col., 1996). Normalmente sólo las bacterias gram-positivas son afectadas y esto incluye a BAL, patógenos vegetativos como *Listeria*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium* y las bacterias formadoras de esporas, *Bacillus* y *Clostridium*, tal como puede observarse en la Tabla 1.5.1. Las esporas de bacilos y clostridios son incluso más sensibles a la nisina que sus células vegetativas, aunque el sinergismo es esporostático, no esporicida, por lo que se requiere la presencia continua de nisina para inhibir el brote de las esporas. El daño de las esporas por calentamiento incrementa sustancialmente su sensibilidad a la nisina, por lo que la nisina puede ser útil al ser efectiva contra esporas en alimentos poco ácidos, sometidos al calor, como los vegetales enlatados. El mecanismo por el cual la nisina inhibe el brote de las esporas no está claro, aunque se ha determinado que la acción esporostática del biopreservador es causada por su unión a grupos sulfhidrilos de los residuos de proteínas (Morris y col., 1984). Este mecanismo difiere de su efecto bactericida sobre la membrana citoplasmática de las células vegetativas.

1.5.5 Marco regulatorio y sus aplicaciones en alimentos

La nisina purificada ha sido evaluada por sus efectos toxicológicos y se ha encontrado que resulta inofensiva o, al menos, de muy baja toxicidad, en ratas y cerdos de Guinea (Frazer y col., 1962; Shtenberg e Ignatev, 1970). Su uso como aditivo alimentario está aprobado en más de cincuenta países. La aceptación internacional de nisina se dio en 1969 por el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (WHO, 1969). El Comité de la FAO/WHO recomendó una ingesta máxima diaria de nisina, para una persona de 70 kg, de 60 mg de nisina pura (Hurst y Hoover, 1993); sin embargo, la nisina está permitida en quesos procesados en Australia, Francia y Gran Bretaña sin límite máximo. En los Estados

Unidos, el límite máximo es de 10000 UI.g⁻¹ (Unidades Internacionales por gramo); en Rusia, el límite máximo es 8000 UI.g⁻¹, mientras que en Italia y Méjico, el límite es de 500 UI.g⁻¹ para quesos procesados y otros productos (Chikindas y Montville, 2002). El Código Alimentario Argentino establece su empleo como conservador, restringiendo su uso exclusivamente a quesos reelaborados, en cantidad no superior a 12,5 mg.kg⁻¹ (C.A.A., 2006). Ejemplos de productos alimenticios que legalmente pueden contener nisina son las sopas enlatadas (Australia), hielo para conservar pescado fresco (Bulgaria), alimentos para bebés, confituras horneadas y mayonesa (República Checa) y milk shakes (España) (Hurst y Hoover, 1993); no obstante, la mayoría de los alimentos aprobados corresponden a productos lácteos (especialmente quesos) y enlatados (Chen y Hoover, 2003).

Tabla 1.5.1 Espectro de actividad de nisina. Adaptado de Chen y Hoover (2003).

Bacterias sensibles a la nisina	Referencias
Activa contra diferentes especies de <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>L.innocua</i> , <i>Listeria grayi</i> , <i>Listeria murrayi</i> , <i>Listeria ivanovii</i> , <i>Listeria seeligeri</i> , <i>Listeria welchimeri</i> y <i>Staphylococcus</i> spp. Previene el crecimiento de esporas de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Clostridium</i> spp. y es bactericida contra sus células vegetativas.	Cintas y col. (1998); Meghrouy y col. (1999).

1.5.5.1 Usos de la nisina como parte de un sistema de barreras múltiples

La mayor limitación funcional para la aplicación de nisina en alimentos es su espectro de actividad relativamente reducido, además de no ser activa contra bacterias gram-negativas. Para sobrepasar dichas limitaciones, los investigadores están aplicando el concepto de tecnología de barreras múltiples para aumentar la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos. En la tabla 1.5.2 se presentan algunos ejemplos de combinaciones de nisina con diversos factores de estrés microbiano utilizados para la preservación de alimentos.

Tabla 1.5.2 Nisina y la tecnología de barreras para mejorar la seguridad de los alimentos. Adaptado de Chen y Hoover (2003).

Nisina en combinación con:	Efectos de inactivación	Referencias
Calor	Nisina (1000 UI.g ⁻¹) mejora la inactivación de <i>L.monocytogenes</i> en langosta por aplicación de calor moderado (60 o 65°C). Nisina (500 a 2500 UI.mL ⁻¹) mejora la inactivación de <i>Salmonella enteritidis</i> por calor moderado (55°C). Junto con pediocina Ach, reducen la viabilidad de bacterias gram-positivas y gram-negativas que sobreviven a estreses subletales.	Budu-Amoako y col., 1999 Bozaris y col., 1998 Kalchayanand y col., 1992
Agentes secuestrantes	Cuando se emplea con EDTA, citrato o lactato, la nisina es efectiva contra bacterias gram-negativas (<i>Salmonella Thypimurium</i> y <i>E.coli</i> O157:H7), en combinación con envasado en atmósfera modificada.	Cutter y Siragusa, 1995
Envasado en atmósfera modificada (EAM)	Con el empleo de bajas temperaturas, un nivel de 400 UI.mL ⁻¹ de nisina incrementa la fase de latencia de <i>L.monocytogenes</i> y a un nivel de 1250 UI.mL ⁻¹ previene su crecimiento. EAM (100% CO ₂ , 80% CO ₂ + 20% aire) y nisina (1000 o 10000 UI.mL ⁻¹) inhibe el crecimiento de <i>L.monocytogenes</i> y <i>Pseudomonas fragi</i> .	Szabo y Cahill, 1998 Fang y Lin, 1994
Antimicrobianos	El uso combinado de sorbato de potasio (0,3%) y nisina (400 UI.mL ⁻¹) inhiben el crecimiento de <i>L.monocytogenes</i> . Efecto sinérgico entre ésteres de ácidos grasos con sacarosa y nisina para la inhibición de bacterias gram-positivas. Dióxido de carbono y nisina actúan sinérgicamente contra <i>L.monocytogenes</i> . Cuando se combina con carvacrol (0,3 mmol.L ⁻¹), la nisina (6 UI.mL ⁻¹) es más efectiva para reducir los recuentos de <i>Bacillus cereus</i> que cuando se aplica sola. Nisina (100 UI.mL ⁻¹) y monolaurina (0,25mg.L ⁻¹) actúan sinérgicamente contra células vegetativas de <i>Bacillus</i> sp. en leche.	Buncic y col., 1995 Thomas y col., 1998 Nilsson y col., 2000 Periago y col., 2001 Mansour y Millière, 2001
Sistema lactoperoxidasa	Efecto bactericida sinérgico y duradero sobre <i>L.monocytogenes</i> entre nisina (100 o 200 UI.mL ⁻¹) y el sistema lactoperoxidasa. Efecto sinérgico de nisina (10 o 100 UI.mL ⁻¹) y el sistema lactoperoxidasa sobre la inactivación de <i>L.monocytogenes</i> en leche descremada.	Boussouel y col., 2000 Zapico y col., 1998
Otras bacteriocinas	Efecto sinérgico del empleo conjunto de nisina, lacticina 481, o lacticina F, y pediocina Ach. Leucocina F10 en combinación con nisina provee mayor actividad contra <i>L.monocytogenes</i> . Adiciones simultáneas o secuenciales de nisina (50 UI.mL ⁻¹) y curvaticina 13 (160 unidades arbitrarias.mL ⁻¹) inducen un mayor efecto inhibitorio contra <i>L.monocytogenes</i> que el uso de las bacteriocinas por	Mullet-Powell y col., 1998 Parente y col., 1998 Bouttefroy y Millière, 2000

separado.

Continúa en la siguiente página**Tabla 1.5.2 - continuación**

Alta presión hidrostática	Nisina (100 UI.mL ⁻¹) aumenta la presión de inactivación (155 a 400 MPa) de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Shigella sonnei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Masschalck y col., 2001
	Nisina (1 a 10 UI.mL ⁻¹) en combinación con presión (404 MPa), calor y reducción de pH, incrementa la inactivación de esporas de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Clostridium sporogenes</i> .	Stewart y col., 2000
	Nisina (4000 UI.g ⁻¹) en combinación con presión (350 MPa) y glucono-delta-lactona (1%) extiende la vida útil de carne de aves.	Yuste y col., 1998
PEF (pulsed electric field)	Nisina (2,4 UI.mL ⁻¹) mejora la inactivación de células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> por tratamiento con PEF (16,7 kV.cm ⁻¹ , 50 pulsos de 0,002-ms).	Pol y col., 2000
	Nisina (10, 100 UI.mL ⁻¹) mejora la inactivación de <i>L. innocua</i> en huevo líquido entero y leche descremada por PEF (30, 40, o 50 kV.cm ⁻¹ ; 10,6; 21,3 y 32 pulsos de 0,002-ms de duración).	Calderón-Miranda y col., 1999

1.6 FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LOS ADEREZOS PARA ENSALADA

En todas las emulsiones alimenticias, incluyendo los aderezos, los microorganismos se desarrollan en la fase acuosa y es, por lo tanto, la composición química de esta fase la que tiene una influencia directa sobre la supervivencia y el crecimiento microbiano. No obstante, la fase oleosa no es inerte y puede interactuar con ciertos componentes químicos de la fase acuosa, afectando su preservación (Brockelhurst y col., 1993). Tal es el caso del ácido sórbico, que por sus características químicas, como se ha mencionado precedentemente, es capaz de distribuirse entre ambas fases de una emulsión, condicionando su efectividad como antimicrobiano a esta partición. Este fenómeno, a su vez, también puede verse afectado por la presencia de surfactantes, ya que las micelas que se forman "atrapan" parte del preservador en la fase acuosa. Esto resulta en una menor cantidad de preservador libre y disponible para actuar sobre los microorganismos y, por consiguiente, en una reducción de la actividad antimicrobiana del mismo. Sin embargo, la presencia de surfactantes también reduce la tensión interfacial entre las fases acuosa y

oleosa. De acuerdo a Kurup y col. (1991a), ello podría determinar que tanto el preservador como los microorganismos se ubiquen en la interfase y, consecuentemente, las moléculas acumuladas de preservador podrían destruir los microorganismos más rápidamente (Kurup y col., 1991a).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que la máxima concentración y la forma de crecimiento de los microorganismos pueden variar dependiendo de la estructura de la emulsión donde estos microorganismos se desarrollan (Parker y col., 1995; Brockelhurst y col., 1995). En emulsiones alimenticias como las mayonesas y los aderezos, la concentración de aceite puede variar desde niveles cercanos a 0,5% hasta 85% (p/p). El aceite se halla presente como gotas polidispersas que tienen un diámetro medio que oscila entre 0,15 y 8 μm . El tamaño de los intersticios acuosos entre las gotas de estas emulsiones es del mismo orden que el diámetro de las gotas y es dependiente de la concentración de las mismas (es decir, del nivel de aceite presente). Cuando la concentración de aceite permanece por debajo de 80% p/p, las gotas de aceite se encuentran libremente dispersas en toda la fase acuosa y el crecimiento microbiano es típicamente planktónico. A concentraciones de aceite superiores, las gotas de aceite se hallan más empacadas, se previene la movilidad de las bacterias y su crecimiento se ve confinado a las colonias que se forman entre las gotas de aceite, las que se verán desplazadas a medida que la colonia bacteriana se expanda. La restricción del crecimiento en este sentido puede resultar en una disminución de la velocidad de crecimiento. Entonces, la estructura microscópica de las emulsiones influye el crecimiento de las bacterias dentro de la fase acuosa; la forma estructural de esta fase se define como micro-arquitectura del alimento y se describe por la concentración de aceite y la distribución de tamaños de gotas de la emulsión (Wilson y col., 2002). En muchos casos, las predicciones basadas en los datos obtenidos a partir de sistemas líquidos (caldos de cultivo) son aplicables al crecimiento de los microorganismos en alimentos estructurados. Sin embargo, hay un número considerable de casos donde la estructura del alimento pareciera resultar en un comportamiento bacteriano diferente. Este comportamiento es referido a menudo como "fail-safe". En otras palabras, los microorganismos crecen más lentamente en los sistemas estructurados de lo que lo hacen en los medios líquidos.

En lo que respecta al uso de preservadores naturales, aunque los resultados obtenidos de los sistemas con caldo de cultivo muestran que las bacteriocinas inhiben los organismos testeados, Cleveland y col. (2001) opinan que deben hacerse estudios aplicados para confirmar su efectividad en alimentos. La composición química y las características físico-químicas del alimento pueden tener una influencia significativa sobre la actividad de la bacteriocina.

Así también, la eficacia de muchos antimicrobianos, agregados o presentes naturalmente en el sistema, puede verse reducida por ciertos componentes del alimento. Los antimicrobianos lipofílicos, tales como el ácido sórbico, ven reducida su actividad

antimicrobiana en sistemas alimenticios ricos en grasa (Sofos y Busta, 1981; McLay y col., 2002; Wang y col., 1993). También la actividad listericida de nisina se ha informado que disminuye en leche conteniendo 12,9% de grasa comparada con su actividad en leche descremada (Jung y col., 1992). Similarmente, la actividad antibotulínica de 11 preservadores alimenticios, entre los cuales se hallaban nisina, varios ácidos grasos libres, sorbato de potasio, ácido sórbico y el sistema EDTA-lisozima, se vió reducida en medio líquido al agregar 20% de grasa de leche o aceite de soja (Glass y Johnson, 2004).

Desde una perspectiva tecnológica, los aderezos son sistemas químicos complejos. Consecuentemente, es baja la probabilidad de que *un solo componente* controle el crecimiento microbiano o condicione la estabilidad físico-química del sistema. Seguramente son muchos los factores que, actuando en conjunto, proveen a este alimento de las condiciones necesarias para asegurar su vida útil. En este estudio se abordan algunos de esos factores, y sus interacciones, a fin de establecer las condiciones que mejor determinen su conservación y salubridad.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

- ✓ Aportar nuevos conocimientos al desarrollo de alimentos sanos y nutritivos.
- ✓ Aportar información básica al conocimiento sobre la estabilidad química y microbiológica de aderezos para ensalada.
- ✓ Analizar el efecto de las interacciones entre aditivos y/o ingredientes del alimento sobre la vida segura de aderezos para ensalada.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ En sistemas que modelan la *fase acuosa* de una emulsión tipo aderezo para ensalada:
 - a) Estudiar la estabilidad química y la efectividad antimicrobiana del sorbato de potasio:
 - i) analizando la influencia de distintos parámetros sobre la cinética de degradación oxidativa del preservador, a fin de determinar cuáles son las condiciones en las que el mismo presenta mayor estabilidad a lo largo del almacenamiento;
 - ii) evaluando la influencia de la degradación del preservador sobre el pardeamiento no enzimático de los sistemas en estudio.
 - b) Analizar el efecto del pH, el material de empaque y el nivel del EDTA sobre la destrucción del sorbato. Así mismo, elucidar la relación entre destrucción del preservador y captura de iones Hierro del material de empaque, con objeto de contribuir a establecer condiciones que minimicen la destrucción del sorbato mediante el uso conjunto de sorbato y EDTA.
 - c) Determinar la actividad antimicrobiana del ácido sórbico y de la nisina sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* y de *Lactobacillus fructivorans*, principales representantes de la flora deteriorativa de aderezos.

- d) Estudiar el efecto del agregado de distintos aditivos sobre la acción antimicrobiana de la nisina y del sorbato de potasio.
- e) Establecer si existen interacciones entre los aditivos antimicrobianos sorbato y nisina (entre sí o con otros aditivos o ingredientes) que comprometan su actividad antimicrobiana.

✓ En sistemas que modelan aderezos para ensalada:

- a) Desarrollar formulaciones estables contemplando las siguientes variables:
 - i) concentración del espesante (goma xántica);
 - ii) concentración del estabilizante (polisorbato);
 - iii) concentración oleosa;
 - iv) agregado de medios de cultivo a la fase acuosa de la emulsión.
- b) Caracterizar estos sistemas mediante la determinación de la distribución de tamaños de gota.
- c) Determinar los coeficientes de reparto del sorbato de potasio en sistemas formulados con distintos aditivos y diferentes aceites comestibles.
- d) Determinar la cinética de degradación de los sorbatos a fin de dilucidar cuáles son las condiciones en las que el preservador presenta mayor estabilidad a lo largo del almacenamiento.
- e) Evaluar el efecto de distintos niveles de aceite y de Tween®20 sobre la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio frente a *Z.bailii*.
- f) Evaluar la actividad antimicrobiana de la nisina contra *L. fructivorans*, analizando si:
 - i) el sorbato de potasio contribuye a la actividad antimicrobiana del biopreservador en emulsiones.
 - ii) el contenido lipídico del sistema interfiere con la eficacia de la bacteriocina durante el almacenamiento.
 - iii) el agregado de surfactantes contrarresta las pérdidas de actividad de la nisina en el sistema modelo.

CAPÍTULO 3

ESTABILIDAD de los SORBATOS en SISTEMAS MODELO ACUOSOS

3.1 DEGRADACIÓN OXIDATIVA del ÁCIDO SÓRBICO

3.1.1 Introducción

El ácido sórbico (ác. 2,4-hexadienoico) y sus sales, comúnmente denominadas como "sorbatos", son utilizados ampliamente como aditivos antimicrobianos en productos alimenticios. Su efectividad como agentes antimicrobianos en alimentos depende de sus propiedades químicas y reactividad, de su solubilidad en agua y otros solventes, y de su ingreso, difusión y estabilidad en la matriz alimenticia.

Si bien los sorbatos son estables en forma seca, presentan inestabilidad en solución acuosa y se degradan siguiendo una cinética de reacción de primer orden. Esta degradación oxidativa conlleva a la formación de malonaldehído y otros compuestos carbonílicos (Arya, 1980; Gerschenson, 1986; Thakur y Arya, 1991). Estos compuestos pueden participar en reacciones de pardeamiento afectando las características organolépticas del producto. Además, la oxidación de estos aditivos antimicrobianos produce una disminución de su concentración, comprometiendo su efectividad como antimicrobianos.

La oxidación de los sorbatos se halla influenciada por diversos factores tales como: pH, trazas de iones metálicos, azúcares, sales, otros humectantes, aminoácidos, antioxidantes, luz, temperatura de almacenamiento, duración del período de almacenamiento, concentración de ácido sórbico y tipo y propiedades de los materiales de empaquetamiento (Vidyasagar y Arya, 1983, 1984; Gerschenson y col., 1986, 1987; Arya y Thakur, 1988; Gerschenson y Campos, 1995; Campos y col., 1997; Gliemmo y col., 2002, 2004).

3.1.1.1 Cinética de degradación oxidativa

A los valores de pH propios de la mayor parte de los alimentos (3,0 – 6,0), el ácido sórbico se encuentra parcialmente ionizado ya que su constante de disociación es $1,73 \cdot 10^{-5}$ en solución acuosa a 25°C.

En general, la degradación de los sorbatos puede ser aproximada a una cinética de primer orden (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1983; Gerschenson y Campos, 1995):

$$- dc/dt = k.c \quad (3.1)$$

Donde, **c**: concentración de ácido sórbico (g.L^{-1})

t: tiempo (día)

k: constante de velocidad de orden 1 (día^{-1})

3.1.1.2 Influencia de la degradación de los sorbatos sobre el pardeamiento no enzimático

En la degradación oxidativa de los sorbatos se forman compuestos carbonílicos, los cuales conducen a reacciones de pardeamiento, ya sea porque éstos se polimerizan o porque reaccionan con otros componentes del sistema como azúcares y aminoácidos siguiendo diferentes vías de reacción (caramelización, Maillard). Las reacciones de pardeamiento no enzimático (PNE) influyen la cinética de degradación de los sorbatos e incrementan, en algunos casos, su velocidad (Gerschenson y col., 1986; Campos y Gerschenson, 1996; Campos y col., 1997; Gliemmo y col., 2002).

Las reacciones de PNE inducidas por la presencia del ácido sórbico y/o por sus productos de degradación han sido motivo de estudio de diversos autores, quienes analizaron el efecto de distintas variables sobre el desarrollo del pardeamiento. Entre las variables más estudiadas se pueden citar: concentración de sorbato de potasio (Vidyasagar y Arya, 1984; Obanu y Leward, 1986; Buera y col., 1986), actividad de agua (Seow y Cheah, 1985 a y b; Thakur y Arya, 1991; Gerschenson y Campos, 1995), material de empaque (Vidyasagar y Arya, 1984; Thakur y Arya, 1991; Campos y col., 1997) y composición del sistema, presencia de azúcares, cloruro de sodio e iones metálicos (Obanu y Leward, 1986; Seow y Cheah, 1985 a; Arya y Thakur, 1988; Guerrero y col., 1990).

Las reacciones de pardeamiento inducidas por los productos de degradación de los sorbatos han sido evaluadas a través del aumento de la absorbancia a 420 nm (Seow y Cheah, 1985 a y b; Obanu y Ledward, 1981; Thakur y Arya, 1991; Gerschenson y Campos, 1995). Distintos autores encontraron que este parámetro varía en forma lineal con el tiempo:

$$d \text{ Abs}_{420} / dt = k_A \quad (3.2)$$

Donde, **Abs₄₂₀**: absorbancia a 420 nm

t: tiempo

k_A: constante (Abs/t)

Por lo tanto, se postula que la cinética de esta reacción es de pseudo-orden cero. Este comportamiento cinético es coincidente con el reportado para otras reacciones de pardeamiento (Labuza y Stalmarch, 1980; Stamp y Labuza, 1983). Thakur y Arya (1991) reportaron la existencia de un período de inducción, después del cual la cinética de pardeamiento se ajusta al orden mencionado.

4 Objetivos

Los objetivos de esta sección del capítulo son:

- Analizar la influencia de distintas variables sobre la cinética de degradación del ácido sórbico en sistemas acuosos que modelan la composición de aderezos para ensalada a fin de determinar cuáles son las condiciones en las que el aditivo antimicrobiano presenta mayor estabilidad a lo largo del almacenamiento.
- Evaluar la influencia de la degradación del aditivo antimicrobiano sobre el pardeamiento no enzimático de los sistemas en estudio.

3.1.3 Materiales y Métodos

3.1.3.1 Sistemas modelo. Composición.

A fin de evaluar en forma independiente los distintos parámetros que afectan la estabilidad del ácido sórbico se trabajó con sistemas modelo. Los mismos fueron formulados en orden de complejidad creciente. Su composición se detalla en la Tabla 3.1.1.

Se utilizó un sistema base formado por una solución acuosa de sorbato de potasio (KS). El pH de los sistemas se ajustó a 3,5 por adición de una solución concentrada de ácido cítrico (500 g.L^{-1}), en el caso de los sistemas 3.1, 3.2 y 3.3, y por agregado de 25 g.kg^{-1} de una solución de ácido acético 50 g.L^{-1} (vinagre comercial) y de la cantidad necesaria de ácido cítrico (500 g.L^{-1}) para el resto de los sistemas. Con el objetivo de corroborar el efecto protector del ácido cítrico sobre la degradación del KS, observado por diversos autores en sistemas acuosos que contenían sorbatos (Vidyasagar y Arya, 1983; Campos, 1995), se reemplazó, en algunos sistemas, el uso de ácido cítrico como acidificante por los ácidos: fosfórico y láctico. La concentración de estas soluciones ácidas fue de 500 g.L^{-1} .

Los aditivos seleccionados fueron: sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), ácido ascórbico, cloruro de sodio y sacarosa; éstos normalmente forman parte de la composición de aderezos. La concentración de los mismos se encuentra dentro del rango admitido por el Código Alimentario Argentino para aderezos (Capítulo XVI, Grupo 13, Anexo III, actualizado Junio 2004).

La concentración de cloruro de sodio en los sistemas 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10 se eligió a efectos de lograr una actividad de agua de 0,985. La concentración de sacarosa añadida a los sistemas 3.8, 3.9 y 3.10 no modificó la actividad de agua de estos sistemas.

Los reactivos utilizados fueron todos de calidad pro-análisis y de marca:

- Ácido ascórbico (Merck, Buenos Aires, Argentina).
- Ácido cítrico (Merck, Buenos Aires, Argentina).
- Ácido etilendiamino-tetraacético (Merck, Buenos Aires, Argentina).
- Ácido fosfórico (Merck, Buenos Aires, Argentina).
- Ácido láctico (Anedra, Buenos Aires, Argentina).
- Ácido tartárico (Merck, Buenos Aires, Argentina).
- Cloruro de sodio (Mallinckrodt, Alemania).
- Sacarosa (Anedra, Buenos Aires, Argentina).
- Sorbato de potasio (Sigma, Estados Unidos).

El vinagre de alcohol fue de calidad alimentaria (Menoyo S.A., Argentina).

3.1.3.1.1 Preparación de los sistemas modelo

Los sistemas modelo se prepararon por pesada directa de los distintos componentes. Luego de agitar con un agitador magnético (Velp, Alemania) para facilitar la disolución, se ajustó el pH a 3,5 mediante el agregado de gotas de los acidificantes correspondientes a cada formulación.

Para la determinación del pH se empleó un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (Accumet, Denver, Estados Unidos), previamente calibrado con buffers pH 4,01 y 7,00 (Merck, Argentina). El error en la determinación fue de 0,02 unidades de pH.

La actividad de agua de los sistemas se determinó a 25°C con un higrómetro Decagon CX-1 (Decagon Devices, Inc., Pullman WA, Estados Unidos). El error en la determinación fue de $\pm 0,005$ unidades de a_w .

Una vez preparados los sistemas modelo, se tomaron alícuotas de 15 ml y se colocaron en frascos de polietilentereftalato (PET), con tapa, de 40 ml de capacidad, los cuales fueron cerrados herméticamente para prevenir la evaporación y se envolvieron en papel aluminio para evitar la acción prooxidante de la luz. El espacio de cabeza se mantuvo constante en los recipientes contenedores (60% del volumen total del frasco).

Tabla 3.1.1: Composición de los sistemas modelo acuosos.

Sistemas	Composición de los sistemas (g.kg ⁻¹)									
	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9	3.10
Componentes										
Agua	999,00	998,25	994,00	974,00	973,20	972,80	952,80	932,80	932,80	932,80
KS	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
EDTA	-	0,075	0,500	-	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
AA	-	-	-	-	-	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
NaCl	-	-	-	-	-	-	20,000	20,000	20,000	20,000
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	20,000	20,000	20,000
Ácido acético	-	-	-	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000
Acidificante	Ác. cítrico	Ác. cítrico	Ác. cítrico	Ác. cítrico	Ác. cítrico	Ác. cítrico	Ác. cítrico	Ác. cítrico	Ác. fosfórico	Ác. láctico
Aw	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,985	0,985	0,985	0,985

KS: sorbato de potasio; **AA:** ácido ascórbico.

El pH de todos los sistemas se ajustó a 3,5.

3.1.3.2 Condiciones de almacenamiento

Los sistemas modelo envasados se almacenaron por duplicado a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$, durante 3 meses, en una cámara de temperatura constante y convección forzada (Memmert 854 Schabach, Alemania). A distintos intervalos de tiempo se retiraron muestras del almacenamiento y se colocaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Este almacenamiento posterior a temperaturas bajo cero no produce pérdidas detectables en el contenido de sorbato de potasio ni aumento en el grado de pardeamiento no enzimático (Campos, 1995).

3.1.3.3 Determinación de ácido sórbico

El contenido de ácido sórbico se analizó mediante la técnica de oxidación de la A.O.A.C. (1990), que es el método recomendado para el dosaje de sorbatos en quesos. El método de oxidación (A.O.A.C., 1990, secciones 20.098 - 20.101) involucra dos etapas: 1º) la extracción de los sorbatos, que se realiza mediante una destilación por arrastre con vapor, previa acidificación de la muestra (con la que se desplaza el equilibrio hacia la forma no disociada del ácido que es volátil y se arrastra con vapor); 2º) la oxidación del aditivo antimicrobiano a malonaldehído por adición de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en medio ácido. Luego, el malonaldehído se hace reaccionar con ácido tiobarbitúrico formándose un pigmento rojo que se dosa colorimétricamente a 532 nm. La precisión de la técnica, evaluada a través del coeficiente de variación ($< 2,1\%$), fue adecuada (Campos y col., 1991).

En todos los sistemas estudiados las determinaciones se realizaron por duplicado y se informa el promedio obtenido.

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica: - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckordt, Argentina); - H_2SO_4 (96% m/m, Merck, Argentina); - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck, Argentina); - NaOH (97% m/m, Merck, Argentina); HCl (37% m/m, Mallinckrodt, Argentina); - Sorbato de potasio (Sigma, Estados Unidos); - Ácido tiobarbitúrico (Sigma, Estados Unidos).

- Técnica de medición

1º) Extracción del ácido sórbico: se pesan entre 1,5 y 2,0 g de muestra y se colocan en el portamuestra. Luego se adicionan al mismo 10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 10 ml de solución 2 N de H_2SO_4 . El portamuestra se coloca en el equipo destinado a realizar la destilación por arrastre con vapor. Se recogen 200 ml de destilado, los cuales se diluyen con agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml. De esta cantidad, se reserva una alícuota para su posterior dosaje.

2º) Oxidación y medición espectrofotométrica: una alícuota de 2,0 ml del destilado diluido se coloca en un tubo de ensayo al que se adiciona 1,0 ml de

solución 0,3 N de H_2SO_4 y 1,0 ml de solución de $K_2Cr_2O_7$. Se calienta 5 minutos en un baño de agua a ebullición. Se pasa el tubo inmediatamente a un baño de hielo y se le adicionan 2,0 ml de solución de ácido tiobarbitúrico. Se vuelve a calentar a ebullición 10 minutos. Luego se enfría en agua y se mide la absorbancia del complejo rojo formado, a 532 nm en un espectrofotómetro (Beckman Instruments, mod. DU-640B, Fullerton CA, Estados Unidos), contra un blanco de reactivos. La concentración de KS se calcula interpolando la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

- Curva de calibración

Se parte de una solución estándar que se obtiene disolviendo 134 mg de sorbato de potasio en agua y llevando a volumen final de 1000 ml con agua destilada. Para la preparación de los estándares se toman respectivamente 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 ml de la solución estándar y se lleva a volumen con agua destilada en matraces de 100 ml. Se pipetea alícuotas de 2,0 ml de cada solución estándar y se colocan en tubos de ensayo. Se procede según lo indicado previamente en la técnica de medición.

Una curva de calibración típica obtenida es la siguiente:

Concentración de ácido sórbico ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia a 532 nm
0,5	0,10
1,0	0,20
2,0	0,40
3,0	0,62

En todas las curvas de calibración realizadas se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,99 (nivel de significación, α : 0,05).

3.1.3.4 Determinación del pardeamiento no enzimático

El pardeamiento no enzimático de los sistemas se evaluó a través de la absorbancia a 420 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Beckman (Beckman Instruments, mod. DU-640B, Fullerton CA, Estados Unidos). En la medición se empleó agua destilada como patrón de referencia.

El error en la determinación fue de $\pm 0,01$ unidades de absorbancia.

En todos los casos, la medición se realizó por duplicado y se informa su promedio.

3.1.3.5 Análisis estadístico de los resultados

El cálculo de las constantes cinéticas se realizó por regresión lineal de los datos. En todos los casos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con el objeto de evaluar la significatividad de las regresiones. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las distintas constantes de velocidad se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para la igualdad de pendientes, con un nivel de confianza del 95%.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 4,0 (Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, Estados Unidos).

3.1.4 Resultados y Discusión

3.1.4.1 Degradación del ácido sórbico

Se analizó la retención de sorbato de potasio (KS) en función del tiempo de almacenamiento de todos los sistemas modelo estudiados con el objetivo de obtener una expresión cinética que permitiese cuantificar la degradación.

El análisis estadístico de los datos experimentales mostró que las regresiones de los mismos resultaron significativas, indicando una cinética de primer orden, tal lo descrito por la ecuación (3.1). Al integrar dicha expresión, resulta:

$$\ln c/c_0 = -k.t \quad (3.3)$$

Donde, c_0 : concentración inicial de sorbato de potasio

c / c_0 : retención de sorbato de potasio al tiempo t

Los valores de k , la constante de velocidad de la reacción, para los sistemas modelo estudiados se observan en la Tabla 3.1.2. Es de destacar que en algunos sistemas la destrucción del sorbato de potasio durante el período de almacenamiento fue menor al 50%. Esto podría incrementar la incertidumbre en el cálculo del orden de reacción (Labuza y col., 1982). El comportamiento cinético de los sistemas en estudio está en concordancia con el

reportado por otros autores (Arya, 1980; Gerschenson y col., 1986; Campos, 1995; Campos y col., 1997; Gliemmo y col., 2002, 2004).

Tabla 3.1.2: Constantes de velocidad de la reacción de degradación del sorbato de potasio en los sistemas modelo estudiados.

Sistema	$k \cdot 10^3$ (día⁻¹)
3.1	32,0 ± 1,2
3.2	16,1 ± 2,4 ^a
3.3	16,2 ± 1,0 ^a
3.4	23,6 ± 1,4
3.5	7,5 ± 0,8
3.6	3,5 ± 0,8 ^b
3.7	3,9 ± 1,1 ^b
3.8	4,0 ± 0,6 ^b
3.9	3,4 ± 0,6 ^b
3.10	3,1 ± 0,7 ^b

Todos los sistemas fueron ajustados a pH 3,50.

Los resultados se expresan como (**k±d**), siendo **k**: constante de velocidad de primer orden; **d**: desviación estándar.

k con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

La presencia de una solución de ácido acético 50 g.L⁻¹ (vinagre comercial) ejerció un efecto protector sobre el KS, disminuyendo su degradación (Tabla 3.1.2, sistemas 3.1 y 3.2 vs. 3.4 y 3.5, respectivamente). Sin embargo, Arya (1980) observó que la adición de una solución de 50 g.L⁻¹ de ácido acético contribuyó a incrementar la velocidad de destrucción del ácido sórbico. Probablemente, el efecto del ácido acético depende de la composición del sistema y de la cantidad adicionada. Además, existen reportes que citan un aumento en la velocidad de oxidación en presencia de ácidos tales como clorhídrico, acético, tricloroacético, trifluoroacético y ácido sulfúrico (Sofos, 1989).

En aquellos sistemas en los cuales el ajuste de pH se realizó con los ácidos fosfórico y láctico (sistemas 3.9 y 3.10, respectivamente), las velocidades de degradación del ácido sórbico no presentaron diferencias significativas respecto a la del sistema acidificado con ácido cítrico (sistema 3.8). Vidyasagar y Arya (1983) reportaron la influencia de algunos ácidos derivados de frutas sobre la degradación del ácido sórbico. En dicho trabajo, la presencia de ácido láctico, en soluciones acuosas de pH 2,5, aceleró la velocidad de degradación del aditivo antimicrobiano, mientras que el ácido cítrico no tuvo influencia significativa sobre la misma. Campos (1995) determinó que la presencia de ácido fosfórico

en un sistema compuesto por NaCl, glicerol y glicina (pH 5,0) produjo una mayor degradación del ácido sórbico respecto de la que se verificó en un sistema de idéntica composición acidificado con ácido cítrico. De lo expuesto se concluye que la influencia de los ácidos es fuertemente dependiente de la composición y/o del pH de los sistemas estudiados.

La sal disódica del EDTA se utiliza para extender la vida útil y retener el flavor de aderezos y productos untables que contienen grasas y aceites emulsificados. Este aditivo "secuestrante" se combina con trazas de metales, que actúan como agentes catalíticos pro-oxidantes, formando complejos e impidiendo la oxidación de grasas y aceites. Debido a la similitud estructural del ácido sórbico con los ácidos grasos, es posible esperar el mismo efecto sobre la degradación oxidativa de este aditivo antimicrobiano. En la tabla 3.1.2 puede observarse que la presencia de EDTA disminuyó significativamente la velocidad de degradación del ácido sórbico tanto en ausencia de ácido acético (sistemas 3.2 y 3.3 vs. sistema 3.1) como en presencia del mismo (sistema 3.5 vs. sistema 3.4). Cabe destacar que la adición de 0,500 g.kg⁻¹ de EDTA (sistema 3.3) produjo efectos análogos sobre la cinética de degradación del KS que la del sistema que contenía 0,075 g.kg⁻¹ de este secuestrante.

Los resultados hallados por Campos y col. (1995, 1996) se contraponen a lo observado en este estudio, ya que para sistemas acuosos de pH 5,0, dichos autores observaron que el efecto del EDTA fue pro-oxidante. Ambos resultados dan cuenta de la dependencia del pH que presenta la acción de este aditivo con respecto a la degradación del ácido sórbico. Esta dependencia y otros factores que se presumen importantes sobre la destrucción de los sorbatos son abordados en la sección 3.2 de este capítulo.

Mientras que los secuestrantes no son considerados antioxidantes en el mismo sentido que los fenoles o los ascorbatos, son extremadamente útiles como asistentes en los sistemas antioxidantes. En la mayoría de los casos, el efecto combinado de secuestrantes y antioxidantes es sinérgico. En la bibliografía (Furia, 1972) se informa que el ácido ascórbico es uno de los antioxidantes sinergizado por la presencia de EDTA. La adición conjunta de EDTA y ácido ascórbico (sistema 3.6) disminuyó significativamente la velocidad de degradación del aditivo antimicrobiano respecto del sistema que sólo contenía EDTA (sistema 3.5; Tabla 3.1.2). Esta situación pone de manifiesto el efecto cooperativo de ambos aditivos mencionados precedentemente. De acuerdo a Thakur y col. (1994), el ácido ascórbico competiría con el ácido sórbico por el oxígeno disponible y podría entonces retardar la autooxidación de este último.

La adición de NaCl o de sacarosa y NaCl (sistemas 3.7 y 3.8, respectivamente) a los sistemas conteniendo EDTA y ácido ascórbico no mostró ningún efecto sobre la destrucción del sorbato. De acuerdo a algunos autores (Thakur y col., 1994; Gerschenson y Campos, 1995), el efecto del NaCl sobre la destrucción del ácido sórbico es diverso, dependiendo de la composición del sistema: en algunos casos ejerce un efecto protector y en otros promueve la destrucción del aditivo antimicrobiano. El efecto nulo de la sacarosa

sobre la degradación del sorbato es coincidente con estudios publicados previamente (Thakur y col., 1994; Campos y Gerschenson, 1996) y, en este estudio, puede ser atribuido a la baja concentración utilizada, ya que Arya (1980) reportó un efecto protector de la sacarosa cuando ésta se hallaba en concentraciones mayores al 50 g.kg⁻¹. Igual tendencia fue hallada por Gliemmo y col. (2002) cuando analizaron la influencia de una concentración de 220 g.kg⁻¹ de sacarosa, en soluciones acuosas de pH 3,0, sobre la degradación del KS.

3.1.4.2 Pardeamiento no enzimático de los sistemas modelo acuosos

Los sistemas acidificados sólo con ácido cítrico (sistemas 3.1, 3.2 y 3.3, Tabla 3.1.3) produjeron pigmentos pardos y sus constantes de velocidad de PNE fueron similares, sugiriendo que la adición de EDTA de 0,075 ó 0,500 g.kg⁻¹ no ejerció ningún efecto sobre el desarrollo del pardeamiento.

Cuando los sistemas se acidificaron con la mezcla de ácidos cítrico y acético (sistemas 3.4, 3.5 y 3.6), no se detectó pardeamiento durante el período de almacenamiento (90 días), sugiriendo que el uso de ácido acético disminuyó la formación de pigmentos pardos. Por el contrario, la adición de cloruro de sodio a los sistemas conteniendo KS, EDTA y ácido ascórbico (sistema 3.7) indujo la formación de pigmentos pardos. Esta tendencia es coincidente con la reportada por Obanu y Ledward (1986) quienes observaron que el NaCl contribuía al pardeamiento no enzimático en sistemas modelo acuosos que contenían sorbatos.

Debido a que el pH de los sistemas modelo en estudio es de 3,5, la presencia de sacarosa en los sistemas 3.8, 3.9 y 3.10 podría sugerir un aumento en el pardeamiento no enzimático promovido por la hidrólisis de este azúcar a sus monómeros reductores: glucosa y fructosa, con alto potencial formador de pigmentos pardos (Montes de Oca y col., 1991). Sin embargo, no se observaron cambios en la absorbancia de los sistemas a lo largo del almacenamiento respecto del pardeamiento experimentado por el sistema 3.7 (Tabla 3.1.3), probablemente debido a la baja concentración inicial de azúcar presente en la formulación.

Si bien existen antecedentes de que el ácido fosfórico promueve un mayor pardeamiento que el ácido cítrico a pH 5,0 en sistemas acuosos de actividad de agua reducida (a_w : 0,91) (Campos, 1995), no se registraron cambios en el pardeamiento debidos a los distintos acidificantes utilizados en los sistemas 3.9 y 3.10 (ácidos láctico y fosfórico, respectivamente).

Tabla 3.1.3 Constantes de velocidad de orden cero correspondientes al PNE de algunos sistemas modelo acuosos.

Sistema	k.10³ (absorbancia.día ⁻¹)
3.1	1,9 ± 0,2
3.2	1,6 ± 0,1
3.3	1,4 ± 0,1
3.7	1,4 ± 0,4
3.8	1,5 ± 0,6
3.9	1,7 ± 0,3
3.10	1,6 ± 0,2

Los resultados se expresan como (**k±d**), siendo **k**: constante de velocidad de orden cero; **d**: desviación estándar.

Los valores de **k** reportados no presentan diferencias significativas ($p>0,05$).

3.1.5 Conclusiones

En función de los resultados obtenidos, se concluye que los sorbatos presentaron mayor estabilidad durante el almacenamiento cuando la formulación de los sistemas acuosos incluyó: 0,075 g.kg⁻¹ de EDTA, 0,500 g.kg⁻¹ de ácido ascórbico y 20,000 g.kg⁻¹ de cloruro de sodio, a pH 3,5, habiendo utilizado una mezcla de los ácidos acético y cítrico para alcanzar este pH. El uso de los ácidos láctico y fosfórico, sustituyendo al cítrico, indistintamente, no modificaría estas condiciones. La adición de cloruro de sodio y sacarosa al medio no ejerció ningún efecto sobre la degradación de los sorbatos.

No se observó PNE en sistemas constituidos por KS; KS-0,075 g.kg⁻¹ EDTA ó KS-0,075 g.kg⁻¹ EDTA-0,500 g.kg⁻¹ ácido ascórbico cuando la acidificación se había realizado con los ácidos cítrico y acético. La presencia adicional de NaCl ó NaCl-sacarosa, así como la acidificación exclusivamente con ácido cítrico, indujeron la formación de pigmentos pardos.

3.2 EFECTO de la PRESENCIA de EDTA, de DIFERENTES MATERIALES de EMPAQUE y del pH en la DEGRADACIÓN OXIDATIVA de los SORBATOS

3.2.1 Introducción

El uso conjunto de sorbatos y agentes complejantes como el EDTA en alimentos es muy frecuente ya que ambos aditivos contribuyen a la estabilidad química y microbiológica de diversos sistemas alimenticios, tales como: aderezos, salsas y mayonesas. Kitano y col. (2002) demostraron que el ácido ascórbico y las sales de hierro (citrato férrico, Fe-EDTA, gluconato ferroso, pirofosfato férrico y sulfato ferroso) oxidan al KS y que los productos de esta oxidación causan actividad mutagénica y daños al ADN.

En estudios previos (Campos y col., 1996), se analizó el efecto del EDTA en sistemas modelo acuosos de pH 5,0 envasados en frascos de vidrio o polipropileno, conteniendo niveles variables de este secuestrante (0,100 a 1, 000 g.kg⁻¹). Se encontró que este aditivo promueve la destrucción del KS, probablemente como resultado de su capacidad de "arrancar" iones hierro del material de empaque. Pero, como se mencionó en la sección 3.1, cuando se estudió la influencia del EDTA en sistemas acuosos de pH 3,5, envasados en frascos de polietilentereftalato (PET), se observó que éste ejercía un efecto protector sobre la degradación del KS, incluso a una concentración menor que la utilizada por Campos y col. (1996).

A fin de elucidar cuáles son los factores que contribuyen a este comportamiento del EDTA, probablemente dependiente del pH, se aborda la presente sección de este capítulo, cuyos objetivos se detallan a continuación.

3.2.2 Objetivos

- Analizar el efecto del pH (3,5 ó 5,0), material de empaque (vidrio o PET) y el nivel del EDTA (0,075 ó 0,500 g.kg⁻¹) sobre la destrucción del sorbato.

- Elucidar la relación entre destrucción del aditivo antimicrobiano y captura de iones hierro del material de empaque, con objeto de contribuir a establecer condiciones que tiendan a minimizar la destrucción del sorbato cuando se usa conjuntamente con EDTA.

3.2.3 Materiales y Métodos

3.2.3.1 Sistemas modelo: composición y preparación.

Los sistemas modelo analizados fueron soluciones acuosas que contenían:

- 1,000 g.kg⁻¹ de KS (sistema 3.1).
- 1,000 g.kg⁻¹ de KS y 0,075 g.kg⁻¹ de EDTA (sistema 3.2).
- 1,000 g.kg⁻¹ de KS y 0,500 g.kg⁻¹ de EDTA (sistema 3.3).

A fin de analizar el efecto de la presencia de hierro sobre la destrucción del KS, se adicionó la cantidad necesaria de FeCl₃ para formular sistemas de composición similar a 3.2 y 3.3, pero conteniendo 1x10⁻⁴, 3x10⁻⁴ ó 1x10⁻¹ g.kg⁻¹ de hierro. También se formularon sistemas control, sin hierro agregado, a fin de evaluar la posible liberación de hierro de la matriz del material de empaque durante el almacenamiento.

El pH de los sistemas se ajustó a 3,5 y a 5,0 mediante el agregado de gotas de una solución de ácido cítrico (500 g.L⁻¹). El pH de los sistemas se midió utilizando un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fischer (Accumet, Denver, Estados Unidos).

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico: sorbato de potasio (Sigma, St Louis, Missouri, Estados Unidos), cloruro férrico, ácido cítrico y EDTA (Mallinckrodt, Buenos Aires, Argentina).

3.2.3.2 Condiciones de almacenamiento

Alícuotas de 15 ml de los diferentes sistemas se colocaron por triplicado en frascos de vidrio color ámbar y de PET de 40 ml de capacidad, los cuales fueron herméticamente sellados para prevenir la evaporación. Los sistemas adicionados con hierro y sus controles fueron colocados en frascos de vidrio incoloro, de igual volumen. Todos los frascos se envolvieron en papel aluminio a fin de proteger su contenido de la exposición a la luz, factor que acelera la degradación del ácido sórbico (Sofos, 1989).

Los frascos se almacenaron durante 90 días a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ en una cámara de temperatura constante y convección forzada (Memmert 854 Schabach, Alemania).

3.2.3.3 Determinación de sorbato de potasio y hierro

La determinación de KS se realizó como se describe en el inciso 3.1.3.3.

El contenido de hierro se midió por absorción atómica (Christian y Feldman, 1970) en un equipo modelo AA-6501 con horno de grafito GFA-6000, usando inyección directa con un dispensador automático modelo ASC-6000 (Shimadzu, Japón).

El error en las determinaciones fue de $\pm 5\%$.

3.2.3.4 Análisis estadístico de los resultados

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se reportan los promedios de éstas, en todos los casos.

Para establecer diferencias significativas entre las concentraciones residuales de KS y el contenido de hierro se aplicaron el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey. Para ello se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 4,0 (Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, Estados Unidos).

3.2.4 Resultados y Discusión

En la Tabla 3.2.1 se pueden observar los valores iniciales y finales del contenido de KS y de hierro de los sistemas acuosos almacenados según se describe precedentemente. Cabe destacar que ninguno de los componentes de los sistemas constituyó una importante fuente de hierro, ya que el agua utilizada contenía menos de $0,002 \times 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$ de este metal y, las soluciones de KS ($1,000 \text{ g.kg}^{-1}$) o EDTA ($0,500 \text{ g.kg}^{-1}$) contenían sólo $0,002 \times 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$ de hierro.

Un incremento del pH, desde 3,5 a 5,0, disminuyó la degradación del aditivo antimicrobiano, independientemente del material de empaque utilizado (PET o vidrio), en ausencia de EDTA (sistema 3.1). La degradación oxidativa de los sorbatos procede a velocidades más elevadas a valores de pH ácidos debido a que sólo las moléculas no disociadas son capaces de intervenir en las reacciones de degradación oxidativas (Arya,

1980). El uso de vidrio, en contraposición al envase de PET, condujo a pérdidas del aditivo antimicrobiano ligeramente menores, probablemente debido a la menor permeabilidad al oxígeno exhibida por el vidrio (Vidyasagar y Arya, 1984; Campos y col., 1997). Resulta importante resaltar que, aunque la cámara de aire de cada frasco era lo suficientemente grande como para proveer el oxígeno necesario para la destrucción del KS durante los 90 días de almacenamiento, la alta permeabilidad del PET ($6,97 \times 10^{-10}$ m³/m.seg.m².Pa; Fellows, 1994) incrementó las superficies expuestas al oxígeno, aumentando la disponibilidad del mismo.

En la literatura se reportan diferentes tendencias con respecto a la presencia de EDTA:

- La habilidad del EDTA para formar complejos con metales ha sido relacionada con su actividad protectora contra la oxidación (Furia, 1972).
- La presencia de EDTA ha sido vinculada con el desprendimiento de iones hierro a partir del material de empaque, durante el almacenamiento, por complejación con el metal. Campos y col. (1996) atribuyeron las mayores velocidades de destrucción de KS obtenidas, al mayor contenido de hierro en aquellos sistemas que contenían EDTA. Este comportamiento podría ser explicado teniendo en cuenta que: a) el hierro complejado por el EDTA tiene siete sitios de coordinación y uno de ellos está ocupado por agua, quedando entonces disponible para reacciones redox; b) los complejos Fe-EDTA poseen menor potencial de óxido-reducción y mayor solubilidad, convirtiéndolos en eficientes catalizadores de reacciones de oxidación (Mahoney y Graf, 1986). Estos hechos podrían promover la autooxidación del aditivo antimicrobiano en presencia de EDTA. Este efecto del EDTA, observado por Campos y col. (1996), pareciera ser independiente del nivel de secuestrante en el rango 0,100 a 1,000 g.kg⁻¹ para sistemas modelo acuosos que contenían ácido fosfórico como acidulante y estaban envasados en frascos de vidrio o PET. Kitano y col. (2002) también reportaron que la degradación de los sorbatos en soluciones acuosas con ácido ascórbico se incrementó con la adición de Fe-EDTA a los sistemas.

En los sistemas estudiados, la adición de EDTA produjo diferentes efectos sobre la estabilidad del sorbato, posiblemente como resultado del balance entre los distintos factores citados previamente. Cuando se adicionaron 0,075 ó 0,500 g.kg⁻¹ de EDTA a un sistema de pH 3,5, se observó un efecto protector sobre la destrucción del KS en ambos tipos de materiales de empaque (Tabla 3.2.1, sistemas 3.2 y 3.3 vs. sistema 3.1). Quizás esta acción protectora podría estar relacionada a la habilidad del EDTA de formar complejos con iones metálicos (Furia, 1972). En los frascos de PET, el contenido de KS residual fue casi idéntico ($\approx 0,223$ g.kg⁻¹) para los dos niveles de EDTA. No obstante, en el caso de los frascos de vidrio, el efecto protector observado disminuyó cuando el contenido de EDTA se incrementó

de 0,075 g.kg⁻¹ a 0,500 g.kg⁻¹. Los resultados obtenidos denotan que, después de 90 días de almacenamiento, la concentración residual de KS fue de 0,068 g.kg⁻¹ en ausencia de EDTA (sistema 3.1) y 0,570 g.kg⁻¹ en presencia de 0,075 g.kg⁻¹ de EDTA (sistema 3.2), pero cuando el contenido de EDTA se incrementó a 0,500 g.kg⁻¹ (sistema 3.3) la concentración residual de KS fue de 0,287 g.kg⁻¹. Este comportamiento está en relación con el elevado contenido de hierro (0,340.10⁻³ g.kg⁻¹) observado para el sistema en vidrio que contenía 0,500 g.kg⁻¹ (Tabla 3.2.1, sistema 3.3).

Tabla 3.2.1 Contenido de hierro y sorbato de potasio residual en sistemas modelo acuosos.

KS: sorbato de potasio.

*Las concentraciones se expresan como ($\mathbf{x}_m \pm \mathbf{d}$), siendo \mathbf{x}_m : concentración media y \mathbf{d} : desviación estándar.

\mathbf{x}_m con la misma letra, en la misma columna, no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Sistema	pH	Material de empaque	Contenido de Hierro.10 ³ *		Contenido de KS.10 ³ *	
			(g.kg ⁻¹)		(g.kg ⁻¹)	
			0 días	90 días	0 días	90 días
3.1 (Agua - KS)	3,5	PET	0,023 ± 0,099 ^a	0,160 ± 0,020 ^b	990 ± 28 ^e	55 ± 3
	3,5	Vidrio	0,025 ± 0,093 ^a	0,190 ± 0,020 ^b	1012 ± 34 ^e	68 ± 4
	5,0	PET	0,007 ± 0,001 ^b	0,041 ± 0,002	978 ± 37 ^e	791 ± 37 ^f
	5,0	Vidrio	0,008 ± 0,001 ^b	0,066 ± 0,003	1002 ± 22 ^e	886 ± 42
3.2 (Agua-KS- EDTA, 0,075g.kg ⁻¹)	3,5	PET	0,026 ± 0,001 ^a	0,100 ± 0,010 ^c	988 ± 33 ^e	234 ± 12 ^g
	3,5	Vidrio	0,023 ± 0,092 ^a	0,093 ± 0,010 ^c	977 ± 43 ^e	570 ± 23 ^h
	5,0	PET	0,008 ± 0,001 ^b	0,088 ± 0,010 ^c	1012 ± 31 ^e	820 ± 42 ^f
	5,0	Vidrio	0,007 ± 0,094 ^b	0,230 ± 0,012 ^d	976 ± 38 ^e	538 ± 25 ^h
3.3 (Agua- KS- EDTA, 0,500 g.kg ⁻¹)	3,5	PET	0,024 ± 0,099 ^a	0,095 ± 0,010	1019 ± 27 ^e	233 ± 11 ^g
	3,5	Vidrio	0,025 ± 0,096	0,340 ± 0,010	983 ± 45 ^e	287 ± 14
	5,0	PET	0,008 ± 0,001 ^b	0,088 ± 0,001 ^c	979 ± 38 ^e	872 ± 45 ^f
	5,0	Vidrio	0,009 ± 0,001 ^b	0,240 ± 0,012 ^d	968 ± 41 ^e	536 ± 22 ^{d,h}

Probablemente, en el caso citado precedentemente, la acción protectora del EDTA se hallaría parcialmente contrarrestada por la autooxidación promovida por el hierro removido del material de empaque. Como consecuencia, un incremento en el contenido de hierro podría ser responsable de la disminución del efecto protector del EDTA para el nivel de 0,500 g.kg⁻¹.

A pH 5,0, el efecto del EDTA sobre la estabilidad del KS también dependió del tipo de material de empaque utilizado. En el caso de los frascos de PET, la adición de EDTA no produjo un efecto significativo sobre la destrucción del antimicrobiano, independientemente del nivel de secuestrante presente. Es de hacer notar que a ambos niveles de EDTA, éste

produjo igual incremento en el contenido de hierro. Posiblemente, en esta instancia prevaleció el efecto del pH como factor determinante sobre la destrucción del KS. Sin embargo, cuando se utilizaron frascos de vidrio, la adición de EDTA promovió la destrucción del KS y, simultáneamente, el contenido de hierro aumentó de $0,066 \cdot 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$ a $0,230 \cdot 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$ para ambos niveles de EDTA. Esta tendencia está en concordancia con lo observado por Campos y col. (1996) en relación a la destrucción del KS en presencia de EDTA en sistemas modelo acuosos de pH 5,0 y subraya que el efecto que prevalece es la promoción de la autooxidación del KS, mediada por la presencia de EDTA que "arranca" iones hierro del vidrio. Cabe destacar que este efecto produjo una menor retención de KS en el envase de vidrio que en el de PET para ambos niveles de EDTA: el efecto del aumento de la concentración de hierro prevaleció sobre el efecto protector del sorbato debido a la baja permeabilidad del vidrio al oxígeno.

En general, la toma de iones hierro de los envases fue significativamente importante en los frascos de vidrio color ámbar. Como se sabe, el vidrio ámbar contiene óxidos de hierro agregados a la matriz vítrea con el propósito de impartir color a la misma (Mari, 2002). A fin de elucidar la relación entre la destrucción del aditivo antimicrobiano y la captura de hierro del material de empaque, sistemas de composición similar a los sistemas 3.2 y 3.3, pero conteniendo diferentes niveles de hierro se almacenaron en frascos de vidrio transparente. Se comprobó que no se verificaba la liberación de hierro de los envases en el caso de los sistemas 3.2 y 3.3, a los que no se había adicionado hierro. Como puede observarse en la Tabla 3.2.2, la adición de $0,1 \cdot 10^{-3}$ ó $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ g.kg}^{-1}$ de hierro no ejerció ningún efecto sobre la destrucción del sorbato, independientemente del nivel de EDTA ó del pH. No obstante, cuando el contenido de hierro se incrementó a $0,100 \text{ g.kg}^{-1}$, se observó un efecto protector sobre la destrucción del KS. Este fenómeno fue reportado previamente por Pekkarinen y Porkka (1967) quienes determinaron que el efecto del FeCl_3 sobre la estabilidad del ácido sórbico, en una solución diluida de ácido sulfúrico, dependía de la concentración de sal. De acuerdo a estos investigadores, bajos niveles de sal (hasta $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ g.kg}^{-1}$) promueven la destrucción, pero niveles de $1,0 \text{ g.kg}^{-1}$ o superiores, disminuyen la destrucción. Los resultados obtenidos en este estudio no permiten confirmar que los complejos Fe-EDTA promuevan la destrucción del sorbato en los ensayos originales (Tabla 3.2.1). Debe destacarse que no resulta sencillo modelar rigurosamente, a través de la adición de sales de hierro, la situación experimental en la cual se produce la captura de hierro del material de empaque mediante su complejación con EDTA, ya que:

- i) cuando se adiciona hierro a los sistemas modelo, junto con el catión también se agrega un anión y su presencia podría modificar el efecto del hierro. Pekkarinen y Porkka (1967) reportaron que los efectos del hierro sobre la estabilidad del ácido sórbico no sólo dependían de la concentración de sal sino también de los aniones presentes en la solución; en el caso del cloruro férrico, se encontró que una

concentración de $1,60 \cdot 10^{-2} \text{ g.kg}^{-1}$, como la empleada en este estudio, no causó ningún efecto sobre la estabilidad del ácido sórbico en una solución diluida de ácido clorhídrico, pero cuando se utilizó ácido sulfúrico, el ión férrico promovió la destrucción del ácido sórbico;

ii) cuando se adiciona hierro, el nivel del mismo se mantiene elevado durante todo el experimento, mientras que, muy por el contrario, cuando el hierro es "arrancado" del envase, su nivel podría incrementarse con el tiempo de almacenamiento. Como se mencionó previamente, diferentes niveles de hierro podrían ejercer diferentes efectos (Pekkarinen y Porka, 1967).

iii) tampoco podría descartarse la posibilidad de que, junto con el hierro, otros iones, presentes debido a razones tecnológicas o como impurezas, pudieran ser removidos del material de empaque, afectando la destrucción del antimicrobiano. La inclusión deliberada de óxidos de hierro para obtener un color específico en el vidrio tiene que ver con la incorporación estructural del hierro y la coordinación de iones ferrosos y férricos. En general, el color producido por el hierro cambia de azul a ámbar cuando la relación $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ disminuye, pero la intensidad del color de los iones ferrosos es mayor que la producida por la misma concentración de iones férricos (Fernández Navarro, 1985). De acuerdo a Mari (2002), los agentes complejantes orgánicos tales como acetato, citrato, tartrato y EDTA actúan sobre la disolución de cationes divalentes como Pb^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} y otros y esta acción depende del pH. Como son ácidos orgánicos, la concentración del anión complejante es mayor cuando el pH aumenta (soluciones neutras o alcalinas). En todos los casos es un mecanismo de intercambio iónico, el cual necesita que por cada carga que se quita, una cantidad equivalente de H_3O^+ entre a la matriz vítrea. De todas maneras, no ocurre destrucción alguna de la red vítrea.

A lo largo del trabajo fue posible observar una gran interacción entre las diferentes variables estudiadas cuando el EDTA está presente, a continuación se citan algunos fenómenos que lo ejemplifican:

- El efecto del pH sobre la destrucción de los sorbatos, en presencia de EDTA, depende del material de empaque y de la concentración de secuestrante. La acción protectora del incremento de pH se anuló cuando la concentración de EDTA era de $0,075 \text{ g.kg}^{-1}$ debido probablemente a que el pH más alto contribuyó a la captura de hierro cuando se utilizaron frascos de vidrio (Tabla 3.2.1, sistema 3.2). Este efecto no se observó para PET y/o para $0,500 \text{ g.kg}^{-1}$ de EDTA al incrementarse el pH de los sistemas.

- Una concentración de EDTA de $0,075 \text{ g.kg}^{-1}$ mejora la retención de sorbato en aquellos sistemas de pH 3,5. Sin embargo, no se observó un efecto significativo cuando la misma concentración de EDTA se adicionó a sistemas de pH 5,0 envasados en frascos de vidrio.

Existen variados factores que podrían haber afectado los resultados obtenidos: a) baja degradación de los sorbatos a pH elevados (Arya, 1980); b) mayor permeabilidad al oxígeno del envase de PET con respecto al vidrio (Vidyasagar y Arya, 1983 y 1984); c) la habilidad del EDTA de formar complejos con metales la cual está asociada a su acción protectora contra la oxidación (Furia, 1972); d) la habilidad del EDTA de capturar el hierro del material de empaque (Campos y col., 1996); e) el incremento de la disociación de los complejos de EDTA con el pH, lo cual puede incrementar la cantidad de complejos formados aumentando la captura del hierro del material de empaque con las consiguientes consecuencias que este metal ocasiona sobre la destrucción del antimicrobiano (Vidyasagar y Arya, 1984); f) el bajo potencial de óxido-reducción y la mayor solubilidad de los complejos EDTA-Fe (Mahoney y Graf, 1986) que favorecerían la oxidación del sorbato por efecto del hierro complejado. Entonces, si a pH más elevados se produce la disociación de los complejos más fácilmente (ver inciso e), cabría esperar que se redujera la oxidación del sorbato, pero esta situación también proveería más EDTA libre con el consiguiente aumento de la extracción de hierro del envase y las perjudiciales consecuencias que este metal causaría sobre la estabilidad del aditivo antimicrobiano, como se mencionara previamente. Los factores a, e y f representan los efectos opuestos que sugiere el cambio de pH, en presencia de EDTA, sobre la destrucción del sorbato.

En resumen, la estabilidad de los sorbatos en ausencia de EDTA depende del balance de los factores a y b para un sistema de composición fija, mientras que en presencia de EDTA, ésta depende de la conjunción de todos los factores citados previamente (desde a hasta f). Esta situación, de acuerdo a los resultados aquí presentados, se halla influenciada por la concentración de EDTA.

Tabla 3.2.2 Contenido de sorbato de potasio en sistemas modelados con diferentes concentraciones de hierro.

Sistema	pH	Contenido de hierro. 10^3 (g.kg^{-1})	Contenido de KS. 10^3 (g.kg^{-1}) *	
			0 días	90 días
3. 2	3,5	0	932 ± 45^a	500 ± 34^b

(Agua – KS – EDTA: 0,075 g Kg ⁻¹)	3,5	0,1	987 ± 36 ^a	539 ± 30 ^b
	3,5	0,3	965 ± 44 ^a	500 ± 26 ^b
	3,5	100	978 ± 29 ^a	970 ± 32 ^a
	5,0	0	993 ± 43 ^a	894 ± 33 ^c
	5,0	0,1	1024 ± 28 ^a	865 ± 49 ^c
	5,0	0,3	973 ± 39 ^a	886 ± 34 ^c
	5,0	100	962 ± 55 ^a	958 ± 52 ^a
	3. 3	3,5	0	945 ± 33 ^a
(Agua – KS – EDTA: 0,500 g Kg ⁻¹)	3,5	0,1	1032 ± 54 ^a	523 ± 38 ^b
	3,5	0,3	983 ± 47 ^a	527 ± 14 ^b
	3,5	100	1003 ± 18 ^a	896 ± 27 ^c
	5,0	0	947 ± 20 ^a	882 ± 51 ^c
	5,0	0,1	969 ± 58 ^a	958 ± 46
	5,0	0,3	1029 ± 34 ^a	866 ± 32 ^c
	5,0	100	946 ± 49 ^a	984 ± 28 ^a

KS: Sorbato de potasio.

*Las concentraciones se expresan como ($\mathbf{x_m \pm d}$), siendo $\mathbf{x_m}$: concentración media y \mathbf{d} : desviación estándar.

Las concentraciones con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.2.5 Conclusiones

Las experiencias realizadas sobre los sistemas modelo permitieron observar una estrecha relación entre el contenido de hierro y la destrucción de los sorbatos. La presencia de EDTA promovió la captura de hierro de los frascos de vidrio a pH 5,0 cuando la concentración de secuestrante fue de 0,075 g.kg⁻¹ y a pH 3,5 y 5,0 para una concentración de EDTA de 0,500 g.kg⁻¹, mostrando una fuerte interacción entre las variables: material de empaque, pH y nivel de secuestrante adicionado. Las tendencias mencionadas determinaron que, desde el punto de vista de la reducción de la destrucción del sorbato, cuando el pH del sistema es 3,5 es mejor usar frascos de vidrio y un nivel de EDTA de 0,075 g.kg⁻¹. Por el contrario, cuando el pH del sistema es de 5,0, es mejor el uso de frascos de PET, en presencia de EDTA y, en este caso, el nivel de EDTA agregado no influenciaría la destrucción del antimicrobiano.

3.3 CONCLUSIONES GENERALES

La estabilidad de los sorbatos y el pardeamiento no enzimático de los sistemas acuosos estudiados se ven fuertemente influenciados por la composición del sistema, el pH, los ácidos usados para ajustarlo y el material de empaquetamiento. El efecto del EDTA fue diverso debido a su acción antioxidante así como su acción promotora, en ciertas condiciones, de la liberación de hierro a partir de envases de vidrio coloreados, la cual conduciría a una mayor destrucción del sorbato.

Se destaca la importancia de evaluar todos estos factores para minimizar la destrucción del antimicrobiano y los cambios organolépticos.

CAPÍTULO 4

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

de los SORBATOS y de la NISINA

en SISTEMAS que MODELAN la FASE ACUOSA

de ADEREZOS PARA ENSALADA

4.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA de los SORBATOS en SISTEMAS que MODELAN la FASE ACUOSA de ADEREZOS para ENSALADA

4.1.1 Introducción

El interés que los consumidores manifiestan por la alimentación ha adquirido diversos matices a lo largo de las últimas décadas, siendo sus ejes centrales: las características organolépticas, la información sobre la naturaleza y contenido de los alimentos y, con especial énfasis, todos los aspectos relacionados con los riesgos toxicológicos y con la salud. Es en este aspecto que los aditivos alimentarios presentan interés para los consumidores (Multon, 1988). Así, si bien la conservación de los alimentos por adición de conservantes presenta muchas ventajas, es un procedimiento cuestionado por los consumidores que temen los efectos tóxicos de los mismos. Esto ha llevado a las industrias elaboradoras de alimentos a la búsqueda de alternativas que permitan suprimir la adición de conservantes ó, al menos, disminuir su concentración con el objeto de satisfacer las exigencias de los consumidores.

El pH de los aderezos para ensalada varía en un rango de aproximadamente 2,9 a 4,4 debido a la incorporación de ácido acético en una concentración que oscila entre 0,5% y 1,2%. Aunque estas condiciones son generalmente de carácter bactericida (Smittle, 1977), un limitado grupo de microorganismos acidófilos es capaz de crecer bajo estas condiciones, lo que se evidencia por la generación de dióxido de carbono y "off-flavors". La microflora causante del deterioro de aderezos y salsas, de acuerdo a bibliografía, consiste en pocas especies de *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Smittle, 1987). Kurtzman y col. (1971) encontraron que 13 de 17 muestras de los aderezos estudiados contenían *Zygosaccharomyces bailii*. Debido a su tolerancia a condiciones ácidas, su osmofiliidad (Lodder, 1970) y resistencia a los preservadores (Pitt, 1974), éste microorganismo se reconoce universalmente como un problema en la industria de los aderezos. Por su parte, la bacteria *Lactobacillus fructivorans* es también una de las principales causantes de deterioro en estos alimentos (Smittle, 2000).

El sorbato de potasio, solo o en combinación con benzoato de sodio, es el antimicrobiano más comúnmente utilizado para controlar el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias en aderezos o productos a base de mayonesa. La actividad de este preservador aumenta a medida que el pH disminuye, debido a que se incrementa la forma no disociada del ácido, la cual es la entidad química capaz de desarrollar la actividad antimicrobiana. La alta reactividad del ácido sórbico y sus derivados es importante en sistemas alimenticios complejos donde puede participar de reacciones con distintos

componentes del alimento (Sofos, 1989; Gerschenson y Campos, 1995; Binstok y col., 1998; Gerschenson y col., 2000). Estas reacciones pueden comprometer su actividad antimicrobiana y, de este modo, la calidad y seguridad del alimento.

4.1.2 Objetivos

- Determinar la acción antimicrobiana de ácido sórbico en relación al crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* y de *Lactobacillus fructivorans* en los sistemas acuosos formulados.
- Estudiar el efecto del agregado de distintos aditivos sobre la acción antimicrobiana del ácido sórbico.

4.1.3 Materiales y Métodos

4.1.3.1 Sistemas modelo: composición y preparación

La composición de los diferentes sistemas modelo acuosos se detalla en la tabla 4.1.1 y se formuló de manera similar a la ensayada en la sección 3.1 del capítulo precedente, sustituyendo el agua por el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de cada microorganismo y eliminando la adición de sacarosa ya que los resultados obtenidos no mostraron efecto sobre la destrucción de los sorbatos. Todos los sistemas contenían 25,000 g.kg⁻¹ de vinagre. La preparación de los mismos ha sido descrita detalladamente en la sección 3.1.3.1.1. Como se mencionó oportunamente, en los sistemas que contienen cloruro de sodio, la concentración del mismo se seleccionó a fin de producir una actividad de agua de 0,985. Cada formulación se ensayó para diferentes concentraciones de KS: 0,200, 0,400, 0,600, 0,800 y 1,000 g.kg⁻¹. Cabe destacar que las concentraciones de sorbato de potasio utilizadas en este ensayo se inscriben en el marco de lo autorizado por el Código Alimentario Argentino para aderezos.

Se utilizó un sistema control, sin el agregado del antimicrobiano, con el objetivo de estudiar el desarrollo de los microorganismos a lo largo de la experiencia y contar con información que permitiese comparar el crecimiento de los mismos en condiciones normales y en situaciones de estrés, tales como las representadas por las formulaciones planteadas en el ensayo.

El pH de los sistemas modelo se ajustó a 3,50, mediante el agregado de gotas de ácido cítrico, antes de la esterilización. Ensayos preliminares mostraron que los valores de pH y el contenido de KS no cambian significativamente después del proceso de esterilización.

Los sistemas modelo, en alícuotas de 40 ml, se dispensaron en frascos de vidrio color ámbar de 250 ml de capacidad y se esterilizaron a 121°C, durante 15 minutos.

4.1.3.2 Preparación del inóculo, inoculación y almacenamiento de los sistemas

4.1.3.2.1 *Zygosaccharomyces bailii*

El microorganismo utilizado fue *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256. Los medios de cultivo, caldo y agar Sabouraud, utilizados para el cultivo y recuento del microorganismo, fueron de Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia).

El inóculo fue preparado transfiriendo una ansada de la cepa pura a caldo Sabouraud. El caldo inoculado se incubó con agitación a $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante 24 h, resultando dicho tiempo suficiente para que el cultivo alcanzase la fase estacionaria.

Al cabo de la esterilización, los sistemas modelo se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego, se procedió a su inoculación bajo flujo laminar con un elevado número de células viables de *Z. bailii*, esto es en cantidad suficiente para obtener un recuento inicial de 10^5 - 10^6 UFC.g⁻¹ (Unidades Formadoras de Colonias por gramo), a fin de asegurar su capacidad de supervivencia y crecimiento. Posteriormente, los sistemas se almacenaron por duplicado en una cámara de temperatura constante y convección forzada a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$.

4.1.3.2.2 *Lactobacillus fructivorans*

La cepa utilizada fue *Lactobacillus fructivorans* CRL 941G, perteneciente a la colección de cepas lácticas del CERELA (Centro de Referencias para Lactobacilos, Tucumán, Argentina). Los medios de cultivo, caldo y agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960), fueron de Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia). El microorganismo, conservado en líquido crioprotector (Apéndice 1), fue suspendido en caldo MRS e incubado durante 24 h a 30°C. Seguidamente se realizaron dos repiques adicionales de la cepa antes de ser inoculada a los sistemas en estudio. Estos repiques se realizaron en caldo MRS ajustado a pH 3,50 con una solución de ácido cítrico (500 g.L⁻¹). Aproximadamente después de 36 h del último repique, la suspensión microbiana alcanza una densidad óptica de 0.6-0.7, lo cual se corresponde con

la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, como se determinó en experiencias preliminares.

Los sistemas modelo se inocularon bajo flujo laminar con una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^6 - 10^7 UFC.ml⁻¹. Alícuotas de 40 ml se dispensaron en frascos color caramelo de 250 ml de capacidad. Éstos se almacenaron por duplicado a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Tabla 4.1.1 Composición de los sistemas modelo utilizados para la determinación de la MCI de sorbato de potasio.

Composición de los sistemas (g.kg ⁻¹)								
Sistemas	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8
Componentes								
Caldo	Sabouraud	Sabouraud	Sabouraud	Sabouraud	MRS	MRS	MRS	MRS
Nutritivo	999,00	998,25	994,00	974,00	972,80	952,80	932,80	932,80
KS	0-1,000	0-1,000	0-1,000	0-1,000	0-1,000	0-1,000	0-1,000	0-1,000
EDTA	-	0,075	0,075	0,075	-	0,075	0,075	0,075
AA	-	-	0,500	0,500	-	-	0,500	0,500
NaCl	-	-	-	20,000	-	-	-	20,000

KS: sorbato de potasio

AA: ácido ascórbico

El pH de todos los sistemas se ajustó a 3,50.

4.1.3.3 Muestreo y análisis

A lo largo de un almacenamiento de 12 días, el muestreo se realizó a intervalos seleccionados, extrayendo alícuotas de un mililitro de cada frasco, las cuales se colocaron en cubetas de 1cm de paso para su posterior lectura. El crecimiento de las cepas se monitoreó por turbidimetría a 540 nm utilizando un sistema sin inocular como blanco de lectura. Cabe destacar que se preparó un sistema "blanco" por cada formulación ensayada a fin de minimizar los errores que pudieran surgir por interferencias debidas a los distintos ingredientes utilizados en cada caso. En todos los casos, la medición se realizó por triplicado y se informa el promedio de las lecturas obtenidas para las muestras y sus duplicados.

La mínima concentración inhibitoria (MCI) de sorbato se determinó como la concentración más baja a la cual no se detectó crecimiento microbiano en el período de ensayo (Hsiao y Siebert, 1999).

4.1.3.3.1 Función de corrección

La ley de Beer postula que la absorbancia es proporcional a la concentración y que, en suspensiones diluidas, la mayoría de las bacterias tienen aproximadamente la misma absorbancia por unidad de concentración en peso seco (Koch, 1981). Esta relación es la base del uso de la turbidimetría como método rápido, económico y no destructivo para el monitoreo del crecimiento de cultivos microbianos. A pesar de su versatilidad, existen algunas dificultades inherentes al uso de la turbidimetría. Por un lado, para las mediciones de cultivos densos, hay una desviación de la respuesta predicha por la ley de Beer que resulta en falsas estimaciones de la densidad celular. Esta no-linealidad requiere que, para obtener estimaciones precisas de densidades celulares, las muestras sean diluidas para dar una absorbancia $< 0,3$ ó, que la absorbancia observada sea "corregida" refiriéndola a una función de corrección apropiada (Koch, 1981). Por otro lado, el bajo límite de sensibilidad de los aparatos de medición turbidimétricos es tal que, en general, son incapaces de detectar poblaciones menores a 10^7 UFC.ml⁻¹. Por estos motivos, los datos obtenidos como lecturas de absorbancia se corrigieron siguiendo la metodología descrita por Dalgaard y col. (1994), quienes describieron la relación entre absorbancia observada y absorbancia corregida, por falta de linealidad, mediante la siguiente ecuación matemática:

$$\mathbf{ABS = ABS_{dil} \cdot \text{factor de dilución} = ABS_{obs} \cdot (1 + (k_1 (ABS_{obs})^{k_2}))} \quad \mathbf{(4.1)}$$

Donde: **ABS** es la absorbancia corregida; **ABS_{dil}** es la absorbancia correspondiente a cada una de las diluciones; **ABS_{obs}** es la absorbancia observada; **k₁** y **k₂** son coeficientes de regresión a estimar.

La metodología empleada a fin de generar los datos correspondientes para la corrección de las lecturas de absorbancia, que describen Dalgaard y col. (1994), se detalla a continuación. Las cepas de *Z. bailii* y *L. fructivorans* se cultivaron en erlenmeyers de 250 ml de capacidad, en sus respectivos medios líquidos, y se incubaron en un baño termostático a 30°C. Se tomaron alícuotas a determinados intervalos durante el crecimiento de los cultivos microbianos, se midió la **ABS_{obs}** y se diluyeron las muestras con medio de cultivo estéril hasta obtener una absorbancia $< 0,3$. La absorbancia de la muestra diluida, **ABS_{dil}**, se multiplicó por el factor de dilución correspondiente para dar **ABS**. A partir de los datos obtenidos, los cuales se ajustaron a la ecuación (4.1) mediante regresión lineal, se derivó la función de corrección que relaciona **ABS_{obs}** con **ABS** para cada uno de los microorganismos, la que se empleará para corregir los datos experimentales. En la tabla 4.1.2 se muestran los coeficientes de regresión obtenidos para cada uno de los microorganismos evaluados.

Tabla 4.1.2 Coeficientes de regresión estimados para la ecuación 4.1.

	k_1	k_2
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	0,213	0,993
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	0,599	0,925

4.1.3.4 Determinación de ácido sórbico

La degradación del antimicrobiano durante el almacenamiento se monitoreó mediante la técnica descrita en la sección 3.1.3.3. A tal efecto se analizó un sistema control formulado con medio de cultivo y 1,000 g.kg⁻¹ de KS.

4.1.4 Resultados y Discusión

4.1.4.1 Efectos del sorbato de potasio y de algunos aditivos sobre la inhibición del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*

Las lecturas de absorbancia por debajo de 0,1 - 0,2 se consideraron como una expresión de crecimiento nulo ya que dicho valor podría ser provocado por un bajo pardeamiento de las muestras interfiriendo con la lectura de densidad óptica, especialmente para períodos extensos de lectura, como se determinó en experiencias preliminares.

En los sistemas control, que no contenían sorbato de potasio, se evidenció crecimiento de la levadura alcanzando la fase estacionaria después de 100 h de almacenamiento (Figura 4.1.1). Ni los factores de estrés utilizados (disminución del pH a un valor de 3,50 por agregado de ácidos orgánicos débiles y depresión de la actividad de agua a 0,985 mediante el agregado de NaCl), ni el agregado de EDTA y ácido ascórbico, individualmente o combinados, produjeron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura. Este hecho remarca el importante efecto de los sorbatos sobre la estabilidad microbiológica de los sistemas estudiados.

Los sistemas que contenían 0,200 g.kg⁻¹ de sorbato mostraron crecimiento durante el almacenamiento mientras que los sistemas cuya concentración fue de 0,400 g.kg⁻¹ o más, no presentaron crecimiento en el mismo período, indicando que la MCI de sorbato de potasio para *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo ensayados es de aproximadamente 0,400 g.kg⁻¹ (Figura 4.1.1). Estos resultados están en concordancia con Praphailong y Fleet (1997), quienes determinaron que sólo *Z. bailii*, comprendida dentro de un grupo de nueve especies de levaduras alterantes de alimentos, fue capaz de crecer en

presencia de 0,335 g. L⁻¹ de sorbato de potasio a pH 3,0. Por otra parte, Gliemmo y col. (2004) encontraron que la MCI de sorbato de potasio para inhibir el crecimiento de *Z.bailii* fue de 0,200-0,250 g.kg⁻¹ en sistemas acuosos ácidos (pH 3,0) de a_w 0,985-0,971 conteniendo glucosa y/o polioles.

Con objeto de corroborar que no existieran pérdidas de preservador a lo largo del ensayo, debidas a reacciones de oxidación, se analizó el contenido de sorbato de potasio al finalizar el almacenamiento en un sistema control que contenía medio de cultivo y 1,000 g.kg⁻¹ del preservador. No se observó destrucción del KS al cabo de 300 h.

La tendencia observada en todos los sistemas de 0,200 g.kg⁻¹ de KS fue similar y denota que los diferentes aditivos utilizados parecieran no influenciar significativamente el crecimiento de *Z.bailii* (Figura 4.1.2). Sin embargo, Smittle (1977) postuló que la presencia de cloruro de sodio en medio acético sinergiza al sorbato, hecho que disminuye la tolerancia a los ácidos de esta levadura y constituye uno de los factores que protegen a productos tales como la mayonesa y los aderezos del deterioro causado por la misma.

4.1.4.2 Efecto del sorbato de potasio sobre el crecimiento de *Lactobacillus fructivorans*

Se han informado distintas tendencias en relación al efecto del sorbato en las bacterias ácido-lácticas (BAL). Sofos (1989) reportó acerca de la capacidad bacteriostática, e incluso bactericida, del sorbato de potasio sobre las BAL. De acuerdo a nuestros resultados el KS no inhibe el crecimiento de *L. fructivorans* en ninguna de las formulaciones ensayadas (Tabla 4.1.1, sistemas 4.5 al 4.8) durante el período de almacenamiento evaluado. La cepa se desarrolló normalmente en todos los sistemas, sin evidenciarse diferencias significativas entre los valores de turbidez obtenidos para cada uno de ellos. Esto es coincidente con lo observado por Sofos y col. (1986), quienes reportaron que el género *Lactobacillus spp.* representa uno de los más resistentes, incluso a concentraciones de KS tan elevadas como 10,000 g.kg⁻¹. Es de destacar que se verificó que el KS no se degradó a lo largo de la experiencia.

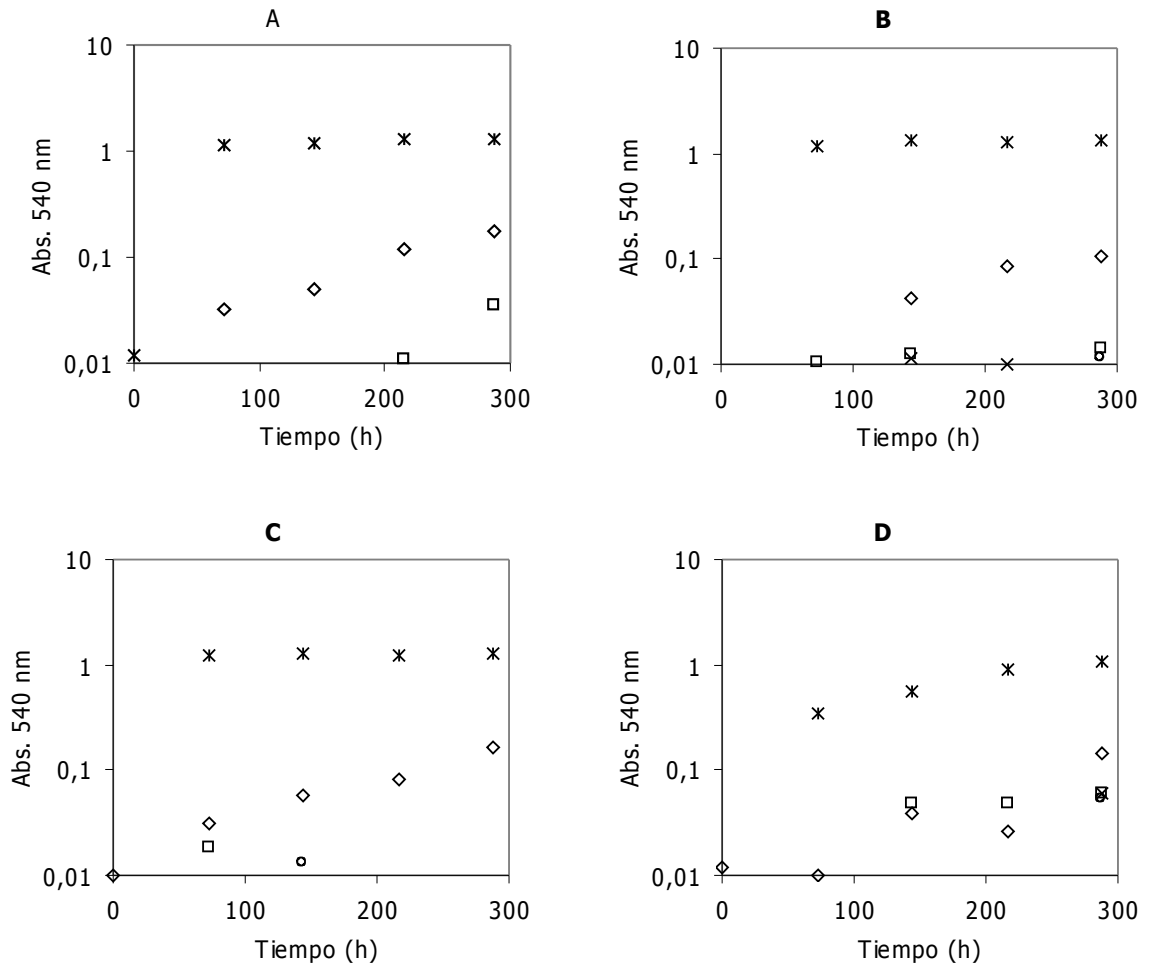


Figura 4.1.1 Cambios en la absorbancia a 540 nm durante el almacenamiento de los sistemas modelo inoculados con *Z.bailii*. **A:** Sistema 4.1. **B:** Sistema 4.2. **C:** Sistema 4.3. **D:** Sistema 4.4. Contenido de sorbato de potasio (g.kg⁻¹): (◻) 0,200; (◻) 0,400; (○) 0,600; (◻) 0,800; (◻) Control. KS: sorbato de potasio

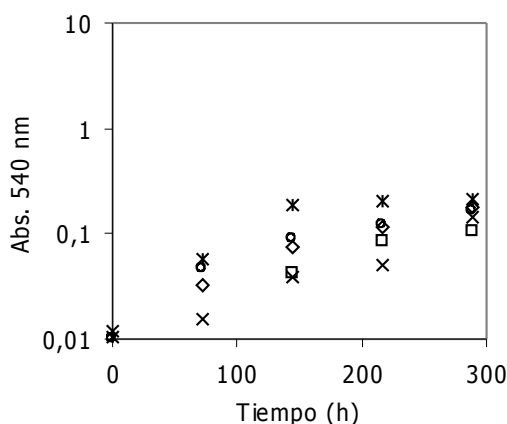


Figura 4.1.2 Cambios en la absorbancia a 540 nm durante el almacenamiento de sistemas modelo acuoso inoculados con *Z. bailii*, conteniendo 0,200 g.kg⁻¹ de KS. Sistemas: (*) 4.1, KS; (◇) 4.2, KS-EDTA; (□) 4.3, KS-EDTA-AA; (○) 4.4, KS-EDTA-AA-NaCl; (□) Control, sin KS. AA: ácido ascórbico. KS: sorbato de potasio

4.1.5 Conclusiones

La adición de sorbato de potasio resultó clave para mantener la estabilidad microbiológica de los sistemas inoculados con *Zygosaccharomyces bailii*. La MCI de este preservador fue de aproximadamente 0,400 g.kg⁻¹.

La presencia de los distintos aditivos utilizados para modelar sistemas que se asemejen a aderezos para ensalada, es decir: EDTA, ácido ascórbico y cloruro de sodio, no influye sobre el crecimiento de la levadura y tampoco constituye un factor diferencial en la determinación de la MCI.

El crecimiento de *Lactobacillus fructivorans* no fue inhibido por la presencia de sorbato de potasio, en ninguna de las concentraciones ensayadas. Por otra parte, el agregado de EDTA, ácido ascórbico y cloruro de sodio, no influyen sobre el crecimiento del lactobacilo. Estos resultados ponen de manifiesto la extrema resistencia que presentan estas bacterias lácticas a las condiciones medioambientales presentes (composición, pH y a_w de los aderezos) y evidencian la necesidad de buscar alternativas de preservación que permitan mantener estos productos alimenticios libres del deterioro que *L. fructivorans* pudiera ocasionar. A este propósito atiende la sección 4.2 del presente capítulo.

4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA de la NISINA en SISTEMAS que MODELAN la FASE ACUOSA de ADEREZOS para ENSALADA

4.2.1 Introducción

En los últimos años, se ha incrementado la demanda de los consumidores para reducir las concentraciones de sal, de aceite y de antimicrobianos químicos presentes en los aderezos para ensalada (Meyer y col., 1989). Una alternativa de conservación para estos alimentos es el empleo de la bacteriocina nisina. La adición de este biopreservador podría contribuir a disminuir los niveles de los antimicrobianos químicos habitualmente empleados, tendiendo al uso de antimicrobianos naturales. Se ha reportado que el empleo combinado de nisina y antimicrobianos derivados de ácidos orgánicos débiles potenciaría el efecto bactericida de estos últimos (Buncic y col., 1995).

Las bacteriocinas, proteínas biológicamente activas producidas por bacterias lácticas, que exhiben propiedades antimicrobianas, han despertado un gran interés como alternativa para la preservación de alimentos. La nisina es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada en productos lácteos, cárnicos (Abee y col., 1995) y vegetales (Fang y col., 1997), como parte de un sistema de barreras múltiples. Sin embargo, hasta el presente no hay datos publicados que indiquen si esta bacteriocina ejerce efectos antimicrobianos en aderezos para ensalada. Las patentes que proclaman el uso de nisina como agente antibacteriano en este tipo de alimentos (Blackburn y col., 1998) no proveen datos sobre su aplicación en el producto.

El uso de nisina para la inhibición de bacterias lácticas fue reportado por: ter Steeg y col. (1999) para *L. plantarum*; Blom y col. (1997) para *L. sakei*; Gänzle y col. (1999) para *L. curvatus*; entre otros. No se han encontrado reportes, hasta el momento, que indiquen su utilización para la inhibición de *L. fructivorans*. Cabe destacar que, la adición de nisina a un alimento debería considerar los efectos de posibles interacciones antagonistas entre los diferentes aditivos presentes (Bouttefroy y col., 2000), debido a que en las matrices alimenticias, la actividad de la bacteriocina podría ser afectada por (i) cambios en la solubilidad y carga de las bacteriocinas, (ii) unión de las bacteriocinas a componentes del alimento, (iii) inactivación por proteasas y, (iv) cambios en la envoltura celular del microorganismo en estudio como respuesta a factores medioambientales (Gänzle y col., 1999).

En base a lo expuesto, resulta de interés el estudio de la aplicación de nisina para la conservación de aderezos para ensalada teniendo en cuenta las posibles interacciones que se pudieran establecer entre los componentes habituales del alimento y la bacteriocina.

4.2.2 Objetivos

- Evaluar la eficacia antibacteriana de nisina contra *L. fructivorans* en sistemas acuosos que modelan aderezos para ensalada.
- Determinar la mínima concentración inhibitoria de nisina para *L. fructivorans* en presencia de sorbato de potasio y de otros aditivos e ingredientes incluidos en la formulación.
- Establecer si existen interacciones entre los distintos componentes de la formulación que comprometan la efectividad de los antimicrobianos utilizados.

4.2.3 Materiales y Métodos

La cepa utilizada en el estudio correspondiente a esta sección y los materiales y métodos empleados son los mismos que figuran en las secciones 4.1.3.1 y 4.1.3.2.2 de este capítulo.

La nisina (Novasin[®], Rhodia, Brasil) contaba con una actividad de 1×10^6 IU.g⁻¹, según datos proporcionados por el fabricante. Se utilizó una solución concentrada de la bacteriocina de 10000 ppm. El diluyente se preparó con 0,83 ml de HCl 12,1N y 3,75 g de NaCl, suspendidos en agua destilada c.s.p. 500ml. En estas condiciones el pH es lo suficientemente bajo para asegurar la estabilidad de la bacteriocina durante la esterilización a 115,6°C (Tramer, 1964). Una vez estéril, esta solución se dispensó a los distintos sistemas en cantidad necesaria para alcanzar las concentraciones correspondientes a cada formulación.

Con respecto a las concentraciones de nisina ensayadas, se realizó una primera aproximación con niveles de nisina en el rango comprendido entre 0,250 y 4,000 g.kg⁻¹, ya que no se encontraron valores de referencia. Los datos consultados en la bibliografía no se correspondían con el tipo de producto alimenticio a ensayar, ni tampoco con la flora bacteriana que se pretendía inhibir. En general, se dispone de valores adecuados para productos cárnicos y lácteos, cuyo pH es superior al de los aderezos. En leche descremada, por ejemplo, la MCI de nisina para *Bacillus cereus* es de $1,2 \cdot 10^{-3}$ g.kg⁻¹ a 30°C (Abee y col.,

1995). En productos derivados de frutas, se utilizaron $0,2 \text{ g.kg}^{-1}$ de nisina, en combinación con ácido sórbico ($0,7 \text{ g.kg}^{-1}$) (Sofos, 1989).

4.2.3.1 Sistemas modelo: composición y preparación

Los sistemas ensayados en una primera instancia sólo contemplaron el uso de los ácidos acético y cítrico para ajustar el pH a 3,5, utilizando caldo MRS como medio nutritivo (Tabla 4.2.1, sistemas 4.9 y 4.10). A dichos sistemas se adicionó nisina en cantidades variables entre $0,250$ y $4,0 \text{ g.kg}^{-1}$. Asimismo se incorporó sorbato de potasio a uno de estos sistemas, a fin de establecer la existencia de interacciones entre los dos antimicrobianos. Una vez realizado este estudio, se procedió a la determinación de la MCI de nisina en sistemas acuosos cuya composición se asemejara a los sistemas previamente ensayados, para lo cual se adicionaron EDTA y cloruro de sodio (Tabla 4.2.1, sistema 4.12 y su control, sistema 4.11, sin la adición del antimicrobiano). La concentración de sorbato empleada fue de $0,500 \text{ g.kg}^{-1}$ con objeto de reducir el nivel de este preservador, respecto de la máxima concentración utilizada, en función de la MCI determinada previamente para *Z. bailii*.

A fin de evaluar si la presencia de nisina afectaría la efectividad del sorbato contra *Z. bailii*, se elaboró un sistema con caldo Sabouraud (SAB) que contenía nisina y concentraciones variables de KS (Tabla 4.2.1, sistema 4.13). Se determinó la MCI de KS respecto a la levadura, para esta formulación, siguiendo la metodología descrita precedentemente.

Es de destacar que dado que el ácido ascórbico no ejerció efecto alguno sobre el desarrollo de *L. fructivorans* (sección 4.1.4.2), no se incluyó en las formulaciones estudiadas.

4.2.3.2 Muestreo y análisis

El muestreo y el seguimiento turbidimétrico de los sistemas considerados se realizaron aplicando la metodología que se describe en la sección 4.1.3.3 del presente capítulo. Asimismo, la función de corrección aplicada a las lecturas obtenidas es la misma que se cita en el ítem 4.1.3.3.1.

La mínima concentración inhibitoria (MCI) de nisina se determinó como la concentración más baja a la cual no se detectó crecimiento bacteriano en el período de ensayo (Hsiao y Siebert, 1999).

Para algunos sistemas de interés, durante el almacenamiento se monitoreó la evolución del microorganismo mediante recuento en placa sobre agar MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), suplementado con 0,5% de fructosa. Las placas fueron

incubadas en una atmósfera enriquecida con CO₂, a 30 ± 1°C, y el crecimiento se registró después de 5 días de incubación, tal lo descrito por Smittle y col. (1982).

Tabla 4.2.1 Composición de los sistemas modelo acuosos inoculados con *L.fructivorans* para la determinación de la MCI de nisina.

Composición de los sistemas (g.kg ⁻¹)					
Sistemas	4.9	4.10	4.11	4.12	4.13*
Componentes					
Caldo MRS	971,000	970,000	953,925	953,425	-
Caldo SAB	-	-	-	-	953,425
Ác. Acético	25,000	25,000	25,000	25,000	25,000
Ác. Cítrico	c.n.	c.n.	c.n.	c.n.	c.n.
KS	-	1,000	-	0,500	0-1,000
Nisina	0,250-4,000	0,250-4,000	0,050-2,000	0,050-2,000	0,500
EDTA	-	-	0,075	0,075	0,075
NaCl	-	-	20,000	20,000	20,000

c.n.: cantidad necesaria para ajustar el pH a 3,5.

* Sistema inoculado con *Z. bailii*.

4.2.4 Resultados y Discusión

Los niveles de nisina comprendidos entre 0,250 y 1,500 g.kg⁻¹ no resultaron inhibitorios para el desarrollo del lactobacilo, en ausencia de KS (Figura 4.2.1, sistema 4.9). En función de estos resultados, la MCI de nisina para *L. fructivorans* en las condiciones ensayadas fue 2,000 g.kg⁻¹. En presencia de KS (Figura 4.2.1, sistema 4.10), las muestras que contenían concentraciones mayores a 1,500 g.kg⁻¹ del biopreservador mostraron inhibición del crecimiento microbiano. En consecuencia, la MCI de nisina para estos sistemas fue 1,500 g.kg⁻¹. Es de destacar que en estos sistemas fue compleja la evaluación de la MCI debido al pardeamiento del sistema base.

Las interacciones entre antimicrobianos pueden ser de naturaleza sinérgica, aditiva o antagonista. Una interacción sinérgica se define como aquella donde el efecto de la combinación de preservadores es mayor que la suma de los efectos de estos agentes actuando independientemente (Barry, 1976). Teniendo en cuenta esta definición, la reducción en el valor de MCI de nisina cuando el sorbato está presente, así como el efecto nulo del KS en el sistema control correspondiente, se podría inferir que la presencia de KS en los sistemas acuosos estudiados ejerce un efecto sinérgico sobre la acción antimicrobiana de nisina para *L. fructivorans*. Estos resultados concuerdan con aquellos hallados por Buncic y

col. (1995), donde la combinación de sorbato de potasio y nisina en caldo BHI, a pH 5,5, producía un efecto listericida mayor que el obtenido para cada preservador por separado.

El efecto sinérgico mencionado precedentemente se corroboró mediante el recuento en placa de lactobacilos para los sistemas 4.9 y 4.10, conteniendo 2,000 g.kg⁻¹ de nisina (Tabla 4.2.1). Puede observarse en la Figura 4.2.2 que los recuentos obtenidos al final del almacenamiento, para cada uno de los sistemas presentados, difieren aproximadamente en un orden de magnitud. Por otra parte, se observa que el uso conjunto de ambos preservadores produce una respuesta bactericida ya que disminuye 1 log la población microbiana al cabo de, por lo menos, tres días de almacenamiento. Además, la nisina, actuando independientemente, presentaría un efecto bacteriostático sobre los microorganismos estudiados, ya que no produce una reducción decimal significativa en el mismo período [≥ 1 ciclo log] (Jarvis, 1989).

El efecto sinérgico que ejerce la presencia de KS sobre la efectividad de nisina fue reportado por Fang y col. (1997) quienes encontraron que el uso combinado de ambos preservadores extendió la vida útil de alimentos para vegetarianos inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* C10 y *Bacillus cereus* B7. Está ampliamente aceptado que la nisina se une a la membrana citoplasmática de las células vegetativas y penetra dentro de la fase lipídica de la misma, formando poros que permiten el eflujo de material intracelular, resultando en la disipación de la fuerza protón motriz (FPM) y causando, eventualmente, la muerte celular (Bruno y Montville, 1993). La nisina puede formar poros transientes de diámetros cuyo rango oscila desde 0,2 a 1,2 nm. Tales poros podrían permitir el pasaje de solutos de pesos moleculares hasta 0,5 kDa (Abee y col., 1995). Se infiere de lo expuesto que el KS podría ser capaz de penetrar dentro de la célula a través de estos poros induciendo la inhibición del crecimiento bacteriano. Sería por ello que la presencia de sorbato proporcionaría mayores respuestas inhibitorias en combinación con nisina respecto del efecto de la nisina *per se*.

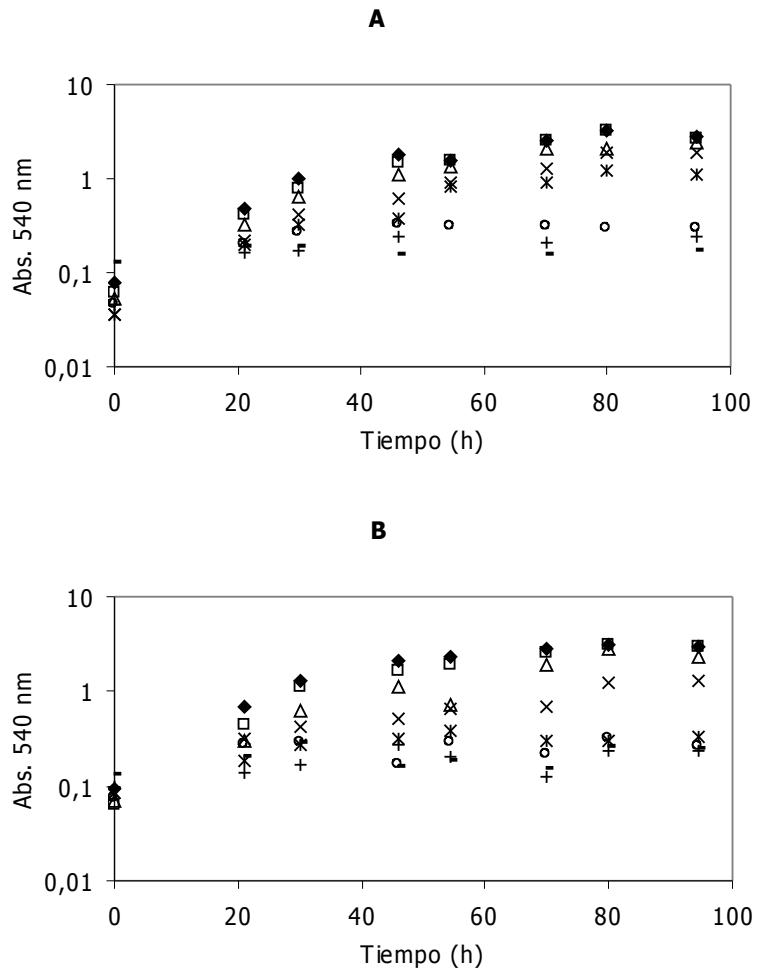


Figura 4.2.1 Cambios en la absorbancia a 540 nm debido al crecimiento de *L. fructivorans* en sistemas acuosos que contienen nisina. **A**: Sistema 4.9 (sin KS); **B**: Sistema 4.10 (con KS).

(□) Sistema control (sin nisina).

Concentraciones de nisina (g.kg⁻¹): (□) 0,250; (△) 0,500; (◊) 1,000;

(◻) 1,500; (○) 2,000; (◼) 3,000; (-) 4,000.

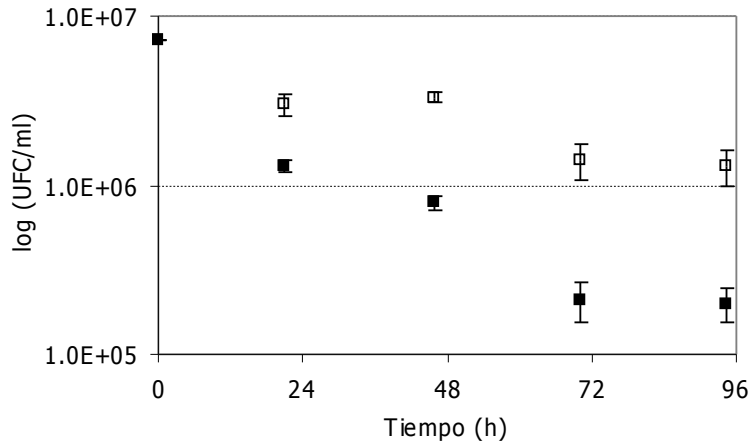
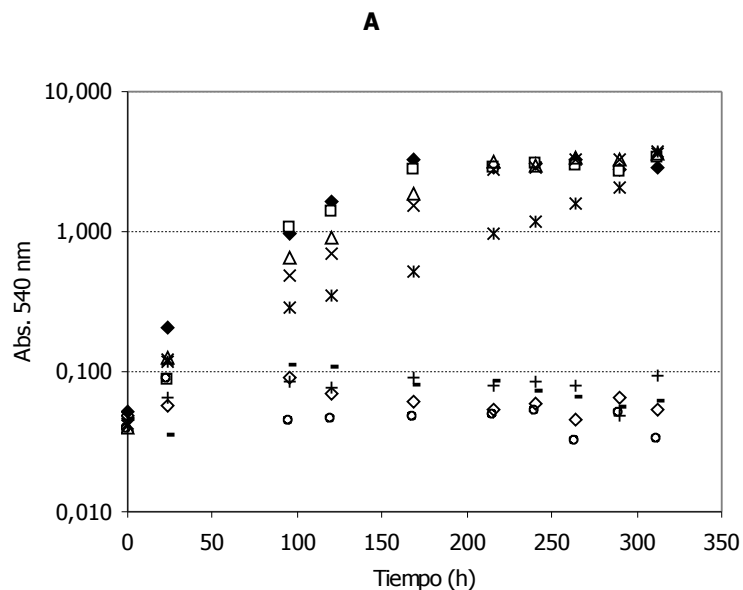


Figura 4.2.2 Recuentos de *L. fructivorans* en sistemas acuosos que contenían 2,000 g.kg⁻¹ de nisina. (□) Sistema 4.9, sin KS; (■) Sistema 4.10, con KS.

Una vez determinadas las concentraciones mínimas inhibitorias de nisina para *L. fructivorans* a pH 3,5, se evaluó la efectividad de este biopreservador en sistemas formulados con objeto de modelar aderezos para ensalada. A este respecto, los aditivos agregados fueron EDTA y cloruro de sodio. Los cambios en la absorbancia de los distintos sistemas pueden ser observados en la Figura 4.2.3. Como puede apreciarse, la variación en la concentración mínima inhibitoria de nisina es considerable respecto de las MCI halladas para los sistemas que sólo contemplaban el ajuste de pH (sistemas 4.9 y 4.10). En el caso del sistema 4.11 (sin KS), la MCI de nisina para el lactobacilo fue 0,500 g.kg⁻¹, mientras que para el sistema 4.9 ésta fue 2,000 g.kg⁻¹. En el caso de las formulaciones con KS, la MCI fue 0,150 g.kg⁻¹ para el sistema 4.12, mientras que el valor hallado para el sistema 4.10 fue 1,500 g.kg⁻¹. Estos resultados dan cuenta no sólo del efecto sinérgico que emerge de la interacción de ambos preservadores, sino también del rol que desempeñan el EDTA y el NaCl como aditivos en el efecto inhibitorio conjunto de los preservadores testeados. La reducción de los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias se detalla en la figura 4.2.4. En ésta se observa cómo la adición de KS al medio con nisina produjo una reducción de la MCI en todos los sistemas analizados (sistema 4.9 vs. 4.10, panel A, y sistema 4.11 vs. 4.12, panel B). Es de destacar que la adición conjunta de NaCl y EDTA, junto con la presencia de una menor cantidad de KS (0,500 g.kg⁻¹), produce una reducción del 90% en el valor de la MCI (Figura 4.2.4, panel D; sistema 4.10 vs. 4.12). El EDTA y el NaCl agregados provocaron, en ausencia de KS, una reducción de la MCI de nisina del 75% (Figura 4.2.4, panel C, sistema 4.9 vs. 4.11). Esta tendencia se halla en concordancia con Branen y Davidson (2004), quienes reportaron una disminución del 50% en la MCI de nisina para *Listeria monocytogenes* a muy bajas concentraciones de EDTA (7,8.10⁻³ y 15,6.10⁻³ g.kg⁻¹).

La presencia de iones mono-, di- y tri-valentes en alimentos podría reducir potencialmente la eficacia de nisina contra la acción de bacterias Gram-positivas alterantes y patógenas debido a su capacidad de unirse a grupos de fosfolípidos de la membrana citoplasmática cargados negativamente (Abee y col., 1995), impidiendo la adsorción de nisina sobre esta superficie, lo cual constituye el primer paso en el proceso letal de la misma (Jack, 1995). La adición de EDTA podría complejar estos iones, permitiendo que la nisina actúe más eficazmente. Por otra parte, cuando se emplea solo, el EDTA tiene un efecto bacteriostático (Parente, 1998). Este mecanismo de inhibición del crecimiento mediado por el efecto del EDTA no está completamente dilucidado pero se atribuye generalmente a su actividad como quelante. El EDTA se une primariamente a cationes divalentes (Shelef y Seiter, 1993). Se sabe que provoca la liberación de lipopolisacáridos (LPS) de la membrana celular externa de las bacterias por complejación de cationes Ca y Mg necesarios para que los LPS se unan a la pared celular (Gray y Wilkinson, 1965). Es de destacar que la actividad inhibitoria de las bacteriocinas se halla restringida a bacterias Gram-positivas, dado que la inhibición de bacterias Gram-negativas no ha sido demostrada (Abee y col. 1995) y los fundamentos de esta limitación se basan en las diferencias existentes entre la composición de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias. Por otro lado, varios autores (Kordel y Sahl, 1986; Stevens y col., 1991; Ray, 1993) han demostrado que *Escherichia coli*, algunas especies de *Salmonella* y otras bacterias Gram-negativas, se tornan sensibles a la nisina después de ser expuestas a distintos tratamientos que cambian las propiedades de permeabilidad de la membrana externa. Entre dichos tratamientos, el uso de agentes complejantes como el EDTA incrementa la susceptibilidad de estas bacterias tanto a las bacteriocinas como a los antibióticos y detergentes.



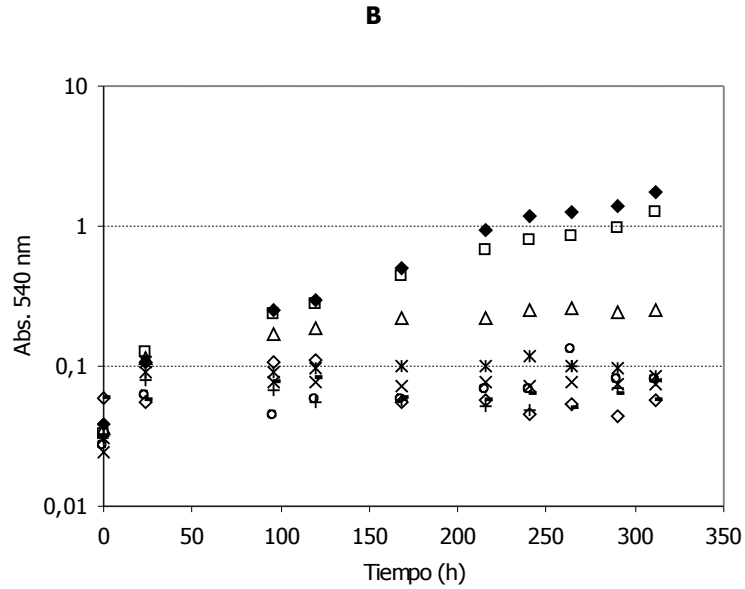


Figura 4.2.3 Cambios en la absorbancia a 540 nm debido al crecimiento de *L. fructivorans* en sistemas acuosos que contienen nisina. **A:** Sistema 4.11; **B:** Sistema 4.12. (□) Sistema control (sin nisina).

Concentraciones de nisina ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$): (□) 0,050; (Δ) 0,100; (○) 0,150; (◇) 0,250; (○) 0,500; (□) 1,000; (-) 1,500; (□) 2,000.

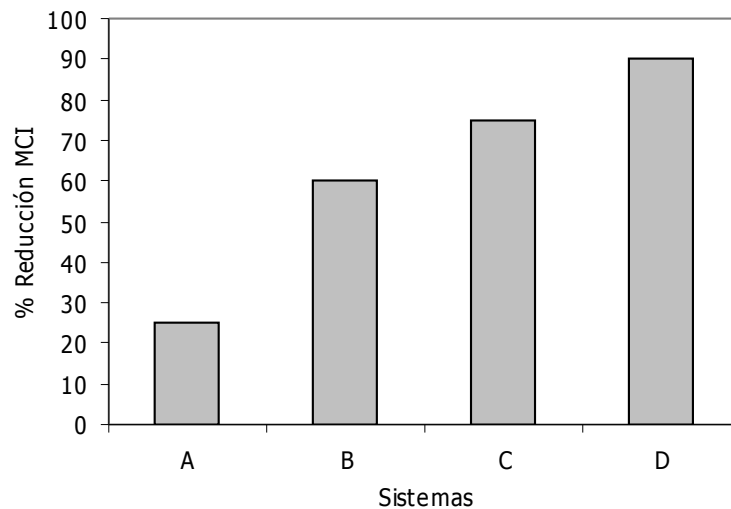


Figura 4.2.4 Reducción porcentual de las MCIs de nisina para *L. fructivorans*. Panel **A:** sistema 4.9 vs. 4.10; panel **B:** sistema 4.11 vs. 4.12; panel **C:** sistema 4.9 vs. 4.11; panel **D:** sistema 4.10 vs. 4.12.

Bouttefroy y col. (2000) informaron que concentraciones de NaCl entre 2 y 4%, en combinación con bajas concentraciones de nisina, tuvieron un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, que cambió a bactericida a mayores concentraciones de bacteriocina.

Teniendo en cuenta que el uso de nisina resultaría promisorio para la preservación de aderezos para ensalada, se procedió a introducir esta bacteriocina ($0,500 \text{ g.kg}^{-1}$) en la formulación de los sistemas modelo previamente testeados contra *Zygosaccharomyces bailii*, a fin de verificar si la presencia de la misma ejercería algún efecto antagónico sobre la efectividad del KS contra esta levadura. Como puede observarse en la figura 4.2.5, la MCI de sorbato de potasio para *Z. bailii* en esta nueva formulación fue de $0,400 \text{ g.kg}^{-1}$, es decir, el mismo valor hallado para los sistemas sin nisina, no registrándose ningún efecto adverso de la bacteriocina sobre la actividad de KS.

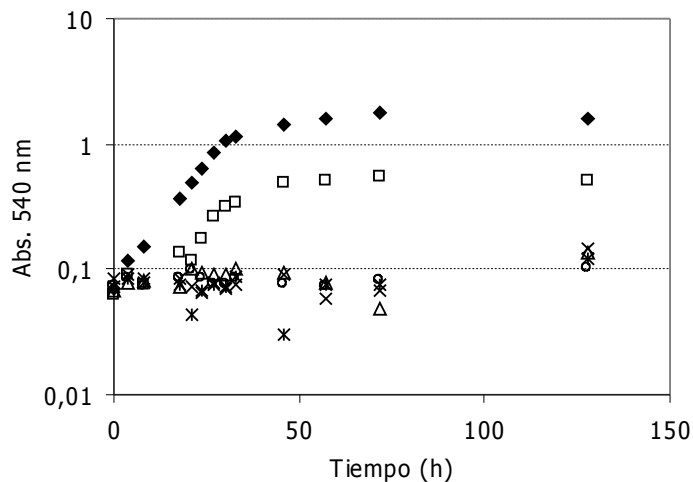


Figura 4.2.5 Cambios en la absorbancia a 540 nm del sistema 4.13, inoculado con *Z. bailii*. (□) Sistema control (sin KS). Concentración de KS (g.kg^{-1}): (□) 0,200; (△) 0,400; (×) 0,600; (○) 0,800; (■) 1,000.

4.2.5 Conclusiones

La nisina inhibió el crecimiento de *L. fructivorans* en los sistemas acuosos que emulan aderezos para ensalada y su efectividad se vió incrementada por la presencia de sorbato de potasio, EDTA y cloruro de sodio. Este hecho se reflejó en la disminución de los valores de MCIs hallados.

El uso conjunto de sorbato de potasio y nisina ejerce un efecto sinérgico sobre la acción antimicrobiana de la nisina en los sistemas modelo estudiados.

La adición del biopreservador, en una concentración inhibitoria para el lactobacilo (0,500 g.kg⁻¹), no comprometió la efectividad del sorbato sobre *Z. bailii*, ya que la MCI de KS hallada en presencia de nisina coincidió con la MCI correspondiente a la misma formulación testeada en ensayos previos.

De lo expuesto anteriormente, se infiere que el uso de nisina resultaría promisorio para la conservación de aderezos para ensalada, como parte de un sistema de barreras múltiples que contemple el uso de sorbato de potasio, EDTA, cloruro de sodio y un pH ácido, aportado por los ácidos acético y cítrico.

4.3 CONCLUSIONES GENERALES

Para la inhibición del *Z. bailii* en sistemas acuosos fue importante la presencia de sorbato de potasio en los sistemas. La nisina inhibió el crecimiento del lactobacilo y se observó una acción sinérgica en la acción antimicrobiana de la misma por parte del sorbato, no afectándose la efectividad del sorbato sobre la levadura por la presencia del biopreservador.

CAPÍTULO 5

ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA

y CARACTERIZACIÓN

de EMULSIONES MODELO

5.1 FORMULACIÓN y CARACTERIZACIÓN de EMULSIONES que MODELAN ADEREZOS para ENSALADA

5.1.1 Introducción

Las emulsiones alimenticias son sistemas de composición, estructura y dinámica complejas y son variados los factores que contribuyen a sus propiedades en conjunto. Mucho del conocimiento que se tiene acerca de estos complejos sistemas se ha desarrollado a partir de estudios sobre sistemas modelo sencillos; sin embargo, en los últimos años ha surgido la necesidad de elucidar los factores que determinan las propiedades de productos alimenticios basados en emulsiones reales. Por esta razón, los investigadores están abordando ahora aspectos más complejos de este tipo de alimentos, tales como las interacciones entre ingredientes, los efectos de las condiciones de procesado y de la estabilidad de fases (Campos y col., 1995; Dickinson, 1992, 1995; Dickinson y Mc Clements, 1995; Dalgleish, 1996; Hunt y Dalgleish, 1994, 1995; Demetriades y col., 1997 a,b).

Los aderezos para ensalada son emulsiones del tipo aceite en agua que se elaboran a partir de una fase oleosa dispersa (aceites comestibles), un estabilizante (generalmente surfactantes no-iónicos) y una fase acuosa dispersante que contiene habitualmente vinagre, sales, endulzantes y espesantes, acompañados de una elevada concentración de ácidos orgánicos. A pesar de la elevada acidez y de la depresión de la actividad acuosa que se obtiene con estos ingredientes, se han informado casos de deterioro microbiano, por lo cual se incluyen en su formulación aditivos antimicrobianos como benzoato de sodio y/o sorbato de potasio (Smittle, 2000).

Los aderezos varían considerablemente en su composición, textura y sabores. La concentración de aceite presente en los mismos cubre un amplio rango que va desde 0,5% p/p hasta valores superiores al 80% p/p (Tabla 5.1.1). Así, el límite inferior de este rango se halla representado por aquellos productos para dietas, considerados libres de grasa ("fat free"), incrementándose hasta valores cercanos a 45-60% p/p en productos considerados normales ("regulares"). Las mayonesas suelen oscilar entre 60 y 85% p/p.

Para formular una emulsión que sea cinéticamente estable por un período de tiempo razonablemente largo, es necesario contar con un emulsificante y/o un agente espesante que produzca una energía de activación lo suficientemente grande como para prevenir los cambios del sistema (Mc Clements, 1999).

Los agentes emulsificantes conocidos como surfactantes son ampliamente utilizados en la industria alimentaria con el objeto de mejorar la formación y estabilidad de las emulsiones (Dickinson 1992). Éstos se adsorben a la superficie de las gotas de emulsión durante la homogeneización y forman una membrana protectora que previene el agregado de las mismas durante una colisión. Algunos de los surfactantes más utilizados en la industria alimentaria son compuestos derivados del sorbitol esterificados con ácidos grasos (Span®) y sus correspondientes ésteres de sorbitano polioxietileno (Tween®). La familia de los Tween® posee características hidrofílicas debido a la presencia de cadenas de oxietileno. El Tween® 20 (monolaurato de sorbitano polioxietileno) se encuentra esterificado por una molécula de ácido láurico y etoxilado por 20 moléculas de oxietileno. El Código Alimentario Argentino aprueba su empleo en alimentos (emulsionante 432).

Tabla 5.1.1 Aderezos para ensalada: contenido de grasa (g) por porción, de los distintos tipos comercializados en el mercado mundial. (The Association for Dressings and Sauces, 2005).

	Aderezo "Ranch" grasa promedio (g) por porción (2 cucharadas)	Aderezo "Italian" grasa promedio (g) por porción (2 cucharadas)	Mayonesa grasa promedio (g) por porción (1 cucharada)
Regulares	16	10	10
Reducidos en grasas (<i>Reduced fat</i>) 25% menos de grasa que el aderezo regular	12	7,5	7,5
Livianos (<i>Light</i>) 50% menos de grasa que el aderezo regular	8	5	5
Bajos en grasas (<i>Low fat</i>) con no más de 3 g de grasa por porción	3	3	3
Libres de grasa (<i>Fat free</i>) con menos de 0,5 g de grasa por porción	0	0	0

El C.A.A. (2006) establece en el artículo 1282 que: "las salsas, aderezos o aliños podrán elaborarse en forma de una emulsión de aceite vegetal comestible con emulsificantes admitidos, sazonada con vinagres y/o jugo de limón con o sin especias o condimentos, aceites esenciales, extractos aromatizantes y envasada en un recipiente bromatológicamente apto". Los productos

así elaborados deben rotularse como Salsa, Aderezo o Aliño ..., llenando el espacio en blanco con el nombre de fantasía u otro vocablo que describa al producto. El C.A.A. (2006) contempla la modificación de alimentos con la finalidad de reducir su contenido lipídico, y establece que: "Con la designación de Alimentos Dietéticos de Contenido Lipídico Reducido se entienden aquellos que contienen como máximo el 50% del contenido lipídico de los alimentos corrientes correspondientes, listos para el consumo." En cuanto a aderezos y mayonesas de mayor concentración lipídica, estipula: "Como excepción, en el caso de alimentos corrientes de alto contenido graso para los que el presente Código ha establecido un contenido mínimo de materia grasa del 70%, se admitirá una reducción del contenido lipídico de como mínimo el 30% para considerarlos como pertenecientes a esta categoría".

Los polisacáridos juegan un rol muy importante en la estabilización de coloides alimenticios. Estos agentes estabilizantes aumentan la viscosidad de la fase continua manteniendo las gotas separadas en la emulsión una vez formada. De este modo, la colisión entre las gotas se produce menos frecuentemente retardando o inhibiendo el cremado, floculación o coalescencia durante el almacenamiento a largo plazo. Las propiedades funcionales de estos polímeros alimenticios se deben a su hidrofiliidad, alto peso molecular y capacidad de gelificación, las cuales llevan a la formación de una barrera macromolecular entre las gotas dispersas en el medio acuoso (Dickinson y col., 1988). El polisacárido microbiano xantano, conocido también como goma xántica, es ampliamente utilizado como espesante de aderezos para ensaladas, en los cuales previene el cremado de la emulsión. El mecanismo de estabilización se debe al aumento de la viscosidad de las soluciones y a una interacción repulsiva entre las gotas de la fase dispersa y las moléculas de xantano (Parker y col., 1995). El éxito comercial de esta goma se debe a su elevada viscosidad, tolerancia al NaCl, estabilidad térmica y compatibilidad para ser utilizada en alimentos (Kwon y col., 1987).

La estabilidad de un aderezo es un concepto relativo. Todos los aderezos son emulsiones termodinámicamente inestables que terminarán separándose en sus fases componentes al cabo de cierto tiempo. En el estudio de la vida útil de una emulsión, el principal criterio de estabilidad es la desaparición visual de la uniformidad del sistema (Robins, 2000). El cremado, fenómeno gravitacional que ocurre cuando la fase menos densa tiende a dirigirse hacia arriba mientras que la más densa tiende a acumularse en el fondo del recipiente, es uno de los factores que afecta significativamente la calidad de una emulsión alimenticia. El método más simple para evaluar la separación gravitacional consiste en colocar la emulsión en un tubo transparente graduado, dejarlo por un determinado tiempo en condiciones medioambientales controladas y luego medir la altura de las fases formadas (Mc Clements, 1999).

Algunas de las características más importantes de los alimentos constituidos por emulsiones, entre las que se podrían citar vida útil, apariencia, textura y flavor, están

determinadas por el tamaño de las gotas que contienen (Dickinson, 1992). En consecuencia, la determinación de la distribución de tamaños de gotas de la emulsión resulta relevante cuando se caracterizan alimentos tales como los aderezos para ensalada.

Esta sección del capítulo presenta una serie de estudios realizados sobre emulsiones que modelan aderezos para ensalada. Las emulsiones se diseñaron de modo tal que su composición fuera similar a la de aderezos.

5.1.2 Objetivos

- Aportar información que contribuya al estudio de la estabilidad de emulsiones alimenticias.
- Formular emulsiones estables que modelen aderezos para ensalada contemplando las siguientes variables: i) concentración del espesante (goma xántica); ii) concentración del estabilizante (polisorbato); iii) concentración oleosa.

5.1.3 Materiales y Métodos

5.1.3.1 Estabilidad visual

El método más simple para determinar la estabilidad de una emulsión a lo largo del tiempo es evaluando la separación gravitacional de sus fases componentes mediante una observación visual (Mc Clements, 1999). A tal efecto, las emulsiones se colocaron en probetas de 100 ml graduadas, las cuales se sellaron con film poliéster para prevenir la evaporación y se almacenaron, por duplicado, a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ en cámaras de temperatura constante y convección forzada (Memmert 854 Schabach, Alemania) durante 3 meses. Los sistemas fueron observados periódicamente y se determinó el período de estabilidad como el tiempo en el cual se observó la aparición de una interfase (Quintana, 2003).

5.1.3.1.1 Sistemas modelo. Composición.

La composición de las emulsiones modelo se formuló en base a los sistemas modelo acuosos presentados en el capítulo tres y contempló el agregado de aceite de maíz, como fase oleosa y, goma xántica y Tween® 20, como estabilizantes. Se utilizó un sistema base formado por una solución acuosa de sorbato de potasio. El pH de los sistemas se ajustó a 3,5 por adición de una solución concentrada de ácido cítrico (500 g.L⁻¹). En la Tabla 5.1.2 se detalla la composición de los sistemas ensayados.

Las concentraciones de goma xántica ensayadas cubrieron un rango de 2,00 a 5,00 g.kg⁻¹, mientras que el surfactante se agregó a las emulsiones en niveles de 20,00 y 40,00 g.kg⁻¹. Cabe aclarar que, si bien la concentración máxima de Tween® 20 autorizada por el C.A.A. para aderezos es de 5,00 g.kg⁻¹, se emplearon concentraciones más elevadas del surfactante, a fin de observar mejor su efecto.

Los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. El vinagre fue de calidad alimenticia, al igual que la goma xántica, la cual fue suministrada por Degussa S.A.I.C. (Buenos Aires, Argentina) y el Tween® 20, de grado analítico, fue de Anedra (Buenos Aires, Argentina).

Las concentraciones de aceite se eligieron en función del contenido de aceite de aderezos para ensalada, considerando formulaciones convencionales (entre 40 y 60 % p/p aceite) y de menor contenido lipídico (< 40 % p/p aceite). Se utilizó aceite de maíz comercial de grado alimenticio (Refinerías de Maíz, Buenos Aires, Argentina), sin ningún tratamiento posterior. La composición del aceite utilizado, proporcionada por el fabricante, se presenta en la Tabla 5.1.3.

A fin de establecer formulaciones que sirvieran para posteriores ensayos de reto microbiano, se agregaron medios de cultivo a las fases acuosas de los sistemas modelo. Los medios de cultivo utilizados para enriquecer la fase acuosa de las emulsiones en estudio, caldo Sabouraud y caldo MRS, fueron de Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia).

Tabla 5.1.2 Composición [g.kg⁻¹] de los sistemas modelo utilizados para determinar la estabilidad de las emulsiones durante el almacenamiento.

Sistema	Goma xántica	Tween	Aceite	Sistema	Goma xántica	Tween	Aceite
5.1 A	2,00	0	110,00	5.19 A	4,00	20,00	230,00
5.1 B				5.19 B			
5.2 A	3,00	0	110,00	5.20 A	5,00	20,00	230,00
5.2 B				5.20 B			
5.3 A	4,00	0	110,00	5.21 A	2,00	40,00	230,00
5.3 B				5.21 B			
5.4 A	5,00	0	110,00	5.22 A	3,00	40,00	230,00
5.4 B				5.22 B			
5.5 A	2,00	20,00	110,00	5.23 A	4,00	40,00	230,00
5.5 B				5.23 B			
5.6 A	3,00	20,00	110,00	5.24 A	5,00	40,00	230,00
5.6 B				5.24 B			
5.7 A	4,00	20,00	110,00	5.25 A	2,00	0	460,00
5.7 B				5.25 B			
5.8 A	5,00	20,00	110,00	5.26 A	3,00	0	460,00
5.8 B				5.26 B			
5.9 A	2,00	40,00	110,00	5.27 A	4,00	0	460,00
5.9 B				5.27 B			
5.10 A	3,00	40,00	110,00	5.28 A	5,00	0	460,00
5.10 B				5.28 B			
5.11 A	4,00	40,00	110,00	5.29 A	2,00	20,00	460,00
5.11 B				5.29 B			
5.12 A	5,00	40,00	110,00	5.30 A	3,00	20,00	460,00
5.12 B				5.30 B			
5.13 A	2,00	0	230,00	5.31 A	4,00	20,00	460,00
5.13 B				5.31 B			
5.14 A	3,00	0	230,00	5.32 A	5,00	20,00	460,00
5.14 B				5.32 B			
5.15 A	4,00	0	230,00	5.33 A	2,00	40,00	460,00
5.15 B				5.33 B			
5.16 A	5,00	0	230,00	5.34 A	3,00	40,00	460,00
5.16 B				5.34 B			
5.17 A	2,00	20,00	230,00	5.35 A	4,00	40,00	460,00
5.17 B				5.35 B			
5.18 A	3,00	20,00	230,00	5.36 A	5,00	40,00	460,00
5.18 B				5.36 B			

Todos los sistemas contenían: 0,500 g.kg⁻¹ sorbato de potasio; 0,075 g.kg⁻¹ EDTA; 25,000 g.kg⁻¹ vinagre; cloruro de sodio en c.s.p. que la a_w del sistema fuera 0,985; ácido cítrico en c.s.p. ajustar pH 3,5.

Todos los sistemas con el sufijo **A** contenían caldo Sabouraud y los que llevan el sufijo **B** contenían caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe).

5.1.3.1.2 Preparación de los sistemas modelo

Los sistemas modelo se prepararon por pesada directa de los distintos componentes. En primer lugar, se constituyó la fase acuosa de los sistemas modelo utilizando un agitador magnético (Velp, Alemania) para facilitar la disolución. El agregado de goma xántica se realizó antes del agregado de vinagre a los sistemas. Las fases acuosas así constituidas se dejaron reposar durante 12 h para permitir la remoción de burbujas de aire y facilitar una solubilización uniforme de la goma (Dickinson y col., 1994).

El pH se ajustó a 3,5 mediante el agregado de gotas de una solución concentrada de ácido cítrico (500 g.L^{-1}). Para esta determinación, se empleó un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (Accumet, Denver, Estados Unidos), previamente calibrado con buffers pH 4,0 y 7,0 (Merck, Buenos Aires, Argentina). El error en la determinación fue de 0,02 unidades de pH.

Una vez preparadas las fases acuosas de los sistemas modelo, se procedió a la emulsificación de la fase oleosa correspondiente, mediante un homogeneizador de uso doméstico (Braun Minipimer, mod. 550, Alemania). Este procedimiento se realizó sobre un baño de hielo para evitar el calentamiento de los sistemas. La homogeneización se llevó a cabo durante 3 minutos a 550 r.p.m. Se realizó *a posteriori* el control de pH.

Tabla 5.1.3 Composición del aceite de maíz utilizado para preparar las emulsiones.

Componente	Composición
Triglicéridos	15% ácidos grasos saturados
	34% ácidos grasos monoinsaturados
	51% ácidos grasos poliinsaturados
Antioxidantes	No contiene

5.1.3.2 Determinación de la distribución de tamaños de gotas

La distribución de tamaño de gota de las emulsiones modelo se determinó utilizando difracción por láser (LALLS: Low Angle Laser Light Scattering) con el equipo MASTERSIZER® (Malvern, Inc., Worcs., Reino Unido). Estas mediciones fueron realizadas en el Laboratorio de Control de Calidad de Refinerías de Maíz, Planta Pilar, Pcia. de Buenos Aires. El método se basa en que cuando un haz de luz atraviesa una emulsión, éste se dispersa en un ángulo que es inversamente proporcional al tamaño de las gotas presentes. La intensidad de la luz dispersada es leída mediante una serie de detectores que se encuentran en diferentes ángulos; luego, el posterior análisis del patrón de difracción permite calcular la distribución de tamaño de partícula (gotas, en el caso de las emulsiones). La interpretación del patrón de difracción requiere de la aplicación de una teoría adecuada que describa el patrón de dispersión de luz de las partículas. Las teorías que relacionan los datos de dispersión de luz con las distribuciones de tamaños de gotas están basadas en análisis matemáticos sobre la propagación de una onda electromagnética a través de un conjunto de partículas (Mc Clements, 1999).

Los distintos tamaños de gotas que se pueden encontrar en una emulsión no suelen ser uniformes, lo que da lugar a una distribución más o menos amplia de los mismos. Si el tamaño de gota exhibe una distribución estadística amplia se dice que la emulsión es polidispersa, en contraposición a emulsiones monodispersas que son aquéllas que presentan un tamaño de gota uniforme. La polidispersión de una emulsión es un parámetro importante que influye sobre la estabilidad de los sistemas. A partir de la distribución de tamaño de gota se puede calcular la varianza correspondiente, la cual es un índice de dicha polidispersión (Mc Clements, 1999). En las emulsiones, la relación área interfacial/volumen tiene una marcada incidencia en su estabilidad por lo que el histograma de distribución de tamaño de gota se expresa como el volumen porcentual que ocupan las gotas que presentan diámetros comprendidos dentro del intervalo de clase (intervalo de tamaño de gota), calculando el diámetro medio de Sauter, $D_{[3,2]}$, que considera un factor de ponderación vinculado a la relación del volumen y el área interfacial. Así, el diámetro medio de Sauter se calcula a partir de los diámetros de las gotas individuales, utilizando la siguiente expresión:

$$D_{[3,2]} = \frac{\sum_{i=1}^N (n_i d_i^3)}{\sum_{i=1}^N (n_i d_i^2)}$$

Donde d_i es el diámetro de la gota, N el número total de gotas y n_i el número de gotas de diámetro d_i . El valor calculado es un indicador de tendencia central de la distribución de tamaños de gotas expresada en volumen.

5.1.3.2.1 Preparación de los sistemas modelo

La formulación de las emulsiones ensayadas se detalla en la Tabla 5.1.4.

Los sistemas modelo emulsionados se prepararon, por duplicado, como se indica en el punto 5.1.3.1.2. Previo a la determinación, las emulsiones se almacenaron durante 24 h en cámara de temperatura constante a 25°C.

5.1.3.2.2 Análisis estadístico de los resultados

Todas las determinaciones se realizaron, por lo menos, por duplicado y se reportan los promedios de éstas, en todos los casos.

Para establecer diferencias significativas entre los diámetros medios de Sauter de las distintas formulaciones ensayadas se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey, con un nivel de significación, α : 0,05. Para ello se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 4,0 (Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, Estados Unidos).

Tabla 5.1.4 Composición de las emulsiones modelo para la determinación de tamaño de gota, expresados en [g.kg⁻¹].

Sistema	Tween	Aceite
5.4 A	0	110,00
5.12 A	40,00	110,00
5.16 A	0	230,00
5.20 A	20,00	230,00
5.24 A	40,00	230,00
5.28 A	0	460,00
5.36 A	40,00	460,00
5.37 A	10,00	230,00
5.4 B	0	110,00
5.8 B	20,00	110,00
5.16 B	0	230,00
5.20 B	20,00	230,00
5.28 B	0	460,00
5.32 B	20,00	460,00

Los sistemas con el sufijo **A** contenían caldo Sabouraud y los que llevan el sufijo **B** contenían caldo MRS. Todos los sistemas contenían: 0,500 g.kg⁻¹ sorbato de potasio; 0,075 g.kg⁻¹ EDTA; 25,000 g.kg⁻¹ vinagre; 5,000 g.kg⁻¹ de goma xántica; cloruro de sodio en c.s.p. que la a_w del sistema fuera 0,985; ácido cítrico en c.s.p. ajustar pH 3,5. A cada uno de los sistemas se le agregó la cantidad necesaria de caldo nutritivo que correspondiera para formular 1000 g de emulsión.

5.1.4 Resultados y Discusión

La concentración de goma xántica en las emulsiones constituyó el factor determinante de su estabilidad en el tiempo, ya que sólo aquellas formuladas con 5,00 g.kg⁻¹ de polisacárido se mantuvieron estables, es decir, no presentaron separación visible (cremado) entre sus fases a lo largo del período de almacenamiento, independientemente del nivel de aceite y Tween utilizado. Dentro de este conjunto de emulsiones (Sistemas: 5.4 A y B, 5.8 A y B, 5.12 A y B, 5.16 A y B, 5.20 A y B, 5.24 A y B, 5.28 A y B, 5.32 A y B, 5.36 A y B; Tabla 5.1.2), la presencia de los distintos medios de cultivo, caldos Sabouraud y MRS, no ejerció efecto alguno sobre la estabilidad de los sistemas.

En función de los resultados comentados precedentemente, se seleccionaron algunos sistemas y se adicionó el sistema 5.37 A, conteniendo 10,00 g.kg⁻¹ de Tween® 20, a efectos de la determinación de la distribución de tamaños de gotas en los mismos (Tabla 5.1.4).

El tamaño de gota usualmente disminuye a medida que aumenta el tiempo de homogeneización o la velocidad de rotación del dispositivo mezclador, hasta que se alcanza un límite inferior que depende de la naturaleza y la concentración de los ingredientes usados. Típicamente, las gotas producidas por un mezclador de alta velocidad (dentro de los cuales el

rango de velocidades oscilaría entre 20 y 2000 r.p.m) tienen desde 2 hasta 10 μm de diámetro de sauter (Mc Clements, 1999). Como puede observarse en la Tabla 5.1.5, en general las emulsiones mostraron valores de $D[3,2]$ que caerían dentro de este rango o por debajo del mismo. Sólo las emulsiones que contenían caldo Sabouraud, en ausencia de surfactante (sistemas 5.4 A, 5.16 A y 5.28 A), presentaron $D[3,2]$ superiores al rango citado previamente.

Los diámetros medios de Sauter determinados para los sistemas modelo indicarían que las formulaciones ensayadas se asemejan con bastante aproximación a sistemas alimenticios reales, dado que los tamaños de gotas alcanzados se encuentran dentro del rango considerado, salvo aquellos mencionados previamente. Cabe señalar entonces que, atendiendo a los objetivos propuestos, las formulaciones mencionadas en la Tabla 5.1.4, resultaron aceptables para posteriores ensayos de reto microbiano.

Los resultados obtenidos de la medición de tamaños de gotas remarcan la influencia del uso de surfactantes sobre la estabilidad de las emulsiones ya que aquellos sistemas que contenían Tween® 20, independientemente de la concentración ensayada (10,00; 20,00 ó 40,00 g.kg^{-1}), presentaron diámetros de partículas (gotas) mucho más pequeños que las emulsiones que no contenían surfactante, poniendo de manifiesto el rol que éste juega en la dispersión y la conformación de las gotas de aceite en la emulsión (Tabla 5.1.5). La reducción del tamaño de las gotas de aceite en una emulsión mejora considerablemente su estabilidad frente al fenómeno de separación gravitacional ya que una emulsión que contiene pequeñas gotas usualmente posee una vida útil más prolongada (mayor estabilidad cinética) que otra cuyas gotas son grandes, aunque la primera fuera termodinámicamente más inestable (ya que posee un área interfacial mucho mayor). Un claro ejemplo de este hecho es la homogeneización de la leche cruda que retarda el cremado de la emulsión alimenticia por reducción del tamaño de sus gotas de grasa (Swaisgood, 1996). Este fenómeno obedece a la ley de Stokes, que indica que la velocidad a la cual se mueve una partícula (gota, en este caso) es proporcional al cuadrado de su radio (Mc Clements, 1999).

Tabla 5.1.5 Diámetros medios de Sauter $D[3,2]$ obtenidos de la determinación de tamaños de gotas en las emulsiones modelo.

Sistema	$D[3,2] \pm d$
	(μm)
5.4 A	$12,52 \pm 0,30^a$
5.12 A	$1,98 \pm 0,01^d$
5.16 A	$24,4 \pm 2,74^b$
5.20 A	$1,97 \pm 0,01^d$
5.24 A	$1,86 \pm 0,01^d$

5.28 A	46,93 ± 8,74 ^c
5.36 A	1,56 ± 0,01 ^d
5.37 A	2,08 ± 0,01 ^d
5.4 B	3,46 ± 0,01 ^d
5.8 B	1,94 ± 0,01 ^d
5.16 B	3,72 ± 0,01 ^d
5.20 B	1,95 ± 0,01 ^d
5.28 B	6,96 ± 0,01 ^e
5.32 B	1,75 ± 0,01 ^d

d: Desviación estándar.

Los valores de D[3,2] informados corresponden al promedio de las mediciones realizadas a las muestras y sus respectivas réplicas.

Los superíndices con la misma letra indican que no existen diferencias significativas entre los sistemas ($p > 0,05$).

En ausencia de Tween[®] 20 (sistemas 5.4 A y B, 5.16 A y B, 5.28 A y B), la distribución de tamaño de gota describió curvas bimodales, presentando tamaños de gotas en un amplio rango de diámetros, cuyo valor superior de D[3,2] se situó cerca de los 50 μm (sistema 5.28 A). Una de las curvas descritas puede observarse en la Figura 5.1.1, correspondiente al sistema 5.16 B. Esta curva es bimodal y sus características resultan propias de emulsiones en las cuales se produjeron fenómenos de coalescencia (Brocklehurst y col., 1993). Dentro del grupo conformado por aquellas formulaciones sin surfactante, es de destacar el menor D[3,2] obtenido con caldo MRS (sistemas 5.4 B, 5.16 B y 5.28 B) comparado con los valores correspondientes a los sistemas con caldo Sabouraud (sistemas 5.4 A, 5.16 A y 5.28 A). Esta diferencia puede deberse a los distintos constituyentes de ambos medios de cultivo (Apéndice 1), entre los cuales las distintas proteínas y el Tween[®]80, presente en el caldo MRS, podrían haber influido en la disminución de los tamaños de gotas. Ahora bien, esta diferencia no se visualizó en los sistemas que contenían Tween[®] 20. Si se comparan los sistemas cuya formulación es idéntica excepto en lo que respecta al medio de cultivo (sistema 5.20 A vs. sistema 5.20 B), se observa que no existen diferencias significativas entre los mismos (Tabla 5.1.5). Probablemente la presencia de Tween[®] 20, a cualquiera de los niveles ensayados, enmascare el efecto que los constituyentes del medio de cultivo puedan ejercer.

La emulsión 5.28 A que contenía mayor volumen de aceite (460,00 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) y no tenía surfactante, presentó un D[3,2] muy alto. Existen referencias bibliográficas que indican que las emulsiones con diámetros de Sauter elevados tienden a la floculación (McClements, 1999). No obstante, en nuestro caso, no se apreciaron visualmente signos de desestabilización. El elevado valor D[3,2] mencionado relativizaría la precisión de este parámetro, ya que la teoría usada para calcular la distribución de tamaños de gota asume que las partículas son esferas homogéneas

aisladas y el fenómeno de floculación produce una agregación de las partículas dando lugar a partículas heterogéneas (Rawle, 2003).

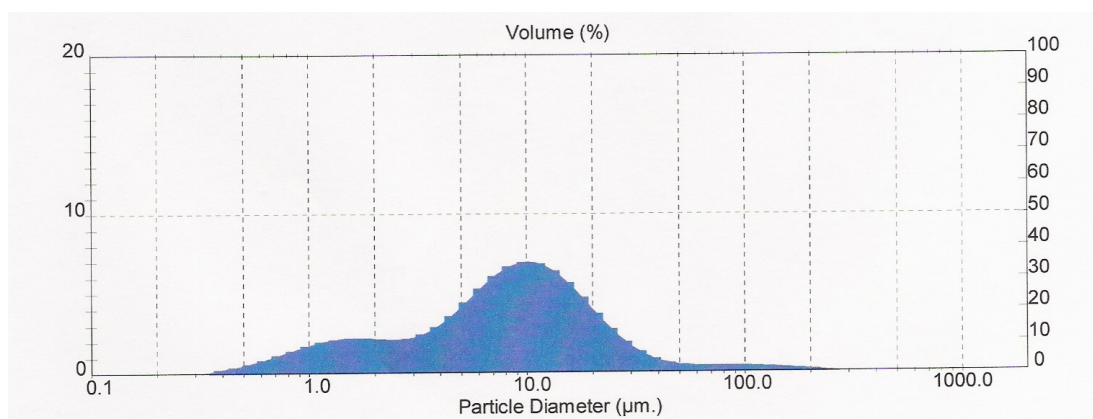


Figura 5.1.1 Distribución de tamaños de gotas de una emulsión sin surfactante (sistema 5.16 B). En el eje de las abscisas se representa el diámetro de partícula ("Particle Diameter"; [μm]) y en el de las ordenadas el volumen de gotas (Volume [%]), expresado como un porcentaje del volumen total de la emulsión.

En la Figura 5.1.2 puede observarse el efecto sobre la distribución del tamaño de gotas que impartieron las distintas concentraciones de aceite en las emulsiones. En este caso, un incremento en el nivel de aceite significó una disminución en la polidispersión de las emulsiones, representada por la varianza de las distribuciones de gotas correspondientes (los valores pertinentes se informan en cada gráfica).

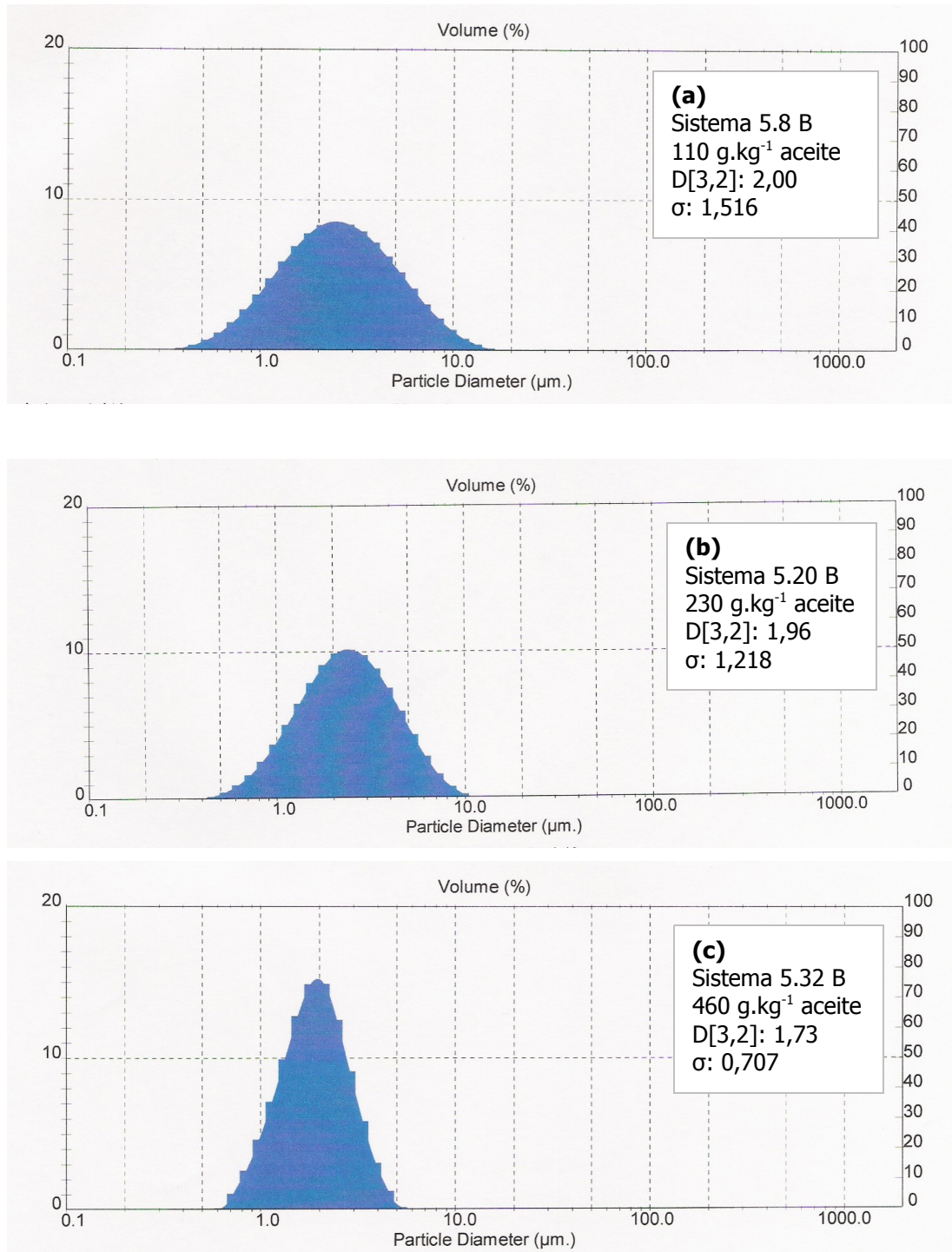


Figura 5.1.2 Distribuciones de tamaños de gotas de las emulsiones: Efecto del nivel de aceite.

5.1.5 Conclusiones

Los ensayos de estabilidad visual permitieron establecer formulaciones de sistemas modelo de aderezos que mantuvieron su integridad durante un período de almacenamiento de tres meses. Las emulsiones formuladas para todos los niveles de aceite requieren una concentración de goma xántica de $5,00 \text{ g.kg}^{-1}$ de polisacárido para mantener su estabilidad durante el tiempo de almacenamiento, permitiendo así emplear estas emulsiones para abordar tanto estudios de estabilidad físico-química como ensayos de reto microbiano.

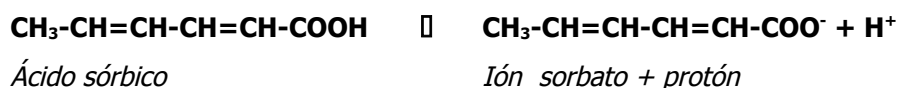
El agregado de Tween® 20 provoca una reducción del tamaño de gota de las emulsiones, contribuyendo a su estabilidad. Mientras que, aquellos sistemas que no contenían Tween® 20, presentaron diámetros de gota significativamente mayores que aquellos sistemas que lo contenían, aseverando su rol como estabilizante en este tipo de emulsiones.

5.2 COEFICIENTE DE REPARTO DEL SORBATO EN EMULSIONES

5.2.1 Introducción

Las emulsiones tales como los aderezos para ensalada y las mayonesas dependen fuertemente de la concentración de ácidos orgánicos para su preservación; los ácidos acético, cítrico o láctico, si bien pueden agregarse para otorgar ciertas características organolépticas (por ejemplo, el sabor a limón que imparte el ácido cítrico), contribuyen a su conservación. Estas emulsiones también contienen ácido sórbico o benzoico, que se agregan específicamente como aditivos antimicrobianos. Además, la concentración de azúcares o sales presente puede contribuir a la estabilidad microbiológica de estos alimentos (Brocklehurst y col., 1993).

Una propiedad importante de los ácidos orgánicos, que influye sobre su efectividad como agentes antimicrobianos, es su *disociación*. A continuación se muestra la disociación del ácido sórbico.



Al alcanzar el equilibrio, la concentración de ambas formas permanece constante. Este equilibrio es dinámico. La relación de la concentración entre la forma no disociada y la disociada del ácido viene dada por la constante de disociación, K_a . Esta constante varía de acuerdo al ácido débil considerado y se ve afectada por la temperatura. Debido a que su valor es extremadamente pequeño, por conveniencia se la refiere a su logaritmo negativo, denominado pKa. La constante de disociación, K_a , del ácido sórbico es $1,73 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, a 25°C , y su pKa corresponde al valor 4,76.

$$K_a = \frac{[\text{sorbato}] [\text{H}^+]}{[\text{ácido sórbico}]} \quad (5.2.1)$$

Cuando el pH de la emulsión es igual al pKa del ácido, la concentración de ácido sin disociar es igual a la concentración de ácido disociado. A medida que el pH de la emulsión disminuye, la proporción de ácido no disociado aumenta. Esto es importante desde el punto de vista microbiológico, ya que la porción de ácido no disociado es la forma predominante con

actividad antimicrobiana, mientras que la actividad de la forma disociada del ácido es baja (Sofos, 2000).

Ahora bien, la forma no disociada de los ácidos orgánicos débiles es lipofílica y, por lo tanto, soluble en la fase oleosa de una emulsión. Cuando se preparan emulsiones, parte del ácido se disuelve en la fase lipídica y por consiguiente no está disponible para actuar como antimicrobiano, ya que el crecimiento de los microorganismos ocurre en la fase acuosa.

El *coeficiente de partición*, P , el cual describe la relación de concentraciones del ácido entre ambas fases, una vez que se ha distribuido, se define como:

$$P = [A]_{oleosa} / [A]_{acuosa} \quad (5.2.2)$$

$[A]_{oleosa}$: concentración de ácido orgánico en fase oleosa.

$[A]_{acuosa}$: concentración de ácido orgánico en fase acuosa.

En relación al equilibrio:



El valor de P depende de la temperatura y es independiente de la concentración. Sin embargo, es común determinar el $P_{aparente}$, el cual evalúa la relación entre el ácido disociado y sin disociar en ambas fases. El $P_{aparente}$ varía con el pH, ya que los ácidos carboxílicos disociados tienen menor afinidad por las fases orgánicas que las formas sin disociar. Para el caso de un ácido monoprótico, como por ejemplo el ácido sórbico, la variación del $P_{aparente}$ con el pH está dada por:

$$P / P_{aparente} = 1 + K_a / [H^+] \quad (5.2.3)$$

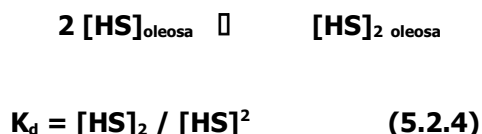
Si se calcula la variación de $P / P_{aparente}$ con el pH para el ácido sórbico, se obtienen los valores citados en la Tabla 5.2.1.

Tabla 5.2.1 Variación de $P / P_{aparente}$ con el pH para el ácido sórbico (Wedzicha y col., 1991).

pH	3	4	5	6	7
P/P_{ap}	1,03	1,31	4,09	31,9	310

Es de destacar que, a valores de pH menores al pKa del ácido, hay poco efecto del pH, tal el caso de los sistemas en estudio, los aderezos para ensalada, cuyo pH es de 3,5.

A su vez, los ácidos carboxílicos como el sórbico (HS), tienden a formar dímeros cuando están en un medio orgánico, entonces se da el siguiente equilibrio, que ocurre simultáneamente con la partición:



K_d representa la constante de dimerización.

HS: ácido sórbico

La formación de dímeros tiende a reducir la concentración del ácido sin disociar en la fase oleosa y por lo tanto, más ácido pasa a la misma. Teniendo en cuenta la ley de acción de masas, el equilibrio de la partición y el de dimerización, se obtiene la siguiente relación:

$$P_{ap} = P + 2P^2 \cdot K_d \cdot [\text{HS}]_{\text{acuosa}} \quad (5.2.5)$$

De la que se desprende que el coeficiente de partición aparente es dependiente de la concentración de ácido en la fase acuosa; es de esperar entonces que al aumentar la $[\text{HS}]_{\text{acuosa}}$ aumente el P_{ap} (Wedzicha y col., 1991).

Comparado con otros aditivos antimicrobianos comúnmente utilizados en alimentos, el ácido sórbico tiene un coeficiente de reparto aceite-agua mucho más favorable (ácido sórbico: 3,1; ácido benzoico: 6,1). Esto mejora su utilidad en alimentos que contienen lípidos, tales como mayonesas, margarinas y aderezos para ensalada, ya que en estas emulsiones aceite-en-agua un tenor relativamente mayor de sorbato, comparado con otros aditivos antimicrobianos, se encontrará en la fase acuosa, susceptible a la contaminación microbiana. La presencia de la fase lipídica reduciría la concentración de sorbato en la fase acuosa donde es necesario el control microbiológico (Oka, 1960). La presencia de sales, azúcares y otros componentes solubles del alimento también reducirán la concentración de sorbato en la fase acuosa (Sofos y Busta, 1981). Por otro lado, la actividad sinérgica que ejercen sobre la efectividad microbiológica del sorbato las sales y los azúcares, contrarrestaría los efectos negativos de estos solutos sobre la solubilidad del sorbato (Robach y Stateler, 1980; Beuchat, 1981; Praphailong y Fleet, 1997). El uso de surfactantes también comprometería la disponibilidad del antimicrobiano debido a que éste no sólo se repartiría entre las fases acuosa y oleosa, sino que a su vez podría unirse con las

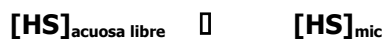
micelas del surfactante presentes en fase acuosa (Kurup y col., 1991a). Este comportamiento puede ser descrito como un efecto de partición aunque las micelas no constituyan una fase separada (Wedzicha y Couet, 1996). Se puede definir entonces un coeficiente de partición micelar, P_{mic} , como:

$$P_{mic} = [HS]_{mic} / [HS]_{acuosa libre} \quad (5.2.6)$$

$[HS]_{mic}$: concentración de ácido sórbico en la fase micelar.

$[HS]_{acuosa libre}$: concentración de ácido sórbico libre en la fase acuosa.

Usualmente, la concentración de los surfactantes no iónicos utilizados para la elaboración de aderezos para ensalada se halla por encima de su concentración micelar crítica (CMC), esto significa que se formarían micelas en la fase acuosa de la emulsión. Las moléculas de ácido sórbico presentes en la fase acuosa estarán en equilibrio con las disueltas en la micela. Por consiguiente, en una emulsión que contiene una fase aceite dispersa en una fase acuosa y un surfactante en solución en esta última fase, se necesitan resolver simultáneamente los siguientes equilibrios para poder así determinar la concentración de ácido sórbico libre que será capaz de ejercer actividad antimicrobiana:



5.2.2 Objetivos

- Determinar los coeficientes de reparto aparentes del sorbato de potasio en emulsiones que modelan aderezos para ensalada.
- Evaluar el efecto que ejerce la presencia de distintos aditivos y de diferentes aceites comestibles sobre el reparto del antimicrobiano en emulsiones.

5.2.3 Materiales y Métodos

5.2.3.1 Composición y preparación de los sistemas modelo

Los sistemas modelo estudiados se prepararon según se detalla en la sección 5.1.3.1.2 agregando los aditivos pertinentes a la fase acuosa de cada emulsión. La composición de las emulsiones se detalla en la Tabla 5.2.1.

El pH de los sistemas se ajustó a 3,5 por adición de una solución concentrada de ácido cítrico (500 g.L⁻¹).

5.2.3.2 Determinación del coeficiente de reparto del ácido sórbico

El procedimiento seguido para la determinación del coeficiente de reparto es el descrito por Huang y col. (1996). Las emulsiones, 40 g de muestra, fueron centrifugadas a 10000 x g, durante 10 minutos a 4°C (Eppendorf, Alemania), a fin de separar las fases. Una vez realizado este procedimiento, se extrajo cuidadosamente la fase acuosa de la emulsión mediante el empleo de una aguja adosada a una jeringa. La determinación del contenido de ácido sórbico se realizó según el método de oxidación de la A.O.A.C. (1990), descrito en la sección 3.1.3.3. El contenido de antimicrobiano se determinó en las emulsiones y en la fase acuosa de las mismas, con objeto de calcular, por diferencia, la concentración del mismo en la fase oleosa. Luego, el coeficiente de partición aparente se obtuvo calculando la relación entre la concentración de ácido disociado y sin disociar entre ambas fases.

5.2.3.3 Análisis estadístico de los resultados

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se reportan los promedios de éstas, en todos los casos.

Para establecer diferencias significativas entre los coeficientes de reparto de las distintas formulaciones ensayadas se aplicaron el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey, con un nivel de significación, α : 0,05. Para ello se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 4,0 (Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, Estados Unidos).

Tabla 5.2.1 Composición de los sistemas modelo emulsionados empleados para la determinación del coeficiente de reparto.

Sistema	Composición (g.kg ⁻¹)									
	5.38	5.39	5.40	5.41	5.42	5.43	5.44	5.45	5.46	5.47
KS	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
NaCl	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	112,000
Nisina	-	-	-	-	-	10,000	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	-	-	130,000	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	240,000	-	-
Miel	-	-	-	-	-	-	-	-	400,00	-
Caldo	-	838,925	-	-	-	-	-	-	-	-
SAB										
Aceite	maíz	maíz	oliva	canola	girasol	maíz	maíz	maíz	maíz	maíz
Aw	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,985	0,910	0,910	0,910	0,910

Todos los sistemas contenían: Aceite (110,000 g.kg⁻¹), EDTA (0,075 g.kg⁻¹), vinagre (25,000 g.kg⁻¹), goma xántica (5,00 g.kg⁻¹) y agua destilada en c.s.p. 1000 g de emulsión, exceptuando el sistema 5.39, cuya fase acuosa estaba constituida por caldo Sabouraud (SAB).

5.2.4 Resultados y Discusión

En la Tabla 5.2.2 pueden observarse los valores de los coeficientes de partición aparentes obtenidos para las distintas emulsiones analizadas.

El coeficiente de reparto del ácido sórbico (P_{ap}) para los sistemas formulados con distintos aceites comestibles (sistemas 5.38, 5.40, 5.41 y 5.42; aceites de: maíz, oliva, canola y girasol, respectivamente) dependió del tipo de aceite utilizado. El valor de P_{ap} resultó significativamente diferente en los sistemas que contenían aceite de maíz (sistema 5.38) y aceite de oliva (sistema 5.40), respecto de los otros aceites. A su vez, no hubo diferencias significativas entre los P_{ap} de los sistemas con aceite de canola (sistema 5.41) y de girasol (sistema 5.42). Según Wan y col. (1986), este efecto diferencial estaría vinculado a la afinidad del antimicrobiano por la fase oleosa, la cual se vería afectada por su composición en ácidos grasos. Los aceites poseen tensiones interfaciales diferentes cuando se ponen en contacto con agua porque presentan diferentes composiciones lipídicas o porque contienen diferentes cantidades de sustancias con superficie activa, tales como ácidos grasos, monoacilgliceroles o diacilgliceroles. Estos componentes lipídicos con superficie activa tienden a acumularse en la interfase aceite-agua disminuyendo la tensión interfacial (Mc Clements, 1999). En base a lo expuesto, cabría esperar que estas condiciones modificaran la afinidad del ácido sórbico y, por

lo tanto su distribución, en cada una de las fases de la emulsión. El valor de P_{ap} más elevado fue el obtenido para el aceite de oliva, rico en ácido oleico (Robinson, 1995). Efectos análogos fueron observados por Lubieniecka-von Shelhorn (1967 a y b).

La presencia de caldo de cultivo Sabouraud en la fase acuosa de la emulsión (sistema 5.39) produjo una significativa disminución del coeficiente de reparto del ácido sórbico, evidenciando un aumento de la afinidad del antimicrobiano por la fase acuosa de la emulsión. Este fenómeno podría estar vinculado a las sustancias proteináceas presentes en el caldo Sabouraud (Apéndice 1). Cuando se homogeneiza aceite en una solución que contiene proteínas, las moléculas de proteína se adsorben a la superficie de las gotas de aceite estabilizando la emulsión, o sea, actuando como tensioactivos (Shimizu, 1995), ello condicionaría el reparto del sorbato.

El agregado de la bacteriocina nisina (sistema 5.43) provocó una reducción significativa del valor de P_{ap} respecto del sistema 5.38. Las bacteriocinas son proteínas biológicamente activas que exhiben propiedades antimicrobianas. Según lo comentado en el párrafo anterior, la presencia de esta proteína podría condicionar el reparto del ácido sórbico en ambas fases. Ahora bien, el valor de P_{ap} en este sistema fue mayor que el obtenido para el sistema 5.39, lo cual podría atribuirse a las diferentes características de las proteínas así como a las diferencias en la cantidad de proteína adsorbida a la interfase aceite-agua durante la emulsificación, que puede ser bastante variable para diferentes proteínas (Shimizu, 1995).

La adición de KCl, miel o mayor cantidad de NaCl (sistemas 5.44, 5.46 y 5.47, respectivamente) incrementó significativamente el valor de P_{ap} con referencia al valor presentado por el sistema 5.38, tomado como formulación base. Este efecto fue descrito previamente por Gooding y col. (1955) y se atribuye a la presencia de estos componentes solubles en la fase acuosa de la emulsión, que a elevadas concentraciones, reducen la solubilidad del ácido sórbico en agua. Los valores obtenidos se hallan en concordancia con aquellos obtenidos por estos autores, quienes destacan que el valor de P_{ap} se incrementa de 3,0 a valores superiores a 5,0.

La presencia de glicerol promovió una significativa disminución del coeficiente de reparto (Tabla 5.2.2, sistema 5.45 vs. sistema 5.38). Esto concuerda con lo descrito por Sofos (1989).

Tabla 5.2.2 Coeficientes de reparto del ácido sórbico en los sistemas modelo emulsionados.

Sistema	P_{ap} *
5.38	3,7 ± 0,1 ^a
5.39	2,2 ± 0,1 ^{h,i}
5.40	4,3 ± 0,1 ^g
5.41	2,6 ± 0,1 ^j
5.42	2,4 ± 0,1 ^{i,j}
5.43	2,9 ± 0,1 ^e
5.44	6,5 ± 0,1 ^d
5.45	2,2 ± 0,1 ^{h,i}
5.46	4,2 ± 0,1 ^g
5.47	5,0 ± 0,1 ^c

* Los valores se reportan como (**x_m±d**), siendo x_m : valor medio y d: desviación estándar.

Todas las concentraciones corresponden a la fase acuosa de los sistemas en estudio.

Los sistemas con la misma letra no presentan diferencias significativas (p>0,05).

5.2.5 Conclusiones

De los resultados expuestos se infiere que: el agregado de ciertos aditivos y la fase oleosa empleada afectan al coeficiente de reparto aparente. En particular, el uso de medios para el cultivo microbiano condicionaría el reparto del ácido sórbico en las distintas fases de una emulsión en situaciones experimentales.

La relación de reparto, la cual refleja la solubilidad del ácido sórbico en lípidos respecto del agua, depende de la naturaleza de los aceites individuales. Los aceites de canola y girasol presentaron coeficientes de reparto cuyos valores son menores a los hallados para los aceites de maíz y de oliva.

La presencia de sales o azúcares en la fase acuosa de la emulsión produjo un aumento del valor del coeficiente de reparto evidenciando una reducción de la afinidad del antimicrobiano por la fase acuosa, debido a que estos aditivos reducirían la solubilidad de los sorbatos en esta fase.

Las proteínas presentes en el caldo de cultivo así como el polipéptido nisina, produjeron una reducción del valor de P_{ap} respecto del valor del sistema control.

5.3 DEGRADACIÓN OXIDATIVA DEL SORBATO EN EMULSIONES

5.3.1 Introducción

Si bien se sabe que el ácido sórbico es estable puro y en forma seca y que se oxida en soluciones acuosas, el conocimiento de su estabilidad en sistemas alimenticios es limitado y, los resultados reportados son diversos. La degradación oxidativa del sorbato en alimentos está influenciada por la composición del alimento y por el procesamiento, manipulación y condiciones de almacenamiento (Sofos, 1989; Gerschenson y Campos, 1995).

De acuerdo a la literatura, se reportan pérdidas significativas de sorbatos durante el almacenamiento de ciertos alimentos. Estas pérdidas, debidas a la degradación del antimicrobiano, dependen de: el tiempo y la temperatura de almacenamiento, el contenido de sorbato, el contenido de humedad y el tipo de alimento, el pH, el material de envasado, las condiciones de procesamiento y de otros aditivos o ingredientes presentes (Bolin y col., 1980; Vidyasagar y Arya, 1984; Gerschenson y col., 1986; Gerschenson y Campos, 1995; Gliemmo y col., 2001)

En general, la degradación del sorbato ocurre más lentamente en los alimentos que en soluciones acuosas. En jugos de frutas pasteurizados (manzanas, grosellas negras y uvas), la degradación del ácido sórbico fue <3% después de 320 días a 20°C, mientras que en solución acuosa, bajo las mismas condiciones, se incrementó en el rango de 25% a 80%, dependiendo de la composición del sistema, luego de cinco meses de almacenamiento (Heintze, 1971).

En algunos productos ricos en grasas, la degradación de ácido sórbico es elevada, y puede también promover la oxidación de estos productos. La oxidación de manteca, manteca derretida y grasa de cerdo fue potenciada con la incorporación de ácido sórbico (Steinbach y Franzke, 1963). Sin embargo, el antimicrobiano no tuvo efecto alguno sobre la oxidación del aceite de soja (Sofos, 1989).

5.3.2 Objetivo

El objetivo de esta sección del capítulo es analizar la influencia de distintos aditivos y del contenido de aceite sobre la cinética de degradación del ácido sórbico en emulsiones que modelan aderezos para ensalada.

5.3.3 Materiales y Métodos

5.3.3.1 Sistemas modelo. Composición, preparación y almacenamiento.

Las formulaciones de los sistemas modelo se dividieron en dos grupos. En una primera etapa, se formularon emulsiones de complejidad creciente, adicionando sólo un aditivo en cada caso, para los niveles de aceite de 110,00 y 230,00 g.kg⁻¹. Se procedió de esta manera, emulando la metodología utilizada en el capítulo tres para la evaluación de la degradación del ácido sórbico en sistemas modelo acuosos. La composición de estas emulsiones se presenta en la Tabla 5.3.1. En una segunda etapa, se ensayaron distintos sistemas con cierto énfasis en algunos aditivos que se adicionaron a las emulsiones y que no se habían probado previamente como parte de los sistemas acuosos (goma xántica, Tween[®]20 y nisina). En la Tabla 5.3.2 se detalla la composición de cada uno de estos sistemas.

Los distintos sistemas modelo se prepararon siguiendo la metodología descrita en la sección 5.1.3.1.2. A todos los sistemas estudiados se agregó 25,000 g.kg⁻¹ de vinagre. El pH de los sistemas se ajustó a 3,5 por adición de una solución concentrada de ácido cítrico (500 g.L⁻¹).

Una vez constituidos los sistemas, se almacenaron por duplicado tal como se consigna en la sección 3.1.3.2, por un período de tres meses. El muestreo de los mismos se realizó cada quince días.

5.3.3.2 Determinación de ácido sórbico

La degradación del antimicrobiano en los distintos sistemas analizados se monitoreó mediante la técnica de oxidación del ácido sórbico de la A.O.A.C. (1990), tal y como se describe en la sección 3.1.3.3.

5.3.3.3 Cinética de degradación oxidativa del ácido sórbico

Como se presentó en la sección 3.1.1.1, la degradación de los sorbatos puede ser aproximada a una cinética de primer orden (Arya, 1980; Vidyasagar y Arya, 1983; Gerschenson y Campos, 1995):

$$- dc/dt = k.c \quad (5.3.1)$$

Donde, **c**: concentración de ácido sórbico (g.L⁻¹)

t: tiempo (día)

k: constante de velocidad de orden 1 (día⁻¹)

Al integrar esta expresión, resulta:

$$\ln c/c_0 = - k.t \quad (5.3.2)$$

Donde, **c₀**: concentración inicial de ácido sórbico

c / c₀: retención de ácido sórbico al tiempo **t**

La degradación del antimicrobiano en emulsiones se puede informar entonces en base a la constante de velocidad de la reacción.

5.3.3.4 Análisis estadístico de los resultados

El cálculo de las constantes cinéticas se realizó por regresión lineal de los datos. En todos los casos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el objeto de evaluar la significatividad de las regresiones. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las distintas constantes de velocidad se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) para la igualdad de pendientes, con un nivel de significación, $\alpha:0,05$.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 4,0 (Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, Estados Unidos).

Tabla 5.3.1 Composición de las emulsiones formuladas. Las cantidades se hallan expresadas en g.kg⁻¹.

Componentes Sistema	KS	EDTA	AA	NaCl	Sacarosa	Aceite	Aw
5.48	1,000	-	-	-	-	110,00	0,998
5.49	1,000	0,075	-	-	-	110,00	0,998
5.50	1,000	0,075	0,500	-	-	110,00	0,998
5.51	1,000	0,075	0,500	20,000	-	110,00	0,985
5.52	1,000	0,075	0,500	20,000	20,000	110,00	0,985
5.53	1,000	-	-	-	-	230,00	0,998
5.54	1,000	0,075	-	-	-	230,00	0,998
5.55	1,000	0,075	0,500	-	-	230,00	0,998
5.56	1,000	0,075	0,500	20,000	-	230,00	0,985
5.57	1,000	0,075	0,500	20,000	20,000	230,00	0,985

En todos los sistemas, se agregó agua destilada en c.s.p. constituir 1000 g de emulsión.

KS: sorbato de potasio

AA: ácido ascórbico

Tabla 5.3.2 Composición de las emulsiones formuladas. Las cantidades se hallan expresadas en g.kg⁻¹.

Componentes Sistema	Goma xántica	Tween®20	Nisina	Aceite
5.58	-	-	-	-
5.59	5,00	-	-	-
5.60	5,00	20,00	-	-
5.61	5,00	20,00	0,500	-
5.62	5,00	-	-	110,00
5.63	5,00	20,00	-	110,00
5.64	5,00	20,00	0,500	110,00
5.65	5,00	-	-	230,00
5.66	5,00	20,00	-	230,00
5.67	5,00	20,00	0,500	230,00
5.68	5,00	-	-	460,00
5.69	5,00	20,00	-	460,00
5.70	5,00	20,00	0,500	460,00

Todos los sistemas contenían: KS: 1,000 g.kg⁻¹; EDTA: 0,075 g.kg⁻¹; NaCl en c.s.p. ajustar a_w a 0,985 y agua en c.s.p. 1000 g de sistema.

5.3.4 Resultados y Discusión

Los valores de *k*, la constante cinética de la degradación del sorbato, se informan en la Tabla 5.3.3. Cabe destacar que las comparaciones estadísticas de las constantes halladas se realizaron por separado, analizando por un lado las emulsiones correspondientes a la Tabla 5.3.1 (sistemas 5.48-5.57); por otro lado, se agruparon los sistemas 5.58-5.61, que no eran emulsiones, sino sistemas acuosos con diversos aditivos y, por último, los sistemas 5.62-5.70, que conformaron emulsiones con tres niveles de aceite (Tabla 5.3.2).

En cuanto al primer grupo de sistemas considerados (5.48-5.57), donde se adicionaron sucesivamente distintos ingredientes, puede observarse que el efecto protector del EDTA y del ácido ascórbico, mencionado previamente para los sistemas acuosos (sección 3.1.4.1), no fue significativo en el caso de las emulsiones. Estos resultados sugieren que las tendencias observadas para los sistemas acuosos no siempre pueden ser extrapoladas a sistemas más complejos. Ahora bien, en el caso de los sistemas que contenían NaCl (sistema 5.51) y NaCl y sacarosa (sistema 5.52), para el nivel de aceite de 110,00 g.kg⁻¹, se observó que la adición de

estos ingredientes no produjo una disminución significativa de la degradación del KS con respecto al sistema 5.50. Esta tendencia también fue observada para los sistemas acuosos en el capítulo 3. En cambio, este comportamiento no se repite para el NaCl o para la presencia conjunta de NaCl y sacarosa en las emulsiones que contenían 230,00 g.kg⁻¹ de aceite (sistemas 5.56 y 5.57, respectivamente), ya que los valores de las constantes de destrucción obtenidos para dichos sistemas, en relación al sistema 5.55, son significativamente mayores.

El incremento del nivel de aceite produjo una reducción significativa de la degradación del antimicrobiano en: i) los sistemas base (sistema 5.48 vs. 5.53), ii) los sistemas con EDTA (sistema 5.49 vs. sistema 5.54) y iii) los sistemas con EDTA y ácido ascórbico (sistema 5.50 vs. sistema 5.55). Wedzicha y col. (1991) observaron cambios en la reactividad química del ácido benzoico por agregado de una fase oleosa. En el capítulo anterior se evaluó que, atendiendo a su carácter lipofílico, el ácido sórbico tiende a particionarse entre las dos fases de una emulsión. Por lo tanto, es de esperar que la cantidad de antimicrobiano en la fase acuosa de la misma sea menor que aquella para los sistemas acuosos, a expensas de la fase oleosa. La disminución en la constante cinética de destrucción del antimicrobiano observada en presencia de la mayor cantidad de aceite podría deberse a que:

a) La destrucción del antimicrobiano en la fase oleosa procediera a una menor velocidad que en la fase acuosa. Ello se debería a la menor disponibilidad de oxígeno en la fase oleosa (Brocklehurst, 1993). Asimismo, es importante remarcar que el antimicrobiano se puede dimerizar en la fase oleosa (Wedzicha y col., 1991) pudiendo ello disminuir la tendencia a la autooxidación del ácido sórbico.

b) La composición de la fase acuosa sufre modificaciones por la incorporación de la fase oleosa, ya que la mayor parte de los componentes de la formulación son sólo solubles en agua, lo que conduce a una concentración de ellos en la misma. Este fenómeno no sólo modifica el coeficiente de partición sino que puede afectar la velocidad de destrucción del antimicrobiano en la fase acuosa.

En el caso de los sistemas 5.58 al 5.61, formulados para evaluar si la presencia de goma xántica, Tween[®] 20 y nisina en sistemas acuosos produce algún efecto sobre la degradación del sorbato, se observa que únicamente el agregado de nisina, en presencia de Tween[®] 20 y goma xántica (sistema 5.61) produce un aumento significativo de la constante de degradación. Este efecto se hace notorio también en los sistemas emulsionados donde se observa que la introducción de nisina produjo degradaciones significativamente mayores en todos los niveles de aceite ensayados, respecto de las formulaciones que no la contenían (Tabla 5.3.3: sistema 5.64 vs. 5.63; sistema 5.67 vs. 5.66; sistema 5.70 vs. 5.69).

La incorporación de Tween[®] 20 no ejerce efecto alguno sobre la velocidad de degradación del antimicrobiano en las emulsiones ensayadas, independientemente del nivel de

aceite considerado. Nuevamente, esta tendencia se halla en concordancia con lo determinado en los sistemas acuosos correspondientes.

En cuanto a la influencia del nivel de aceite, se observa en general que un incremento desde 110,00 a 230,00 g.kg⁻¹ produjo una significativa disminución de la constante de velocidad de degradación del antimicrobiano (sistema 5.62 vs. 5.65), incluso en presencia de Tween® 20 (sistema 5.64 vs.5.67). La presencia conjunta de Tween® 20 y nisina enmascaró el efecto protector del aumento del nivel de aceite de 110,00 a 230,00 g.kg⁻¹ (sistema 5.64 vs. 5.67). El incremento de aceite de 230,00 a 460,00 g.kg⁻¹ no mostró un efecto significativo sobre las constantes cinéticas ya que los valores hallados no fueron significativamente diferentes (sistemas 5.66 vs. 5.69; 5.67 vs. 5.70).

Tabla 5.3.3 Constantes de velocidad de degradación de sorbato de potasio en sistemas modelo.

Sistema	Composición		(k ± d).10 ³ (día ⁻¹)
	Fase acuosa	Fase oleosa (g.kg ⁻¹)	
5.48	KS	110,00	10,56 ± 0,6 ^A
5.49	KS/EDTA	110,00	10,34 ± 1,7 ^{A,B}
5.50	KS/EDTA/AA	110,00	8,73 ± 1,3 ^{A,B,C}
5.51	KS/EDTA/AA/NaCl	110,00	6,63 ± 0,8 ^{C,D}
5.52	KS/EDTA/AA/NaCl/Sac	110,00	5,21 ± 1,1 ^{D,E,F}
5.53	KS	230,00	3,13 ± 0,5 ^{E,F,G}
5.54	KS/EDTA	230,00	1,88 ± 0,8 ^{F,G}
5.55	KS/EDTA/AA	230,00	0,77 ± 0,6 ^G
5.56	KS/EDTA/AA/NaCl	230,00	7,17 ± 1,2 ^{B,C,D}
5.57	KS/EDTA/AA/NaCl/Sac	230,00	6,4 ± 1,4 ^{C,D,E}
5.58	KS/EDTA/NaCl	-	4,11 ± 0,2 ^a
5.59	KS/EDTA/NaCl/GX	-	3,57 ± 0,3 ^a
5.60	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw	-	4,05 ± 0,2 ^a
5.61	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw/Nis	-	5,62 ± 0,2 ^b
5.62	KS/EDTA/NaCl/GX	110,00	4,96 ± 0,2 ^b
5.63	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw	110,00	5,03 ± 0,2 ^{b,c}
5.64	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw/Nis	110,00	6,99 ± 0,4 ^f
5.65	KS/EDTA/NaCl/GX	230,00	3,42 ± 0,3 ^a
5.66	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw	230,00	2,98 ± 0,3 ^a
5.67	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw/Nis	230,00	6,29 ± 0,3 ^{d,f}
5.68	KS/EDTA/NaCl/GX	460,00	3,47 ± 0,1 ^a
5.69	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw	460,00	3,04 ± 0,2 ^a
5.70	KS/EDTA/NaCl/GX/Tw/Nis	460,00	5,77 ± 0,3 ^{c,d}

k: constante cinética. **d**: desviación estándar

El análisis de COVARIANZA se realizó por separado para cada uno de los siguientes grupos de sistemas: a) 5.48-5.57; b) 5.58-5.61; c) 5.62-5.70.

La misma letra en el superíndice indica que no existen diferencias significativas entre las constantes ($p > 0,05$). Cada grupo de sistemas se indicó con distintos tipos de letras: a) letras mayúsculas, b) letras minúsculas del alfabeto griego y c) letras minúsculas.

KS: sorbato de potasio; AA: ácido ascórbico; Sac: sacarosa; GX: goma xántica; Tw: Tween® 20; Nis: nisina.

5.3.5 Conclusiones

El efecto protector que tanto el EDTA como el ácido ascórbico ejercieron en los sistemas acuosos (sección 3.1.4.1) no se evidenció significativamente en las emulsiones.

Para los sistemas que contenían 110,00 g.kg⁻¹ de aceite, la adición de NaCl ó NaCl y sacarosa presentó la misma tendencia que en los sistemas acuosos, es decir, hubo una reducción de la constante de degradación del antimicrobiano. Este hecho no se correspondió

con lo observado para aquellos sistemas que contenían 230,00 g.kg⁻¹ de aceite, donde la presencia de estos aditivos contribuyó a pérdidas de ácido sórbico en las emulsiones significativamente mayores a las observadas para los sistemas que no los contenían.

La presencia de goma xántica y Tween® 20, no ejerció ningún efecto sobre la degradación del sorbato para los sistemas acuosos. Para las emulsiones, a los tres niveles de aceite ensayados, el surfactante ejerció un efecto análogo.

La nisina se destacó por promover la oxidación del antimicrobiano en todos los sistemas considerados, tanto acuosos como emulsionados.

Los resultados presentados muestran que la composición del sistema alimenticio es un factor preponderante sobre la destrucción del sorbato de potasio. Los distintos ingredientes analizados representan aditivos comúnmente presentes en aderezos para ensalada, y dan cuenta de la complejidad de los resultados en relación con la composición de los productos alimenticios.

5.4 CONCLUSIONES GENERALES

La estabilidad de las emulsiones es fuertemente dependiente de la presencia de goma xántica.

La presencia de Tween®20 ejerce una gran influencia en el tamaño de gota, afectando así la estabilidad de la emulsión.

La composición del sistema afecta el reparto del ácido sórbico así como su estabilidad en las emulsiones.

CAPÍTULO 6

ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA de EMULSIONES que MODELAN ADEREZOS

ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE EMULSIONES

Introducción

Los aderezos han crecido en popularidad en los últimos años. Muchos consumidores han optado por las ensaladas como una opción saludable, razón por la cual también los aderezos de estas ensaladas deben ser saludables (Gledhill, 1998). Esto implica que la industria alimenticia enfrenta un desafío para la producción de una gran variedad de aderezos, incluyendo aquellos reducidos en grasas, a fin de satisfacer las demandas de los consumidores (Wendin y col., 2001). A nivel microbiológico, esta reducción en la fase oleosa de la emulsión causa principalmente un incremento de la fase acuosa lo que a su vez podría resultar en una disminución de las concentraciones de sales y de ácidos orgánicos en dicha fase, lo que convierte a la fase acuosa de la emulsión en un factor de preocupación desde el punto de vista microbiológico (Smittle y col., 1992).

En el capítulo cinco de esta presentación se abordan aspectos relacionados con las propiedades de la emulsión (estabilidad visual, tamaño de gota, etc.) y con la estabilidad de los sorbatos. En este capítulo se hace referencia a los aspectos que involucran a la flora microbiana responsable del deterioro de estos productos y se los relaciona con las propiedades químicas y físicas de la emulsión.

En lo que se refiere a la actividad microbiana, según lo mencionado en capítulos previos, la microflora que causa el deterioro de aderezos consiste de unas pocas especies de *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Smittle, 2000). Las levaduras que crecen en estos productos son resistentes y capaces de desarrollarse en un medio hostil que contiene aproximadamente 3% de ácido acético. Una de las especies más problemáticas incluye a *Zygosaccharomyces bailii* (Thomas y Davenport, 1985), cuya tolerancia a los preservadores es ampliamente reconocida (Praphailong y Fleet, 1997). El deterioro causado por las levaduras se reconoce generalmente por la formación de gas o por el crecimiento de colonias de color marrón claro sobre la superficie del producto; éstas pueden aparecer también como pequeñas gotas aceitosas y el aspecto depende de la disponibilidad de oxígeno (Pourkomialian, 2000). *L. fructivorans* es la bacteria predominante encontrada en aderezos contaminados (Smittle y Flowers, 1982). Tal lo presentado en la sección 4.1.4.2, el ácido sórbico no fue capaz de preservar sistemas acuosos, que emulaban las fases acuosas de aderezos, a los cuales les fuera inoculada esta bacteria láctica.

Las propiedades de la emulsión dependen generalmente de las propiedades de la fase continua y/o de la relación fase continua/fase dispersa (Lynch y Griffin, 1974). La fase continua, es decir, la fase acuosa de un aderezo contiene usualmente vinagre, sales, azúcares, agentes

antimicrobianos, espesantes y emulsificantes. A su vez, la fase dispersa, en este caso representada por el aceite comestible empleado para formular la emulsión, puede variar en cuanto a su concentración a efectos del tipo de aderezo que se pretende obtener y a que sea éste vertible o no. La concentración de aceite presente en la emulsión condiciona su estructura.

Los efectos de la estructura del alimento incluyen limitantes sobre la distribución del agua (Hills y col., 1996, 1997), la distribución de los ácidos orgánicos, que incluye a los antimicrobianos alimenticios (Brocklehurst y col., 1993; Brocklehurst y Wilson, 2000) y la movilidad de los microorganismos (Mattila y Frost, 1988 a,b; Dodd, 1990; Dodd y Waites, 1991; Robins y col., 1994; Robins y Wilson, 1994; Wimpeny y col., 1995). Wilson (2000) informó que la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos en el alimento se ven afectados no sólo por la composición química o las condiciones de almacenamiento del alimento, sino también por su estructura. El sitio de crecimiento microbiano en el alimento es la fase acuosa y las características estructurales de esta fase resultan relevantes en la medida en que afectan el crecimiento microbiano. La "micro-arquitectura" del alimento puede ser uniforme en toda la matriz alimenticia o contar con regiones particulares de estructura específica (Wilson y col., 2002). En el caso de las emulsiones aceite-en-agua, como los aderezos para ensalada, la fase oleosa se encuentra en forma de gotas (con diámetros que oscilan entre 2 y 10 μm) dispersas en la fase acuosa. Estudios realizados sobre sistemas modelo por Brocklehurst y col. (1995), han establecido que la forma de crecimiento de los microorganismos (colonias, películas o células fitoplanctónicas) en emulsiones en las cuales las gotas de aceite están muy empaquetadas, depende del tamaño medio de las gotas de la emulsión.

Los emulsificantes se adicionan a la fase acuosa de la emulsión a fin de estabilizarla, previniendo la coalescencia de las gotas de la fase dispersa. Los emulsificantes del tipo surfactantes no-iónicos, como el Tween, son los más utilizados en la industria de aderezos. En la mayoría de los alimentos emulsionados, los surfactantes se hallan por encima de su concentración micelar crítica (CMC) formando agregados conocidos como micelas. Las micelas son entidades dinámicas que se encuentran en constante movimiento. Las regiones interiores no-polares de las micelas presentan un ambiente muy similar a aquél brindado por un solvente orgánico, donde solutos como el ácido sórbico tenderán a particionarse (Wedzicha y col., 1990), por lo tanto se debe considerar su distribución en el interior de las micelas, además de hacerlo en las fases acuosa y oleosa, componentes de la emulsión.

Como se ha mencionado en capítulos previos, el sorbato de potasio es un antimicrobiano comúnmente utilizado en este tipo de alimentos. Ahora bien, la elevada reactividad del ácido sórbico y las interacciones que éste experimenta con los distintos aditivos y componentes presentes en el alimento, conlleva a situaciones donde la actividad antimicrobiana

del mismo puede resultar comprometida, atentando contra la calidad y seguridad del alimento (Sofos, 1989; Binstok y col., 1998; Ferrand y col., 2000; Gliemmo y col., 2001, 2004).

Los consumidores demandan alimentos más "naturales" y, por ende, con menor cantidad de preservadores químicos. Como resultado de estos hechos, se ha despertado un gran interés en los agentes antimicrobianos producidos naturalmente (Cleveland y col., 2001). La nisina, un polipéptido antimicrobiano producido por una bacteria láctica, está reconocido como GRAS y su empleo en alimentos está aprobado en varios países (Delves-Broughton, 1990).

Las bacteriocinas tienen aplicación en varios sistemas alimenticios. En general, el empleo de bacteriocinas se realiza en procesos de preservación que involucran un sistema de barreras múltiples (Cleveland y col., 2001). La actividad de las bacteriocinas se halla influenciada fuertemente por factores tales como el pH, la concentración microbiana, el contenido lipídico, las enzimas proteolíticas que pudieran existir en el alimento y la relación sólido vs. líquido de la matriz alimenticia (Ray y Daeschel, 1992).

Debido al limitado espectro de actividad que tienen las bacteriocinas y a que resultan efectivas sólo a elevadas concentraciones, se ha propuesto su uso conjunto con otros antimicrobianos (Sofos, 1998). De acuerdo a Jarvis y col. (1976), el ácido sórbico en combinación con nisina retardó el deterioro de salchichas frescas británicas almacenadas a 5°C. El empleo combinado de sorbato de potasio con nisina disminuyó los recuentos bacterianos en comida vegetariana (Fang y col., 1997) y tuvo un efecto listericida en caldo tamponado BHI (pH 5,5) durante la incubación a 4°C (Buncic y col., 1995). Estas combinaciones tuvieron mejor efecto preservador que el observado para cada agente antimicrobiano aplicado separadamente. Sin embargo, también se deben considerar los efectos de posibles interacciones antagónicas entre los diferentes preservadores utilizados (Bouttefroy y col., 2000).

Por otro lado, se ha reportado que la actividad de nisina se vió reducida en alimentos ricos en grasa (Jung y col., 1992; Zapico et al., 1999; Bhatti y col., 2004). Además, la efectividad de este antimicrobiano natural se halla comprometida por el rol que juegan los surfactantes en las matrices alimenticias que contienen nisina. Jung y col. (1992) y Bhatti y col. (2004) encontraron que el surfactante no-iónico, Tween® 80, contrarrestó parcialmente la disminución de la actividad de nisina promovida por la presencia de lípidos en la leche. Sin embargo, Henning y col. (1986 a) informaron un efecto antagonista de los emulsificantes sobre la eficacia antimicrobiana de nisina en alimentos grasos modelo. Por lo tanto, la bibliografía muestra tendencias diversas y ellas necesitan esclarecerse en función de cada sistema alimenticio considerado.

De lo expuesto anteriormente, se infiere que la acción antimicrobiana del sorbato de potasio y de la nisina en emulsiones podría verse afectada por el contenido de aceite presente y por el agregado de surfactantes, motivo por el cual resulta de interés su estudio en este tipo de

sistemas. Asimismo, debe contemplarse la estructura del alimento como un factor adicional que condicionaría la efectividad de estos agentes antimicrobianos, que si bien mostraron sinergizarse en sistemas acuosos (capítulo cuatro, sección 4.2) podrían comportarse de manera diferente en emulsiones.

6.1 ACTIVIDAD de los SORBATOS sobre *Zygosaccharomyces bailii* en EMULSIONES que MODELAN ADEREZOS

6.1.1 Objetivos

- Evaluar el efecto de la presencia de sorbato de potasio sobre el desarrollo de *Z.bailii*.
- Evaluar el efecto que diferentes niveles de aceite y de Tween® 20 ejercen sobre el crecimiento de *Z.bailii*.
- Evaluar el efecto del nivel de aceite y de Tween® 20 sobre la acción antimicrobiana del sorbato de potasio frente al desarrollo de *Z.bailii*.

6.1.2 Materiales y Métodos

6.1.2.1 Sistemas modelo: composición y preparación

La composición de los sistemas modelo emulsionados consistió en: 25,000 g.kg⁻¹ de vinagre, 0,075 g.kg⁻¹ EDTA y 5,00 g.kg⁻¹ goma xántica por kg de sistema. Asimismo, se agregó la cantidad necesaria de cloruro de sodio para deprimir la actividad de agua del sistema hasta 0,985 y diferentes concentraciones de sorbato de potasio, aceite de maíz y Tween® 20 tal como se describe en la Tabla 6.1.1. Es de destacar que no se incluyó nisina en la formulación, ya que experiencias previas mostraron que la nisina no afecta el crecimiento de *Z.bailii* (ver sección 4.2.4, página 94). Todos los ingredientes citados, a excepción del aceite, se suspendieron en

caldo de cultivo Sabouraud, se colocaron en recipientes adecuados y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El pH se ajustó a 3,5 agregando gotas de una solución concentrada de ácido cítrico (500 g.L^{-1}), antes de la esterilización, verificándose, luego de la misma, que el pH se mantuviera en el valor citado. Las fases acuosas de los sistemas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se confeccionaron las emulsiones, bajo flujo laminar, agregando la correspondiente cantidad de aceite y homogeneizando con un mezclador doméstico durante 3 minutos a 550 r.p.m.

6.1.2.2 Inoculación y almacenamiento de los sistemas

La preparación del inóculo se detalla en la sección 4.1.3.2.1.

Una vez confeccionada cada emulsión, se procedió a la inoculación del microorganismo con un elevado número de células viables a fin de obtener un recuento inicial de $10^5 - 10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$. Esta cantidad permite asegurar la capacidad de supervivencia y crecimiento de la levadura en los sistemas (López-Malo y Palou, 2000). Luego, 15 g de emulsión se colocaron en frascos de vidrio color caramelo de 40 ml de capacidad; por cada formulación se prepararon dos frascos para cada tiempo de muestreo, considerado a lo largo del almacenamiento. Todos los sistemas fueron incubados en una cámara de temperatura constante y convección forzada a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$, por 96 h. A determinados períodos de almacenamiento se extrajeron muestras y se determinó la cantidad de células viables por recuento en superficie, sobre agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). Se efectuaron diluciones de las muestras en agua de peptona al 0,1%. Para cada dilución se utilizaron tres placas, las cuales fueron incubadas a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 48 h antes del recuento.

6.1.2.3 Determinación de las constantes de velocidad de muerte. Análisis estadístico de los datos

La extinción de la población microbiana en los distintos sistemas se monitoreó determinando el número de microorganismos viables a intervalos de tiempo específicos. El análisis de regresión de los datos mostró la existencia de relaciones lineales entre $\log(N/N_0)$ y t , donde N_0 es el número inicial de microorganismos y N es el número de microorganismos al tiempo t , indicando que el proceso letal siguió un patrón correspondiente a una cinética de primer orden (Xiong y col., 1999). En la cinética de primer orden, k representa la constante de

velocidad de muerte. Las k correspondientes a cada sistema fueron calculadas a partir de las ecuaciones para los mejores ajustes lineales y las diferencias significativas entre ellas se analizaron mediante el Análisis de Covarianza (ANCOVA) usando StatGraphics Plus (versión 4,0).

Tabla 6.1.1 Concentraciones variables de sorbato de potasio, aceite y Tween® 20, expresadas en g.kg⁻¹, presentes en las distintas emulsiones modelo.

Sistema	KS	Aceite	Tween® 20
6.1	0	110,00	0
6.2	0,500	110,00	0
6.3	0	460,00	0
6.4	0,500	460,00	0
6.5	0	110,00	40,00
6.6	0,500	110,00	40,00
6.7	0	460,00	40,00
6.8	0,500	460,00	40,00
6.9	0	230,00	0
6.10	0,250	230,00	0
6.11	0,500	230,00	0
6.12	0	230,00	20,00
6.13	0,250	230,00	20,00
6.14	0,500	230,00	20,00
6.15	0	230,00	40,00
6.16	0,250	230,00	40,00
6.17	0,500	230,00	40,00

6.1.2.4 Determinación del coeficiente de reparto y de la distribución de la forma no disociada del ácido sórbico

La metodología aplicada para la determinación del coeficiente de partición aparente del ácido sórbico se detalla en la sección 5.2.3.2. En las emulsiones que contenían Tween® 20, la concentración total de ácido sórbico en la fase oleosa y el valor de K_d , reportado en la bibliografía (Wedzicha y col., 1991), así también como el balance de masa del ácido sórbico en la fase oleosa, se utilizaron para calcular la concentración del monómero del ácido en esta fase a partir de la ecuación 5.2.4 (capítulo 5, sección 5.2.1). Se realizaron las correcciones a fin de convertir el coeficiente de partición aparente (P_{ap}) en el coeficiente de partición verdadero (P), usando la constante de disociación del ácido y la concentración de protones, de acuerdo con la ecuación 5.2.3 (capítulo 5, sección 5.2.1). El P se usó para obtener la concentración

correspondiente de ácido libre en la fase acuosa de acuerdo con la ecuación 5.2.2 (sección 5.2.1, capítulo 5) ya que el mismo se refiere al equilibrio entre el ácido sórbico libre en la fase acuosa y el ácido sórbico libre en la fase oleosa. Entonces, la concentración de ácido sórbico no disociado unido a las micelas se obtuvo por diferencia entre la concentración total de ácido sórbico no disociado al pH de interés y la concentración de ácido sórbico no disociado libre en la fase acuosa (Wedzicha y Couet, 1996).

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se corresponde con el descrito en la sección 5.2.3.3.

6.1.3 Resultados y Discusión

6.1.3.1 Actividad del sorbato de potasio

La presencia de sorbato de potasio (KS) en los sistemas modelo fue efectiva contra el crecimiento de *Z.bailii*. La Figura 6.1.1 (A) muestra cómo se desarrolló el cultivo de la levadura en el aderezo modelado. La fase estacionaria se alcanzó aproximadamente después de las 48-60 h en el sistema modelo que contenía 110,00 g.kg⁻¹ de aceite (sistema 6.1). Este crecimiento se inhibió en presencia de 0,500 g.kg⁻¹ de KS, conduciendo a la inactivación de la levadura (Tabla 6.1.2, sistema 6.2). La misma tendencia se observó en presencia de Tween® 20 (Tabla 6.1.2, sistema 6.6). Los resultados obtenidos muestran la importancia de la incorporación de KS para preservar la estabilidad de aderezos de bajo contenido lipídico.

La Figura 6.1.1 (B) muestra el crecimiento y la supervivencia de *Z.bailii* en emulsiones que contenían 230,00 g.kg⁻¹ de aceite y 0,250 ó 0,500 g.kg⁻¹ de sorbato. A concentraciones intermedias de KS (0,250 g.kg⁻¹), el antimicrobiano ejerció su efecto produciendo la inactivación de la levadura, pero a menor velocidad (Tabla 6.1.2, sistemas 6.10 y 6.11). El mismo comportamiento se observó en sistemas de composición similar que contenían además Tween® 20 (Tabla 6.1.2, sistemas 6.13 y 6.14).

Cuando el contenido de aceite se elevó a 460,00 g.kg⁻¹, no se registraron efectos diferenciales en presencia o ausencia del sorbato (Tabla 6.1.2, sistema 6.3 vs. 6.4). Probablemente, el efecto inhibitorio ejercido por esta concentración de aceite (hecho que será analizado en la próxima sección), enmascaró el efecto del antimicrobiano observado para los otros sistemas. Sin embargo, en presencia de 40,00 g.kg⁻¹ de Tween® 20, se observó el efecto

inhibitorio del preservador presente en una concentración de $0,500 \text{ g.kg}^{-1}$ (Tabla 6.1.2, sistemas 6.7 y 6.8).

6.1.3.2 Efecto de la concentración de aceite

Como puede observarse en la figura 6.1.2 (A), el microorganismo estudiado creció en aquellos sistemas que contenían $110,00$ y $230,00 \text{ g.kg}^{-1}$ de aceite en ausencia de KS (sistemas 6.1 y 6.9). Este último nivel de aceite afectó el normal crecimiento de la levadura, mostrando una reducción en la población microbiana que alcanzó la fase estacionaria. Cuando el contenido de aceite se aumentó a $460,00 \text{ g.kg}^{-1}$, pudo observarse la inactivación del microorganismo (Tabla 6.1.2, sistema 6.3). Este comportamiento podría ser atribuido al incremento de volumen de la fase oleosa que parecería tener un efecto generalizado de preservación sobre las emulsiones modelo, en tanto que, una consecuente reducción en la fase acuosa de la emulsión, determinó un incremento de la concentración de aquellos componentes que no se reparten entre las dos fases de la emulsión, tal como el NaCl. El aceite podría ser considerado aquí como un ingrediente "inerte" ya que no permite el crecimiento de los microorganismos.

El agregado de $40,00 \text{ g.kg}^{-1}$ de Tween® 20 a los sistemas (Figura 6.1.2 (B), sistemas 6.5; 6.15 y 6.7) no produjo ningún cambio respecto del patrón de comportamiento citado en el párrafo anterior. Sin embargo, para un contenido de aceite de $460,00 \text{ g.kg}^{-1}$, la velocidad de muerte microbiana fue menor comparada con los sistemas sin el surfactante (Tabla 6.1.2, sistema 6.7 vs. 6.3).

En presencia de $0,500 \text{ g.kg}^{-1}$ de KS, un aumento en el nivel de aceite no produjo ningún cambio significativo en la velocidad de muerte (Figura 6.1.3, (C)). Es probable que el efecto inhibitorio del preservador enmascarara el efecto del aceite. La adición de $40,00 \text{ g.kg}^{-1}$ de Tween® 20 no cambió esta tendencia cuando el nivel de aceite fue de $110,00$ o $230,00 \text{ g.kg}^{-1}$, pero disminuyó la velocidad de muerte. Un incremento de la fase oleosa a $460,00 \text{ g.kg}^{-1}$ produjo una velocidad de muerte mayor que las observadas en ausencia de Tween® 20 o a concentraciones de aceite más bajas (Figura 6.1.3, (D)).

Tabla 6.1.2 Constantes de velocidad de muerte de *Z.bailii* para los distintos sistemas ensayados.

Sistema	$k \cdot 10^2$ [h ⁻¹]
6.2	7,93 ^{a,b}
6.3	6,10 ^b
6.4	6,00 ^b
6.6	2,91 ^d
6.7	4,90 ^c
6.8	7,31 ^{a,b}
6.10	2,80 ^d
6.11	5,08 ^{b,c}
6.13	2,90 ^d
6.14	4,37 ^{c,e}
6.16	3,86 ^e
6.17	2,27 ^d

k : constante de velocidad de muerte.

Los sistemas 6.1, 6.5, 6.9, 6.12 y 6.15 presentaron crecimiento de la levadura durante el almacenamiento. La misma letra denota que no existen diferencias significativas entre las constantes de velocidad ($p > 0,05$).

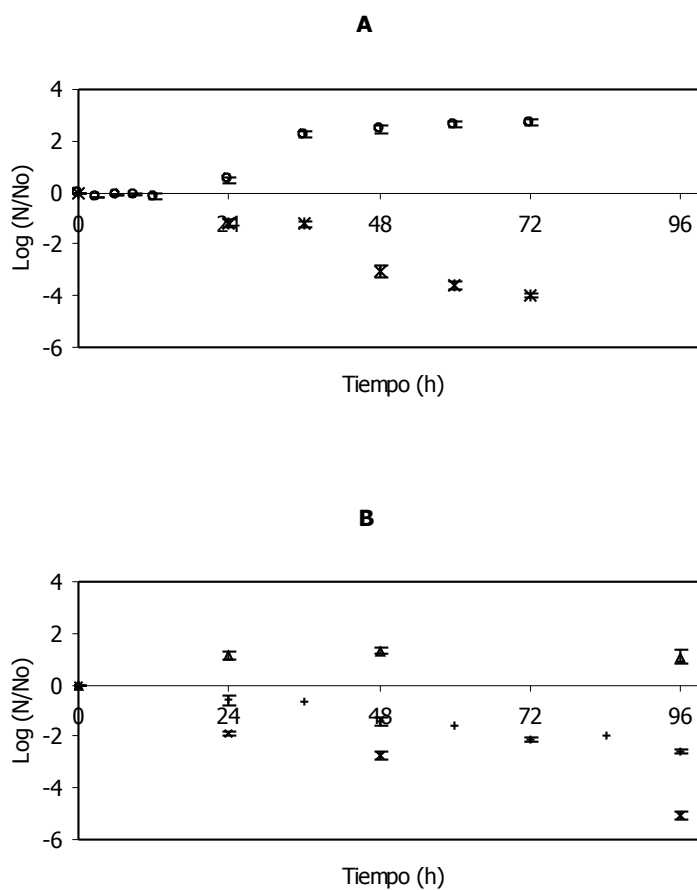


Figura 6.1.1 Efecto del sorbato sobre el crecimiento y muerte de *Z.bailii*.

(A) Emulsiones con 110,00 g.kg⁻¹ aceite. Sistemas: **6.1** (O) [sin KS-sin Tw] y **6.2** (□) [0,500 g.kg⁻¹ KS-sin Tw].

(B) Emulsiones con 230,00 g.kg⁻¹ aceite. Sistemas: **6.9** (△) [sin KS-sin Tw], **6.10** (+) [0,250 g.kg⁻¹ KS-sin Tw] y **6.11** (□) [0,500 g.kg⁻¹ KS-sin Tw].

Tw: Tween[®]20

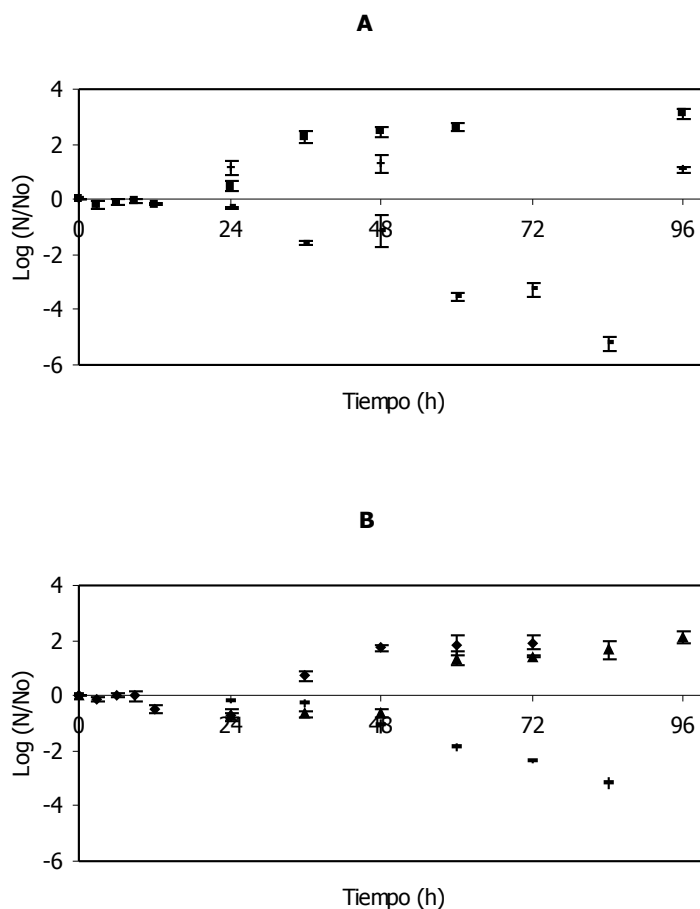


Figura 6.1.2 Efecto del contenido de aceite en el crecimiento, supervivencia y muerte de *Z. bailii* en ausencia (A) ó presencia (B) de Tween[®] 20.

(A) Sistemas: **6.1** (■) [sin KS-110,00 g.kg⁻¹ aceite-sin Tw], **6.9** (+) [sin KS-230,00 g.kg⁻¹ aceite-sin Tw] y **6.3** (-) [sin KS-460,00 g.kg⁻¹ aceite-sin Tw].

(B) Sistemas: **6.5** (●) [sin KS-110,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw],

6.15 (□) [sin KS-230,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw] y **6.7** (-) [sin KS-460,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw].

Tw: Tween[®]20

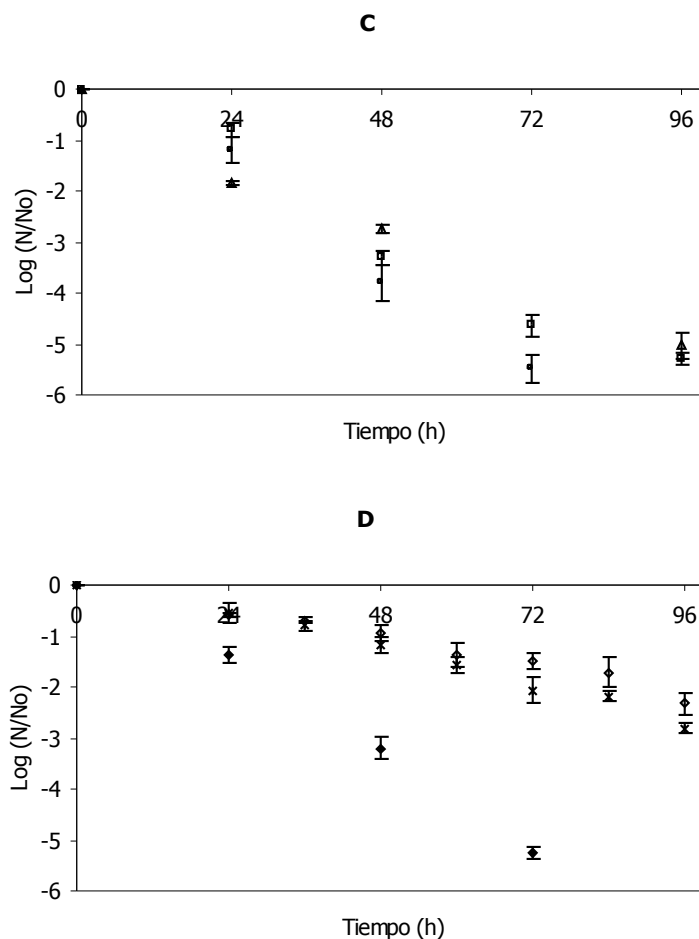


Figura 6.1.3 Efecto del contenido de aceite en el crecimiento, supervivencia y muerte de *Z. bailii* en ausencia (C) ó presencia (D) de Tween[®] 20.

(C) Sistemas: **6.2** (○) [0,500 g.kg⁻¹ KS-110,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw], **6.11** (△) [0,500 g.kg⁻¹ KS-230,00 g.kg⁻¹ aceite-sin Tw] y **6.4** (□) [0,500 g.kg⁻¹ KS-460,00 g.kg⁻¹ aceite-sin Tw].

(D) Sistemas: **6.6** (□) [0,500 g.kg⁻¹ KS-110,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw], **6.17** (□) [0,500 g.kg⁻¹ KS-230,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw] y **6.8** (□) [0,500 g.kg⁻¹ KS-460,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw].

Tw: Tween[®]20

6.1.3.3 Efecto de la concentración de Tween[®] 20

Los surfactantes se utilizan normalmente para estabilizar las gotas de una emulsión contra los fenómenos de agregación de las partículas ya que éstos promueven la estabilidad formando una membrana que recubre las gotas y las mantiene separadas entre sí. En general, los surfactantes están presentes en los alimentos por encima de su concentración micelar crítica (CMC). Esto hace que en la fase acuosa de la emulsión se formen micelas de surfactante. Estas micelas del surfactante pueden interactuar con el antimicrobiano, afectando su actividad (Florence y Atwood, 1988; Kurup y col., 1991 a y b; Wedzicha y col., 1991; Wedzicha y Ahmed, 1994).

En la Figura 6.1.4 (A) y (B), se observa una disminución de la velocidad de muerte de *Z.bailii* cuando la concentración de surfactante se incrementa desde cero hasta 40,00 g.kg⁻¹ en aquellas emulsiones que contenían 0,500 g.kg⁻¹ de sorbato de potasio. En el sector (A) de la mencionada figura, el contenido de aceite de los sistemas es de 230,00 g.kg⁻¹, mientras que en el sector (B) es de 110 g.kg⁻¹. A pesar de que el preservador ejerció su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la levadura, como puede observarse claramente en la tendencia de las curvas, este efecto no fue tan efectivo como lo fuera en ausencia de Tween® 20. El mismo comportamiento se observó en ausencia de KS: la adición del surfactante produjo una disminución de la velocidad de muerte en emulsiones con 460,00 g.kg⁻¹ de aceite (Tabla 6.1.2, sistema 6.3 vs. 6.7). Probablemente, el surfactante pudo haber sido metabolizado por el microorganismo (como fuente de carbono) o actuado como un "transportador de nutrientes", entre la fase acuosa de la emulsión y la membrana celular del microorganismo, promoviendo de esta forma su crecimiento o extendiendo la supervivencia microbiana (Kurup y col., 1991 a y b).

En relación a la disminución de la actividad del preservador en presencia de un surfactante, Bean y col. (1969) encontraron que una adición de 0,4% v/v de polisorbato 80 a mezclas aceite-en-agua que contenían 25% v/v de parafina líquida y 0,1% p/v total de clorocresol redujo la actividad del preservador aproximadamente cien veces. Por otro lado, Kurup y col. (1991 b) observaron que la actividad de metil-para-hidroxibenzoato, fenoxietanol y clorocresol contra *Candida albicans* y *Aspergillus Niger* disminuyó debido a la adición de Span® 80 y Tween® 80 en emulsiones.

La disminución de la actividad antimicrobiana inducida por la presencia de un surfactante podría ser atribuida al fenómeno de partición, que experimentan los ácidos débiles como el ácido sórbico, entre las micelas y el agua. Como se muestra en la Tabla 6.1.3 (sistemas 6.2 y 6.6; 6.11, 6.14 y 6.17; 6.4 y 6.8), el P_{ap} disminuyó cuando la emulsión contenía Tween® 20. Ello conlleva a un aumento relativo de la concentración de sorbato de potasio en la fase acuosa respecto a su concentración en la fase oleosa. Sin embargo, el sorbato de potasio es atrapado por las micelas disminuyéndose así la forma libre en la fase acuosa. Una importante parte del preservador, por lo tanto, se hallaba atrapada por las micelas del surfactante y

entonces no se hallaba disponible para actuar contra los microorganismos. En los sistemas estudiados, la cantidad de KS unido a las micelas fue de aproximadamente 74% del total para la emulsión que contenía 110,00 g.kg⁻¹ de aceite, y 62-72% para las emulsiones que contenían 230,00 g.kg⁻¹ ó 460,00 g.kg⁻¹ de aceite (Tabla 6.1.3). Esta tendencia fue reportada previamente por Wedzicha y col. (1991) para el sistema Tween® 80-aceite de girasol-agua conteniendo KS. En este caso, la cantidad de ácido sórbico asociado a las micelas fue de 36% cuando el nivel de Tween® 80 fue de 20 g.kg⁻¹ y aumentó a 51% para un nivel de Tween® 80 de 40 g.kg⁻¹.

Cabe destacar que la adición de 40,00 g.kg⁻¹ en vez de 20,00 g.kg⁻¹ de surfactante a un sistema con 230,00 g.kg⁻¹ de aceite, produjo un mayor grado de asociación del preservador a las micelas. En presencia de 40,00 g.kg⁻¹ de Tween® 20, la unión preservador-micelas produjo una significativa disminución en la constante de velocidad de muerte, que varió desde 5,08x10² h⁻¹ en ausencia del surfactante hasta un valor de 4,37x10² h⁻¹ ó 2,27x10² h⁻¹ en presencia de 20,00 ó 40,00 g.kg⁻¹ de Tween® 20, respectivamente (Tabla 6.1.2, sistemas 6.11, 6.14 y 6.17), cuando el nivel de antimicrobiano fue de 0,500 g.kg⁻¹.

En presencia de sorbato, cuando el contenido de aceite fue de 460,00 g.kg⁻¹, la adición de 40,00 g.kg⁻¹ de surfactante aumentó la actividad del preservador (Tabla 6.1.2, sistemas 6.4 y 6.8), a pesar que la cantidad libre de preservador en la fase acuosa disminuyó debido a la unión del ácido sórbico a las micelas (Tabla 6.1.3). Es probable que, a este nivel de aceite, la cantidad de preservador unido a las micelas no juegue un papel importante y el efecto del Tween® 20 sobre la actividad del preservador podría atribuirse a otras propiedades fisicoquímicas del surfactante tales como la reducción en las tensiones interfaciales y superficiales entre las fases de la emulsión, lo que incrementaría el acercamiento de los microorganismos a la superficie de las gotas de aceite, donde también se encontraría el KS, acelerando de este modo la muerte celular. El aumento en la actividad antibacteriana de metilpara-hidroxibenzoato, fenoxietanol y clorocresol contra *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de 10 g.kg⁻¹ de Tween® 80 fue atribuido por Kurup y col. (1991 b) a un aumento en la permeabilidad de las membranas bacterianas al pasaje de los preservadores.

En resumen, el efecto producido por la adición de Tween® 20 dependió del contenido de aceite en la emulsión y de la presencia del preservador. Esta tendencia también fue observada por Bean y col. (1969) y Kurup y col. (1991 a) en relación a otros antimicrobianos.

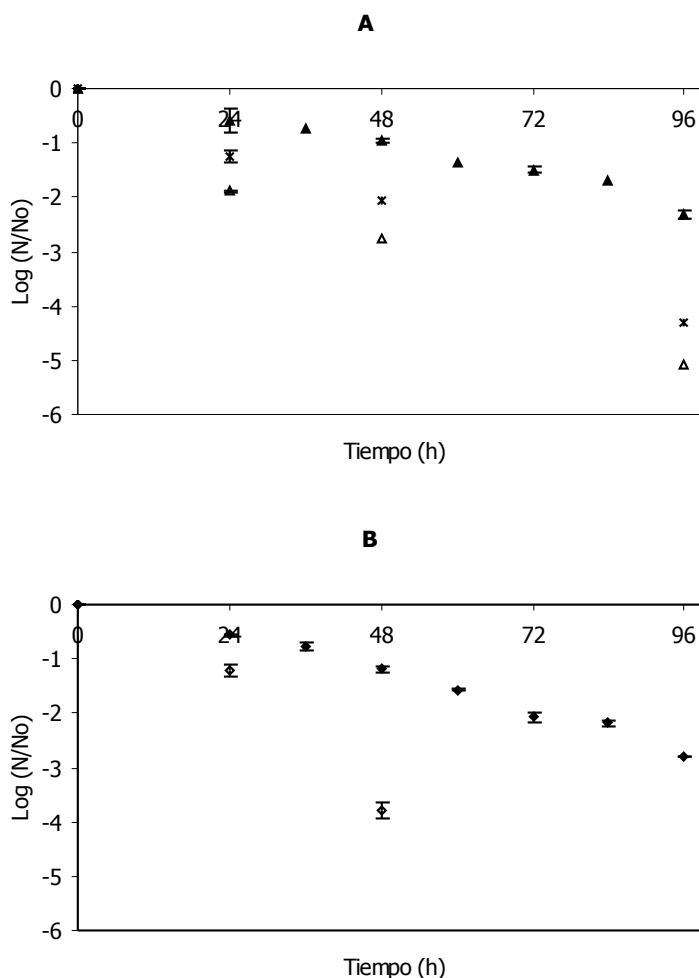


Figura 6.1.4 Efecto del Tween[®] 20 sobre la supervivencia de *Z.bailii* en emulsiones que contenían 0,500 g.kg⁻¹ de sorbato de potasio.

(A) Sistemas: **6.11** (△) [230,00 g.kg⁻¹ aceite-sin Tw], **6.14** (□) [230,00 g.kg⁻¹ aceite-20,00 g.kg⁻¹ Tw] y **6.17** (□) [230,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw].

(B) Sistemas: **6.2** (□) [110,00 g.kg⁻¹ aceite-sin Tw] y **6.6** (□) [110,00 g.kg⁻¹ aceite-40,00 g.kg⁻¹ Tw].

Tw: Tween[®]20

Los resultados mencionados mostraron que la actividad del preservador en la emulsión no es sólo dependiente de la concentración de su forma libre no disociada sino

también de la influencia de surfactantes y distintos niveles de aceite. Los distintos niveles de aceite ensayados y la presencia de surfactantes ejercieron efectos específicos sobre el crecimiento de la levadura *Z.bailii*.

Tabla 6.1.3 Coeficientes de partición aparente (P_{ap}) y distribución de la forma no disociada del ácido sórbico [HA] en los sistemas estudiados.

Sistema	P_{ap}	[HA]. 10^3 (mol.L ⁻¹)	[HA] _{libre} . 10^3 (mol.L ⁻¹)	[HA] _{unido} . 10^3 (mol.L ⁻¹)	% [HA] _{unido}
6.2	2,2 ± 0,0	2,57	2,57	-	-
6.11	2,5 ± 0,2	1,95	1,95	-	-
6.4	2,7 ± 0,2	1,53	1,53	-	-
6.6	0,8 ± 0,1	2,91	0,76	2,15	74
6.14	1,2 ± 0,2	2,64	1,01	1,63	62
6.17	0,8 ± 0,2	2,90	0,80	2,10	72
6.8	1,2 ± 0,2	2,52	0,95	1,56	62

6.1.4 Conclusiones

El sorbato de potasio ejerció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Z.bailii* en emulsiones aceite en agua que emulan aderezos.

La presencia de altas concentraciones de aceite (460,00 g.kg⁻¹) confirieron al producto una condición relativamente estable desde el punto de vista microbiológico en lo que hace a la levadura estudiada, incluso cuando no se agregó antimicrobiano a los sistemas. El agregado de 0,500 g.kg⁻¹ de KS a estas emulsiones no modificó esta tendencia. Sin embargo, la incorporación de Tween® 20 aumentó la velocidad de muerte del microorganismo en estos sistemas.

Una importante interacción es la que se estableció entre el surfactante y el preservador. Esta interacción se originó por la reducción de la concentración de preservador libre en la fase acuosa. El Tween® 20 también ejerció efectos específicos que afectaron el crecimiento microbiano. Por ejemplo, redujo la actividad antimicrobiana del KS en los niveles inferiores e intermedios de aceite (110,00 y 230,00 g.kg⁻¹, respectivamente), extendiendo el tiempo necesario para inhibir el crecimiento de la levadura. Por el contrario, cuando el contenido de aceite fue de 460,00 g.kg⁻¹, se evidenció un aumento de la actividad del preservador aunque la cantidad de preservador libre disminuyó debido a su asociación con las micelas de surfactante.

6.2 ACTIVIDAD de los SORBATOS y de la NISINA sobre *Lactobacillus fructivorans* en EMULSIONES que MODELAN ADEREZOS

6.2.1 Objetivos

En esta sección del capítulo se presenta la experiencia realizada a fin de evaluar la actividad antimicrobiana de sorbato de potasio y de nisina sobre *L.fructivorans* como parte de un sistema complejo que modela aderezos para ensaladas. Los objetivos planteados fueron:

- Evaluar el efecto de la presencia de sorbato de potasio y/o de nisina sobre el desarrollo de *L. fructivorans* en emulsiones.
- Evaluar el efecto que diferentes niveles de aceite y de Tween® 20 ejercen sobre el desarrollo de *L. fructivorans* en presencia de los precitados antimicrobianos.

6.2.2 Materiales y Métodos

6.2.2.1 Preparación del inóculo

Se procedió según lo descrito en la sección 4.1.3.2.2.

6.2.2.2 Sistemas modelo. Composición y preparación.

Los sistemas modelo emulsionados se prepararon siguiendo la metodología descrita en la sección 5.1.3.1.2. Las formulaciones de las emulsiones ensayadas se constituyeron de esta

manera: 25,000 g.kg⁻¹ vinagre, 0,075 g.kg⁻¹ EDTA, 5,00 g.kg⁻¹ goma xántica. Asimismo, se agregó la cantidad necesaria de cloruro de sodio para deprimir la actividad de agua a 0,985 y diferentes concentraciones de Tween[®] 20, sorbato de potasio (KS), nisina y aceite de maíz, tal como se menciona en la Tabla 6.2.1. El pH se ajustó a un valor de 3,5 con solución de ácido cítrico (500 g.L⁻¹). Todos los ingredientes, con excepción del aceite, se suspendieron en caldo MRS. La nisina (Novasin[®], Rhodia, Brasil), con una actividad de 1x10⁶ UI/g, se disolvió en una solución conteniendo 0,02 M de HCl y 7,5 g.kg⁻¹ de NaCl, se esterilizó separadamente y luego una dilución apropiada de la misma se adicionó a las fases acuosas de los sistemas para dar una concentración final de 0,500 g.kg⁻¹ de sistema.

Cabe destacar que la concentración usada de nisina (0,500 g.kg⁻¹) corresponde al valor hallado en ensayos previos, donde se determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) del biopreservador para sistemas que modelaban las fases acuosas de aderezos para ensalada, en ausencia de sorbato de potasio (sección 4.2). Si bien, en presencia de sorbato de potasio la MCI fue menor, se empleó esta concentración de nisina para unificar la composición de los sistemas, a pesar de que el ensayo contemplaba formulaciones con o sin sorbato.

6.2.2.3 Inoculación, almacenamiento y muestreo de los sistemas modelo

La suspensión bacteriana se inoculó a los distintos sistemas en una concentración tal que diera una población microbiana inicial de, aproximadamente, 10⁶ UFC.g⁻¹. Para cada formulación, se colocaron 15 g de emulsión en frascos color caramelo con una capacidad de 40 ml, por duplicado. Los sistemas se incubaron a (30 ± 1)°C por 96 h. A distintos períodos de tiempo, se determinó la viabilidad bacteriana mediante la técnica de recuento en placa sobre agar MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) suplementado con 0,5% de fructosa. Todas las placas se incubaron en atmósfera enriquecida con CO₂ a (30 ± 1)°C y los muestreos se realizaron después de 5 días de incubación, tal lo descrito por Smittle y col. (1982).

6.2.2.4 Tratamiento estadístico de los datos

Los datos fueron evaluados a fin de determinar si existía una diferencia apreciable entre la población bacteriana del control y las muestras tratadas con los distintos aditivos para los

distintos niveles de aceite, en cada punto del muestreo durante el almacenamiento. Para ello, se estableció que existía una diferencia apreciable en los niveles de población si la diferencia entre las medias para el control y los distintos tratamientos era igual o mayor que un ciclo \log [UFCg⁻¹]. El valor de un ciclo log se eligió como significancia apreciable ya que las diferencias de un orden de magnitud son generalmente reconocidas como significativas desde el punto de vista microbiológico (Jarvis, 1989; Gill y Holley, 2000).

El análisis de regresión de los datos mostró la existencia de relaciones lineales entre $\log(N/N_0)$ y t , donde N_0 es el número inicial de microorganismos y N es el número de microorganismos al tiempo t , indicando que el proceso letal siguió un patrón correspondiente a una cinética de primer orden (Xiong y col., 1999). En la cinética de primer orden, k representa la constante de velocidad de muerte. Las k correspondientes a cada sistema fueron calculadas a partir de las ecuaciones para los mejores ajustes lineales y las diferencias significativas entre ellas se analizaron mediante el Análisis de Co-varianza (ANCOVA). El nivel de significatividad usado, α , fue de 0,05. El utilitario empleado fue STATGRAPHICS® Plus version 4,0 (Statistical Graphics Corp.).

Tabla 6.2.1. Composición de los sistemas modelo: concentraciones de aceite, sorbato de potasio (KS), nisina y Tween®20 (g.kg⁻¹). Los sistemas en negrita corresponden a los sistemas control para cada nivel de aceite.

Sistema	Aceite	KS	Nisina	Tween®20
6.18	110,00	0	0	0
6.19	110,00	0	0	20,00
6.20	110,00	0	0,500	0
6.21	110,00	0	0,500	20,00
6.22	110,00	0,500	0	0
6.23	110,00	0,500	0	20,00
6.24	110,00	0,500	0,500	0
6.25	110,00	0,500	0,500	20,00
6.26	230,00	0	0	0
6.27	230,00	0	0	20,00
6.28	230,00	0	0,500	0
6.29	230,00	0	0,500	20,00
6.30	230,00	0,500	0	0
6.31	230,00	0,500	0	20,00
6.32	230,00	0,500	0,500	0
6.33	230,00	0,500	0,500	20,00
6.34	460,00	0	0	0
6.35	460,00	0	0	20,00
6.36	460,00	0	0,500	0
6.37	460,00	0	0,500	20,00
6.38	460,00	0,500	0	0
6.39	460,00	0,500	0	20,00
6.40	460,00	0,500	0,500	0
6.41	460,00	0,500	0,500	20,00

6.2.3 Resultados y discusión

Los tratamientos elegidos para realizar el experimento consistieron en cuatro ingredientes y/o aditivos y sus combinaciones de tal modo que los niveles más bajos (ausencia) de sorbato, nisina y Tween pudieran ser utilizados como sistemas control para cada concentración de aceite en las emulsiones y, por lo tanto, para estudiar el efecto de la presencia de los distintos ingredientes y/o aditivos (Tabla 6.2.1, sistemas 6.18, 6.26 y 6.34).

En la Figura 6.2.1, se observa que la población bacteriana de aquellas emulsiones libres de nisina (sistemas 6.18, 6.19, 6.22, 6.23, 6.26, 6.27, 6.30, 6.31, 6.34, 6.35, 6.38 y 6.39) no se modificó a lo largo del almacenamiento en relación a su valor inicial. Esto pone de manifiesto que los factores de estrés empleados impidieron el desarrollo de la bacteria pero, no fueron suficientes para lograr su inactivación. Esta tendencia también se verificó para la emulsión conteniendo 230,00 g.kg⁻¹ de aceite, nisina y Tween (sistema 6.29). La ausencia de crecimiento de la bacteria *L. fructivorans* en las emulsiones antes mencionadas se contrapone con lo observado para los sistemas acuosos, que modelaban las fases acuosas de dichas emulsiones, donde el microorganismo fue capaz de crecer en las condiciones planteadas (sección 4.1.4.2).

Distintos autores (Brocklehurst y col., 1993, 1995; Wilson y col., 2002) hacen referencia a la forma en que se desarrolla el crecimiento microbiano en el medio de interés, ya sea éste líquido o emulsionado. Cuando el medio en cuestión es líquido, se ha comprobado que las bacterias crecen como entidades libres (o planctónicas) mientras que, en matrices emulsionadas, el crecimiento bacteriano se desarrolla como colonias. Ello marcaría el efecto de la estructura del medio en la respuesta del microorganismo. *L. fructivorans* de hecho crece en los aderezos para ensalada, pero su fase de adaptación resulta prolongada, aparentemente por los fenómenos mencionados precedentemente. Distintos autores (Meyer y col., 1989; Smittle, 2000) han informado que su crecimiento causa hinchamiento de las botellas plásticas que la contienen, como resultado de la formación de gas.

6.2.3.1 Efecto de la nisina sobre el desarrollo de *L. fructivorans*

En las emulsiones que contenían nisina (sistemas 6.20, 6.21, 6.24, 6.25, 6.28, 6.29, 6.32, 6.33, 6.36, 6.37, 6.40 y 6.41), en general, se verificó la inactivación de la bacteria (Figura 6.2.1). Una excepción a este comportamiento lo exhibió la emulsión conteniendo 230,00 g.kg⁻¹

de aceite, nisina y Tween (sistema 6.29). Es de destacar que la velocidad de muerte dependió de la composición de cada sistema (Tabla 6.2.2)

Si se consideran las emulsiones con $110,00 \text{ g.kg}^{-1}$ de aceite (Figura 6.2.1, paneles A y B; Tabla 6.2.2), se observó que las que contenían sólo nisina (sistema 6.20), nisina y Tween (sistema 6.21) y nisina, Tween y KS (sistema 6.25) mostraron constantes de inactivación similares poniendo en evidencia que el agregado de Tween o de Tween y KS no afectó la acción de la nisina. No obstante, la adición de KS a la emulsión conteniendo solo nisina (sistema 6.24) promovió una significativa disminución en la constante de inactivación. Probablemente, en el caso de emulsiones conteniendo $110,00 \text{ g.kg}^{-1}$ de aceite, el sorbato de potasio interaccione con la nisina, disminuyendo su acción antimicrobiana. Es de destacar que el agregado de Tween, tiende a contrarrestar esta tendencia, aumentando la constante de muerte (Tabla 6.2.2; sistemas 6.24 y 6.25).

Tabla 6.2.2 Constantes de velocidad de muerte de *L.fructivorans* en emulsiones.

Sistema	$k \cdot 10^2$ [h ⁻¹]
6.20	0,33 ^a
6.21	0,31 ^a
6.24	0,11 ^c
6.25	0,29 ^{ab}
6.28	0,21 ^{bc}
6.32	0,48 ^d
6.33	0,47 ^d
6.36	0,16 ^c
6.37	0,14 ^c
6.40	0,29 ^{ab}
6.41	0,27 ^{ab}

k : constante de velocidad de muerte

Las mismas letras en el superíndice indican que no hubo diferencias significativas entre las constantes ($p > 0,05$).

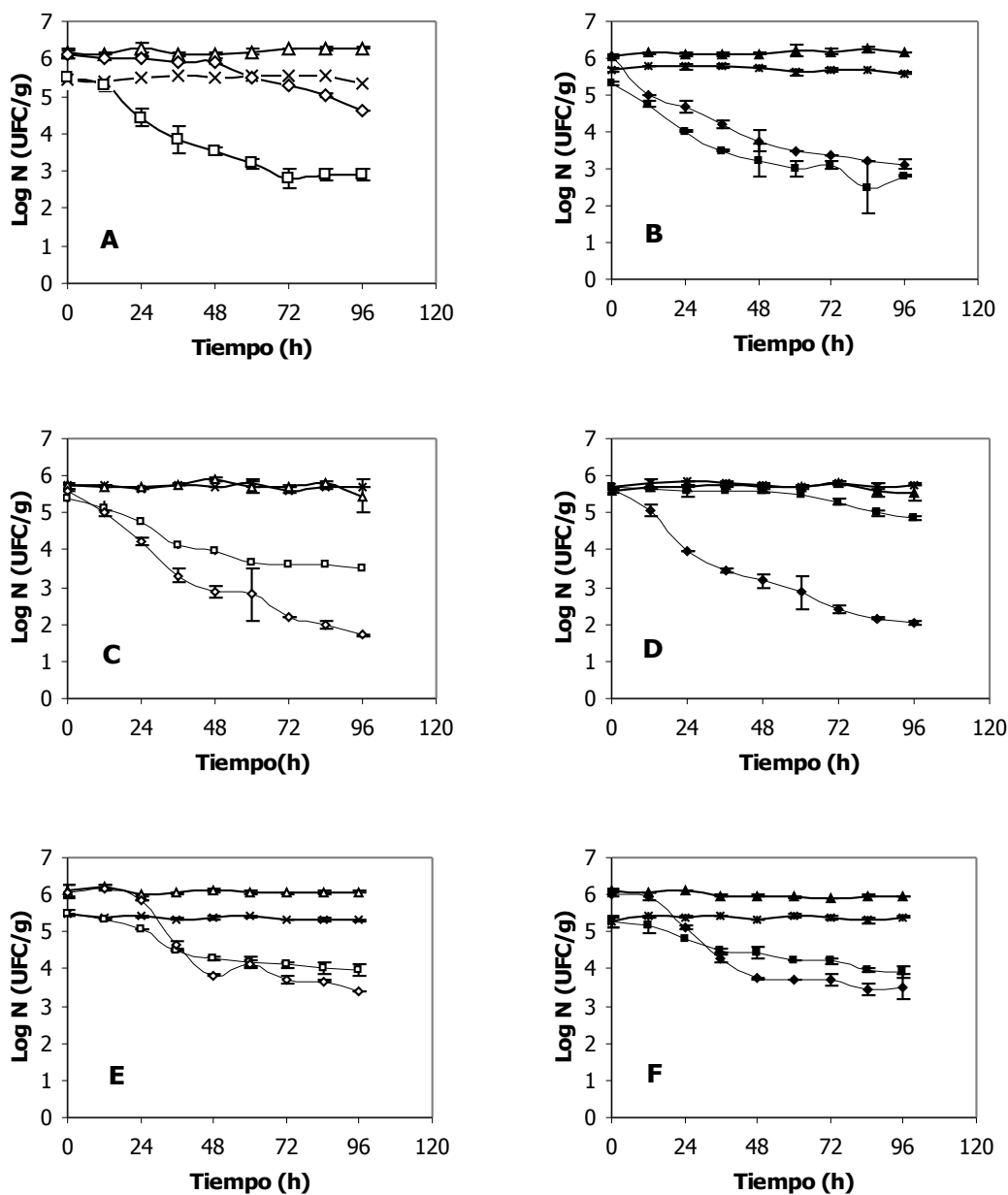


Figura 6.2.1 Efecto de nisina, sorbato de potasio (KS) y Tween[®] 20 (Tw) sobre el recuento de células viables de *L. fructivorans* CRL 941G en sistemas que modelan aderezos para ensalada. **(A)** y **(B)**: sistemas conteniendo 110,00 g.kg⁻¹ de aceite; **(C)** y **(D)**: sistemas conteniendo 230,00 g.kg⁻¹ de aceite; **(E)** y **(F)**: sistemas conteniendo 460,00 g.kg⁻¹ de aceite. Sistema control (§); sistema control + Tw (◻).

Aditivos presentes en los distintos sistemas: nisina (□); KS (△); nisina + KS (◻); nisina + Tw (■); KS + Tw (◻); nisina + KS + Tw (◻).

En los sistemas que contenían 230,00 g.kg⁻¹ de aceite (Figura 6.2.1, paneles C y D y Tabla 6.2.2), la actividad de nisina fue significativa en los sistemas 6.28 (sólo con nisina), 6.32 (con nisina y sorbato) y 6.33 (con nisina, sorbato y Tween) comparada con el sistema control (sistema 6.26) y con el sistema conteniendo sólo Tween (sistema 6.27). Las constantes de destrucción pueden observarse en la Tabla 6.2.2. La emulsión conteniendo nisina y Tween (sistema 6.29) no inhibió el crecimiento, al igual que el sistema conteniendo sólo Tween (sistema 6.27), como puede apreciarse en la Figura 6.2.1, panel D. En la Tabla 6.2.2 puede observarse que las constantes de muerte más altas se encontraron para las emulsiones conteniendo nisina-KS (sistema 6.32) y nisina-KS-Tween (sistema 6.33). Esta tendencia muestra que el KS exaltaría la actividad inhibitoria que la nisina ejerce sobre *L. fructivorans* para este nivel de aceite.

Todos los sistemas que contenían el máximo nivel de aceite (460,00 g.kg⁻¹) y nisina presentaron diferencias significativas respecto del sistema control (sistema 6.34) y del sistema conteniendo sólo Tween (sistema 6.35) como se observa en la Figura 6.2.1, paneles E y F. Ahora bien, se observaron constantes de muerte más altas en el sistema conteniendo nisina y sorbato (6.40) ó nisina, sorbato y Tween (sistema 6.41). La adición de Tween al sistema conteniendo solo nisina o nisina y KS no afectó la velocidad de muerte de *L. fructivorans* (sistema 6.36 vs. 6.37; sistema 6.40 vs. 6.41). De los resultados expuestos se infiere que el agregado de sorbato exalta la actividad de la nisina mientras que el de Tween, no la afecta (Tabla 6.2.2).

Con respecto a la efectividad del biopreservador, los resultados obtenidos a partir de esta experiencia indican que la adición de 0,500 g.kg⁻¹ de nisina a los sistemas que modelaban aderezos para ensalada inhibió el crecimiento de *L. fructivorans* a lo largo del almacenamiento a 30°C. Esta bacteriocina evidenció afectar, en general, a la cepa bacteriana en todas las formulaciones estudiadas (Figura 6.2.1). Los patrones de inhibición difirieron de un tratamiento a otro sugiriendo que la eficacia de este antimicrobiano natural depende de diversos factores. Los factores que podrían influenciar la efectividad de las bacteriocinas en alimentos son: asociación a los componentes del alimento, partición entre los componentes polares y no polares del alimento, así como también condiciones que desestabilicen la actividad biológica del polipéptido, tales como degradación proteolítica u oxidación (Murray y Richard, 1997; Gänzle y col., 1999; Aasen y col., 2003). La acción proteolítica está relacionada a materiales sin procesar, en los cuales hay proteasas presentes, por lo que se asume que no influirían en los sistemas modelo estudiados ya que la actividad de la nisina permanece estable en alimentos sometidos a tratamientos térmicos (Aasen y col., 2003) y se hace aún más estable a los valores de pH ácidos presentes en los sistemas modelo estudiados (Delves-Broughton, 1990). En esta experiencia, el resto de los factores citados resultaría, entonces, de mayor influencia sobre la

actividad de la bacteriocina debido a la naturaleza de la matriz alimenticia: una emulsión aceite en agua.

6.2.3.2 Efecto del sorbato sobre el desarrollo de *L. fructivorans*.

El uso de sorbato de potasio como único aditivo antimicrobiano, no produjo cambios significativos sobre el recuento de células viables (sistemas 6.22, 6.23, 6.30, 6.31, 6.38 y 6.39) en presencia o ausencia de Tween, como se observa en la Figura 6.2.1. El análisis de dicha figura muestra que la adición conjunta de nisina y KS (sistema 6.24), para el nivel inferior de aceite, produjo una menor velocidad de inactivación del microorganismo que la sola presencia de nisina (sistema 6.20). La adición de KS al sistema que contenía nisina y Tween, en presencia de 110,00 g.kg⁻¹ de aceite, no afectó la destrucción del microorganismo (sistema 6.21 vs. 6.25). Ello se puede corroborar comparando las constantes de inactivación de los sistemas 6.21 y 6.25 en la Tabla 6.2.2. En los sistemas acuosos ensayados en la sección 4.2 de esta presentación, se determinó que el empleo de 0,500 g.kg⁻¹ de nisina resultaba bacteriostático para la cepa considerada, mientras que se evidenciaba muerte bacteriana si el sistema contenía además sorbato de potasio. En función de estos resultados, se destaca la distinta funcionalidad de los aditivos de acuerdo con la composición del sistema. Ello se manifiesta, por ejemplo, para la emulsión conteniendo 110,00 g.kg⁻¹ de aceite, en la cual el agregado de sorbato disminuye el efecto bactericida del uso de nisina (comparar sistemas 6.24 vs 6.20).

A diferencia de lo observado para las emulsiones conteniendo 110,00 g.kg⁻¹, el agregado de KS, en presencia de 230,00 g.kg⁻¹ de aceite a los sistemas que contenían nisina (sistema 6.32) ó nisina y Tween (sistema 6.33) determinó una mayor velocidad de muerte que cuando el sorbato no estaba presente (sistemas 6.28 y 6.29). Este efecto sinérgico fue descrito previamente por Buncic y col. (1995) en caldo BHI tamponado (pH 5,5) contra *Listeria monocytogenes* y Fang y col. (1997) encontraron que el tratamiento combinado de estos preservadores extendió la vida útil de alimentos vegetarianos inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* C10 y *Bacillus cereus* B7. Este sinergismo fue abordado ampliamente en el capítulo cuatro (sección 4.2.4) de esta presentación, donde se observó claramente cómo el agregado de KS a sistemas que contenían nisina producía una reducción de las MCIs del preservador para *L.fructivorans*. Básicamente, se asume que la nisina actúa sobre la membrana celular del microorganismo formando poros (Bruno y Montville, 1993; Abee y col., 1995) que permitirían el pasaje del sorbato de potasio al interior de la célula induciendo la inhibición del crecimiento microbiano. Por consiguiente, la presencia conjunta de nisina y sorbato produciría

una mayor inhibición del crecimiento bacteriano que la nisina por sí sola en emulsiones preparadas con 230,00 g.kg⁻¹ de aceite.

El efecto de la inclusión del sorbato en los sistemas con 460,00 g.kg⁻¹ de aceite y conteniendo nisina ó nisina y Tween fue análogo al observado para un contenido de aceite de 230,00 g.kg⁻¹ (Tabla 6.2.2; sistemas 6.36 y 6.37 vs 6.40 y 6.41).

6.2.3.3 Efecto del contenido de aceite sobre el desarrollo de *L. fructivorans*

El incremento en el nivel de aceite de 110,00 a 230,00 ó 460,00 g kg⁻¹ en las emulsiones libres de nisina no afectó el desarrollo de *L. fructivorans* (Figura 6.2.1; sistemas 6.18 vs. 6.26 vs. 6.34; 6.19 vs. 6.27 vs. 6.35; 6.22 vs. 6.30 vs. 6.38; 6.23 vs. 6.31 vs. 6.39). En cambio, en presencia de nisina, el incremento en el nivel de aceite produjo distintos efectos en función de la composición del sistema.

En presencia de nisina o de nisina y Tween, el aumento en la concentración de aceite produjo, en general, una disminución en la constante cinética de muerte del microorganismo (Tabla 6.2.2, sistemas 6.20 vs. 6.28 vs. 6.36 y sistemas 6.21 vs. 6.37). Esta tendencia es coincidente con la reportada en la bibliografía (Jung y col., 1992; Zapico y col., 1999; Bhatti y col., 2004), donde se postula que la nisina es menos efectiva al aumentar el contenido graso de un alimento.

En aquellas emulsiones conteniendo, además de nisina, sorbato ó sorbato y Tween, se puede observar que el aumento del contenido de aceite de 110,00 a 230,00 g kg⁻¹, determinó un aumento de la constante de muerte. En cambio, un incremento en el contenido de aceite de 230,00 g.kg⁻¹ a 460,00 g.kg⁻¹ resultó en una menor constante de muerte en los tratamientos con nisina-KS ó nisina-KS-Tween. Estos resultados están en concordancia con Glass y col. (2004) quienes observaron que una proporción de 200 g.kg⁻¹ de grasa de leche o aceite de soja disminuyó la actividad antibotulínica de nisina, mientras que el efecto de la presencia de 100 g.kg⁻¹ de grasa fue variable, confirmando que el efecto antagonista de las grasas sobre la actividad de la bacteriocina es dependiente del contenido lipídico en el sistema considerado.

Es importante destacar que este efecto diverso se podría deber a:

- a) De acuerdo a bibliografía (Jung y col., 1992; Zapico y col., 1999; Bhatti y col., 2004), la nisina es menos efectiva al aumentar el contenido graso de un alimento.
- b) Las emulsiones aceite en agua estudiadas se comportan como sistemas viscoelásticos. La componente elástica de los sistemas aumenta con el tenor de aceite (ver Apéndice 2). El distinto comportamiento reológico y características

estructurales de las emulsiones estudiadas podría afectar la actividad de los distintos aditivos antimicrobianos de la siguiente manera:

b1) El aumento de aceite podría conllevar a una mayor constante de inactivación de los microorganismos, debido a la reducción de la disponibilidad de nutrientes por el mayor carácter sólido del sistema, el cual dificultaría la difusión y/o solubilización de los mismos.

b2) El aumento de aceite podría conllevar a una menor constante de muerte pues dificulta el encuentro de los antimicrobianos con el microorganismo por el mayor carácter sólido del sistema.

c) El aumento de la fase oleosa determina un aumento de la superficie externa de las gotas (siempre y cuando éstas conserven su tamaño), con lo cual se produce un aumento de la interfase, conduciendo a la posibilidad de que mayor cantidad de nisina se deposite en dicha interfase. Esto comprometería su efectividad (Jung y col., 1992; Blom y col., 1997; Bhatti y col., 2004; Glass y Johnson, 2004), pero posibilitaría también que tanto el biopreservador, como el microorganismo, se “encontrasen” en la superficie de las gotas de aceite y con esto, aumentaría la efectividad de nisina contra el crecimiento bacteriano. Esta posibilidad fue planteada por Kurup y col. (1991 a) y reportada por Brocklehurst y col. (1995), quienes encontraron que las células de *Listeria monocytogenes* que crecían en una emulsión estaban confinadas a la fase acuosa de la misma, pero simultáneamente se hallaban asociadas íntimamente a las gotas de hexadecano que constituía la fase oleosa de las emulsiones ensayadas. Este fenómeno, a su vez, se vio documentado por técnicas microscópicas.

Por lo tanto, ello puede determinar:

c1) que disminuya la efectividad de la nisina por no estar en la fase acuosa, lo que disminuiría la constante cinética de muerte.

c2) que aumente la efectividad de la nisina en la interfase, por ser la interfase un punto de encuentro nisina-microorganismo, lo que aumentaría la constante cinética de muerte.

Asimismo, debemos recordar que en este trabajo se ha determinado que el aumento de la fase oleosa produce una disminución de sorbato en la fase acuosa, el cual como ya se ha dicho, tiene efectos diversos sobre la actividad antimicrobiana de nisina, de acuerdo al nivel de aceite presente.

6.2.3.4 Efecto del Tween sobre el desarrollo de *L. fructivorans*.

La adición de Tween al sistema libre de aditivos o al sistema conteniendo sorbato, no afectó el desarrollo de *L. fructivorans* (Figura 6.2.1; sistemas 6.18 vs. 6.19, 6.26 vs. 6.27, 6.34 vs. 6.35, 6.22 vs. 6.23, 6.30 vs. 6.31 y 6.38 vs. 6.39). En presencia de otros aditivos, su efecto depende del nivel de aceite. Así, para 230,00 g kg⁻¹, cuando el Tween se adicionó en presencia de nisina, ésta cesó de ejercer un efecto bactericida (sistemas 6.28 vs. 6.29), poniendo de manifiesto un efecto antagónico entre el Tween y la nisina. Este efecto antagónico fue descrito también por Henning y col. (1986a); estos autores observaron, además, que el efecto de nisina se veía perturbado por la acción de fosfolípidos, ácidos grasos o sustancias similares en tests *in vitro* (Henning y col., 1986 b). En cambio, para 110,00 g kg⁻¹ de aceite, cuando se adiciona Tween en presencia de nisina y sorbato de potasio, aumenta la constante cinética de muerte. En los restantes sistemas analizados, el agregado de Tween no ejerce efecto alguno.

Debe recordarse las distintas formas en las que el Tween puede afectar la actividad antimicrobiana de la nisina y del sorbato:

a) De acuerdo a referencias bibliográficas (Courthadon y col., 1995; Coupland y Mc Clements, 1996), la adsorción de un polipéptido, tal como la nisina, a la interfase agua-aceite que se forma en una emulsión se ve contrarrestada por el empleo de surfactantes, en particular de Tween[®]20. Estos desplazarían a las bacteriocinas de la interfase, cambiando su ambiente termodinámico. Esta tendencia podría conllevar a:

a1) Un aumento de la actividad de la nisina al estar en el seno de la fase acuosa. Ya se ha comentado que el Tween contrarresta el efecto depresor de la actividad de nisina ejercido por las grasas. Este efecto depresor depende del tenor de grasa, manifestándose a 200 g.kg⁻¹ pero no, a 100 g.kg⁻¹ de contenido de la misma (Glass y col., 2004).

a2) Una disminución de la actividad de la nisina, si se considera la interfase como un punto de encuentro de la nisina y el microorganismo.

b) Por otra parte, la presencia de Tween determina una disminución del tamaño de la gota de aceite, para una dada concentración del mismo (ver sección 5.1.4) y, ello puede ejercer distintos efectos sobre el comportamiento reológico del sistema:

b1) Para concentraciones de aceite de 110,00 y 230,00 g kg⁻¹, el agregado de Tween, vuelve a los sistemas más fluidos (Apéndice 2) y, por lo tanto:

- * podría conducir a una menor velocidad de inactivación pues habría mayor cantidad de nutrientes disponibles para los microorganismos debido al mayor carácter fluido del sistema.
- * podría llevar a una mayor velocidad de inactivación pues favorece el encuentro del microorganismo y los antimicrobianos.

b2) Para 460,00 g kg⁻¹, el agregado de Tween vuelve al sistema más sólido (Apéndice 2) y, por lo tanto:

- * podría llevar a una mayor velocidad de inactivación pues les llega a los microorganismos menor cantidad de nutrientes por el mayor carácter sólido del sistema.
- * podría llevar a una menor velocidad de inactivación pues el mayor carácter sólido dificulta el encuentro del microorganismo y los antimicrobianos.

Los resultados observados, serían así el resultado del balance de las distintas tendencias mencionadas.

6.2.4 Conclusiones

Según lo expuesto anteriormente, la nisina podría utilizarse en aderezos para ensalada, en formulaciones con diferentes concentraciones de aceite, con el objetivo de inactivar a *L.fructivorans*.

El efecto de la presencia de sorbato de potasio sobre la acción de la nisina hacia el lactobacilo es diverso, dependiendo de la composición del sistema y del nivel de aceite.

La actividad de nisina en emulsiones es fuertemente dependiente de la composición química del alimento considerado.

Las interacciones entre aditivos antimicrobianos, surfactantes (emulsificantes) y el contenido de aceite, observadas en esta experiencia, remarcan la importancia de los estudios aplicados sobre el alimento a fin de confirmar la efectividad de la bacteriocina.

6.3 CONCLUSIONES GENERALES

Los ensayos de reto microbiano planteados permitieron observar la actividad desarrollada como aditivos antimicrobianos por los sorbatos sobre *Z. bailii* y por nisina sobre *L. fructivorans* y el efecto de distintos aditivos e ingredientes sobre los mismos. Es de destacar el efecto ejercido por el Tween sobre la actividad antimicrobiana de los sorbatos y de la nisina.

Vemos así que la actividad biológica de los antimicrobianos está condicionada por un sinnúmero de factores, entre los cuales se encuentran las interacciones que se establecen entre los componentes del sistema. Esta visión global, además, se obtuvo sobre la base de sistemas modelo estrechamente relacionados con el alimento "real", observándose tendencias distintas a las propias de los sistemas acuosos por la compleja composición y estructura de las emulsiones.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

7 CONCLUSIONES

En sistemas que modelan la *fase acuosa* de una emulsión tipo aderezo para ensalada:

El estudio de la estabilidad química de los sorbatos permitió obtener las siguientes conclusiones:

- ↻ La presencia de 0,075 g.kg⁻¹ de EDTA, 0,500 g.kg⁻¹ de ácido ascórbico y 20,000 g.kg⁻¹ de cloruro de sodio así como el ajuste de pH a 3,5, utilizando una mezcla de los ácidos acético y cítrico permiten disminuir la destrucción de los sorbatos.
- ↻ El NaCl ó la presencia conjunta de NaCl y sacarosa indujeron la aparición de PNE , probablemente, a partir de los productos de degradación de los sorbatos. La acidificación con los ácidos cítrico y acético evitó el PNE.

Analizando el efecto del pH, del material de empaque y del nivel del EDTA sobre la destrucción del sorbato, se concluyó que:

- ↻ Existe una estrecha relación entre el contenido de hierro y la destrucción de los sorbatos. La presencia de EDTA promovió la captura de hierro de los frascos de vidrio a pH 5,0 cuando la concentración de secuestrante fue de 0,075 g.kg⁻¹ y a pH 3,5 y 5,0 para una concentración de EDTA de 0,500 g.kg⁻¹, mostrando una fuerte interacción entre el material de empaque, el pH y el nivel de secuestrante adicionado.
- ↻ Las condiciones que minimizaron la destrucción del sorbato cuando éste se emplea conjuntamente con EDTA fueron: cuando el pH del sistema fue 3,5 fue mejor usar frascos de vidrio y un nivel de EDTA de 0,075 g.kg⁻¹. Por el contrario, cuando el pH del sistema fue de 5,0, fue mejor el uso de frascos de PET, en presencia de EDTA y, en este caso, el nivel de EDTA agregado no influyó la destrucción del preservador.

El análisis de la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio y de la nisina permitió obtener las siguientes conclusiones:

- ↻ La mínima concentración inhibitoria (MIC) de ácido sórbico que inhibió el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* fue aproximadamente 0,400 g.kg⁻¹.
- ↻ El crecimiento de *Lactobacillus fructivorans* no se inhibió por la presencia de sorbato de potasio, en ninguna de las concentraciones ensayadas.
- ↻ La presencia de EDTA, ácido ascórbico, cloruro de sodio y sacarosa, no influyó sobre el crecimiento de la levadura y tampoco constituyó un factor diferencial en la determinación de la MCI del sorbato de potasio.

- ↗ La nisina inhibió el crecimiento de *L. fructivorans* y su efectividad se vió incrementada por la presencia de sorbato de potasio, EDTA y cloruro de sodio, ya que el uso de estos aditivos promovió la disminución de los valores de MCIs hallados.
- ↗ El empleo conjunto de KS y nisina ejerció un efecto sinérgico sobre la acción antimicrobiana de nisina en los sistemas modelo estudiados.
- ↗ La adición del biopreservador, en una concentración inhibitoria para el lactobacilo ($0,500 \text{ g.kg}^{-1}$), no comprometió la efectividad del sorbato sobre *Z. bailii*, ya que la MCI de KS hallada en presencia de nisina coincidió con la MCI correspondiente a la misma formulación testeada en ensayos previos.

En relación a las *emulsiones* que modelan aderezos para ensalada se obtuvieron las siguientes conclusiones:

En cuanto a la estabilidad físico-química y la caracterización de emulsiones modelo:

a) El estudio de la estabilidad y el tamaño de gota permitió concluir que:

- ↗ Para que las emulsiones conteniendo 110,00 , 230,00 o 460,00 g.kg^{-1} de aceite y medios de cultivo (caldo SAB o MRS) fueran estables durante el almacenamiento fue necesaria la adición de 5 g.kg^{-1} de goma xántica.
- ↗ El agregado de Tween[®] 20 provocó una disminución en el tamaño de gota de las emulsiones, contribuyendo a la estabilidad de las mismas.

b) El estudio del reparto de los sorbatos entre fases permitió concluir que:

- ↗ La partición del sorbato de potasio en las emulsiones ensayadas se vió condicionada por ciertos aditivos e ingredientes, a saber:
- ↗ La presencia de cloruro de potasio, cloruro de sodio y miel en la fase acuosa de la emulsión produjo un aumento del valor del coeficiente de reparto aparente (P_{ap}), respecto del sistema control, evidenciando una reducción de la afinidad del preservador por la fase acuosa, debido a que estos aditivos reducirían la solubilidad del ácido sórbico en esta fase.
- ↗ Las proteínas, presentes en el medio de cultivo y aisladas, tal el caso de la nisina, produjeron una reducción del valor de P_{ap} respecto del valor del sistema control sin proteínas. El incremento de la afinidad del preservador por la fase acuosa de la emulsión mediada por las proteínas podría deberse a fenómenos de naturaleza estereoquímica.

- ↪ Los aceites de canola y girasol presentaron coeficientes de reparto cuyos valores son menores a los hallados para los aceites de maíz y de oliva, siendo este último el que presentó el mayor valor de los cuatro aceites ensayados.
- ↪ El Tween® 20 redujo significativamente el P_{ap} .

c) Los estudios de la cinética de degradación de los sorbatos en emulsiones permitieron observar que:

- ↪ La cinética de degradación del ácido sórbico en las emulsiones ensayadas fue significativamente influenciada por la composición del medio y, en algunos casos, difirió de los resultados hallados para sistemas modelo acuosos:
 - i. El efecto protector, que tanto el EDTA como el ácido ascórbico ejercieron en los sistemas acuosos, no se evidenció en las emulsiones.
 - ii. La adición de NaCl ó NaCl y sacarosa redujo la degradación del preservador en los sistemas con 110,00 g.kg⁻¹ de aceite. La misma tendencia se observó en los sistemas acuosos. Sin embargo, en aquellos sistemas con 230,00 g.kg⁻¹ de aceite la presencia de estos aditivos contribuyó a pérdidas de ácido sórbico significativamente mayores a las observadas para los sistemas que no los contenían.
 - iii. La presencia de goma xántica y Tween no ejerció ningún efecto sobre la degradación del sorbato tanto en sistemas acuosos como en emulsiones.
 - iv. La nisina promovió la oxidación del preservador en todos los sistemas considerados, tanto acuosos como emulsionados.

El estudio de la estabilidad microbiológica de las emulsiones ensayadas permitió observar que:

- ↪ La adición de sorbato de potasio (0,500 g.kg⁻¹) ejerció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Z.bailii*. Este efecto se vió influenciado por el nivel de aceite de la emulsión así como por la adición del surfactante Tween® 20.
- ↪ La presencia de altas concentraciones de aceite (460,00 g.kg⁻¹) no permitió el desarrollo de la levadura, incluso en ausencia de KS. La adición de este aditivo no modificó la velocidad de inactivación de la levadura
- ↪ El Tween ejerció efectos específicos que afectaron el desarrollo de la levadura:
 - i. En las emulsiones conteniendo 110,00 o 230,00 g.kg⁻¹ de aceite, la acción antimicrobiana de los sorbatos se vió disminuida y se atribuyó esta tendencia a la disminución de la concentración del KS libre en la fase acuosa provocada por la adición del surfactante.
 - ii. En las emulsiones con el mayor nivel de aceite ensayado (460,00 g.kg⁻¹), la adición de Tween indujo un aumento de la actividad del sorbato de potasio, a pesar de que la

cantidad de antimicrobiano libre también disminuyó debido a su asociación con las micelas del surfactante.

- ↗ En todas las emulsiones ensayadas, el desarrollo de *L. fructivorans* se vió inhibido por el uso conjunto de 0.075 g.kg⁻¹ de EDTA, 25,000 g.kg⁻¹ de vinagre, NaCl en cantidad suficiente para deprimir la a_w a 0,985 y con el pH ajustado a 3,5 mediante el empleo de ácido cítrico.
- ↗ La adición de nisina, en general, fue indispensable para lograr la inactivación de *L. fructivorans* verificándose que la composición del sistema condiciona la velocidad de dicha reacción
- ↗ La adición de sorbato de potasio mostró diferentes tendencias sobre el desarrollo de *L. fructivorans* según el nivel de aceite presente y la composición del sistema:
 - i. en las emulsiones conteniendo 110,00 g.kg⁻¹, y libres de Tween mostró un efecto antagónico con la nisina . La adición de Tween 20 contrarrestó el efecto mencionado.
 - ii. en las que contenían 230,00 ó 460,00 g.kg⁻¹ de aceite actuó sinérgicamente con la actividad antimicrobiana del biopreservador independientemente de la presencia de Tween.
- ↗ El incremento en el nivel de aceite de 110,00 a 230,00 ó 460,00 g.kg⁻¹ en las emulsiones libres de nisina no afectó el desarrollo de *L. fructivorans*
- ↗ En presencia de nisina, el incremento en el nivel de aceite produjo distintos efectos sobre la inactivación de *L. fructivorans* de acuerdo a la composición del sistema:
 - i. en presencia de nisina o de Tween y nisina, se observó una disminución de la constante de inactivación
 - ii. en presencia de nisina-sorbato o nisina-sorbato-Tween se observó un aumento en la constante de inactivación cuando el nivel de aceite se incrementó de 110,00 a 230,00 g.kg⁻¹. En cambio, el incremento de 230,00 a 460,00 g.kg⁻¹ indujo una disminución en la constante de muerte.
- ↗ El efecto del agregado de Tween[®] 20 sobre el desarrollo de *L. fructivorans* dependió de la composición del sistema y del nivel de aceite:
 - i. para emulsiones conteniendo 230,00 g.kg⁻¹ de aceite, la adición de Tween ejerció un efecto antagónico sobre la acción bactericida de nisina.
 - ii. para emulsiones conteniendo 110,00 g.kg⁻¹ de aceite, la adición de Tween en presencia de nisina y sorbato de potasio incrementó la velocidad de inactivación.
 - iii. en las restantes emulsiones ensayadas, la adición de Tween no ejerció efecto alguno.

En esta última parte del trabajo se realizaron estudios reológicos para colaborar a la explicación de las tendencias observadas. Los estudios fueron de carácter dinámico y permitieron concluir que las emulsiones presentaron módulos de almacenamiento mayores que

los de pérdida. Asimismo, se observó que para contenidos de aceite de 110,00 ó 230,00 g kg⁻¹, la presencia de Tween aumentó el comportamiento fluido del sistema. En cambio, para un contenido de aceite de 460,00 g kg⁻¹, aumentó el comportamiento elástico del sistema con la presencia del emulsificante. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el aumento de aceite en el sistema, además de afectar sus características de flujo, afectó también la concentración de los solutos en la fase acuosa lo que determinó cambios de pH y fuerza iónica y fue el peculiar balance de todos los factores mencionados lo que determinó las tendencias observadas en relación a la estabilidad microbiológica.

En base a las conclusiones mencionadas cabe destacar que:

- ✦ Si bien la MCI de KS para *Z. bailii* fue de 0,400 g.kg⁻¹, se recomienda el empleo de una cantidad mayor para la conservación de aderezos para ensalada, dado que la degradación del KS y su reparto entre la fase oleosa y la acuosa podrían conducir a concentraciones del preservador menores a la MCI citada y, por lo tanto, se vería comprometida la estabilidad del producto.
- ✦ El empleo de nisina resulta promisorio para la conservación de aderezos para ensaladas en una concentración de 0,500 g.kg⁻¹. No obstante, se debe considerar que su presencia induce una mayor degradación del ácido sórbico en emulsiones. Es importante destacar que la presencia de aceite compromete la actividad biológica de la bacteriocina frente a *L. fructivorans* y este fenómeno no se ve contrarrestado, en general, por la presencia del surfactante ensayado.
- ✦ Los resultados obtenidos muestran que, de acuerdo a la composición del sistema, las interacciones entre los aditivos y componentes de los aderezos son diversas, siendo importante su consideración para asegurar la vida útil de estos alimentos.

APÉNDICE 1

COMPOSICIÓN de MEDIOS de CULTIVO y de CONSERVACIÓN para MICROORGANISMOS

- **Caldo SABOURAUD (SAB)**

Composición típica, para 1 litro de medio de cultivo:

- Triptona	5,00 g
- Peptona de carne	5,00 g
- Glucosa	20,00 g

pH del medio listo para usar, a 25°C: 5,7 ± 0,2.

- **Agar SABOURAUD (SAB)**

Composición típica, para 1 litro de medio de cultivo:

- Agar bacteriológico	15,00 g
- Peptona de carne	10,00 g
- Glucosa	35,00 g

pH del medio listo para usar, a 25°C: 5,7 ± 0,2.

- **Líquido crioprotector**

Composición típica, para 100 ml:

- Leche descremada	10,00 g
- Extracto de levadura	0,50 g
- Glicerol	10,00 g

- Glucosa	1,00 g
-----------	--------

Este preparado se esteriliza a 110°C, durante 30 minutos, para minimizar el pardeamiento no enzimático y la caramelización de los glúcidos presentes (glucosa y lactosa).

- **Caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe)**

Composición típica, para 1 litro de medio de cultivo:

- Polipeptona	10,00 g
- Extracto de carne	10,00 g
- Extracto de levadura	5,00 g
- Glucosa	20,00 g
- Tween® 80	1,08 g
- Fosfato dipotásico	2,00 g
- Acetato de sodio	5,00 g
- Citrato de amonio	2,00 g
- Sulfato de magnesio	0,20 g
- Sulfato de manganeso	0,05 g

pH del medio listo para usar, a 25°C: 6,4 ± 0,2.

- **Agar MRS**

La composición, para un litro de medio de cultivo, es la misma que para el caldo MRS con la adición de 15 g de agar bacteriológico. El pH del medio listo para usar, a 25°C, es de 6,4 ± 0,2.

APÉNDICE 2

REOLOGÍA de EMULSIONES con ESPECIAL REFERENCIA a los ADEREZOS para ENSALADA

Con el objeto de ayudar a la comprensión de las tendencias observadas en los ensayos de reto microbiano, se procedió a la determinación de las propiedades reológicas de algunas de las emulsiones que modelan aderezos para ensalada.

A2.1 Introducción

La reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia (Macosko, 1994).

Un reómetro dinámico es un equipo que permite caracterizar las propiedades reológicas de los materiales mediante ensayos dinámicos (oscilatorios) o cuasiestáticos.

Cuando se realiza un ensayo dinámico, la muestra se somete a un esfuerzo o a una deformación que varía en forma armónica sinusoidal (Schramm, 1994).

Si se aplica sobre la muestra una deformación sinusoidal (γ) en condiciones de viscoelasticidad lineal, se obtiene una respuesta (esfuerzo, τ) sinusoidal que puede estar en fase (sólido) o desfasada (90° , líquido ideal; 0° , sólido; intermedia entre 0 y 90° , comportamiento viscoelástico o elastoviscoso) respecto al estímulo.

En el caso de los materiales viscoelásticos, es común caracterizarlos mediante el módulo complejo (G^*), el cual se define como:

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$$

Siendo τ_0 el módulo del esfuerzo y γ_0 el módulo de la deformación.

Los materiales viscoelásticos tienen su módulo complejo y su ángulo de desfasaje (δ) dependientes de la frecuencia. Por ello, para caracterizarlos, se requiere conocer cómo varían los mismos con la frecuencia, es decir, realizar un barrido de frecuencia.

El módulo complejo también puede descomponerse en una componente real y en otra imaginaria (Schramm, 1994):

$$G^* = G' + i.G''$$

Donde:

$G' = G^* \cdot \cos \delta = \tau_0/\gamma_0 \cdot \cos \delta$ = módulo elástico ó de almacenamiento.

$G'' = G^* \cdot \sin \delta = \tau_0/\gamma_0 \cdot \sin \delta$ = módulo viscoso ó de pérdida.

El módulo elástico está asociado con el almacenamiento y la recuperación de energía durante la aplicación periódica del estímulo y, por lo tanto, representa la componente elástica del material. Por el contrario, el módulo de pérdida está asociado a la disipación de energía y, por lo tanto, representa la componente fluida del sistema.

En la mayoría de los casos, para alimentos sólidos y semisólidos, G'' es mucho menor que G' (Doublier y col., 1992; Rao, 1992).

La relación entre la componente viscosa y la componente elástica del material viscoelástico, G''/G' , es el valor de la tangente del ángulo de desfasaje entre el estímulo y la respuesta ($G''/G' = \tan \delta$).

Antes de realizar cualquier ensayo dinámico para caracterizar un material, debe determinarse el intervalo de comportamiento viscoelástico lineal para el material de interés. Si se llevaran a cabo los ensayos oscilatorios fuera de dicho rango, la muestra se alteraría y no se estaría evaluando el comportamiento *at rest*, sino el comportamiento del material frente a grandes deformaciones.

Los ensayos dinámicos son ampliamente utilizados en la caracterización reológica de distintos alimentos, debido a varias ventajas, entre las cuales se pueden mencionar (Schramm, 1994; Rao, 1992):

- Brindan información muy precisa sobre fenómenos estructurales (sensibilidad elevada a la transición vítrea, al entrecruzamiento de polímeros, a la separación de fases, etc.) trabajando en el rango de viscoelasticidad lineal.
- Son no destructivos.
- Son especialmente apropiados para caracterizar materiales viscoelásticos.
- Ayudan a comprender características estructurales del material.

A2.2 Materiales y métodos

A2.2.1 Composición de los sistemas estudiados

El estudio reológico se desarrolló sobre emulsiones constituidas por 110,00 , 230,00 ó 460,00 g kg^{-1} de aceite en agua, las cuales contenían 25,000 g kg^{-1} de vinagre, 5,00 g kg^{-1} de goma xántica, 1,000 g kg^{-1} de sorbato de potasio, 0,500 g kg^{-1} de nisina y con pH ajustado a 3,5 con solución de ácido cítrico (500 g L^{-1}), con o sin Tween (20,00 g kg^{-1}).

A2.2.2 Medición de propiedades reológicas "bulk"

Las mediciones reológicas se realizaron usando un reómetro de Paar Physica MC200 shear-rheometer (Alemania) con una geometría de platos paralelos de acero inoxidable de 30 mm de diámetro y con una luz (*gap*) de 2 mm. Se realizaron barridos de esfuerzo entre 0,01 y 4 Pa a frecuencias constantes de 6 s^{-1} para determinar el rango de viscoelasticidad lineal en el cual G' y G'' , así como la relación de deformación/esfuerzo, eran constantes para las muestras estudiadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó un valor de deformación de 4,0 % para realizar los barridos de frecuencia de las emulsiones con 110,00 y 230,00 g kg^{-1} de aceite y de 0,5 % para la emulsión conteniendo 460,00 g kg^{-1} de aceite. En todos los casos se barrieron frecuencias en el rango 0,03 a 40 s^{-1} .

A2.3 Resultados

En general, todas las emulsiones tienden a presentar cruces de los trazos de G' y G'' a frecuencias entre 25 y 30 s^{-1} . Sin embargo, este cruce desaparece en la emulsión conteniendo 460,00 g kg^{-1} de aceite.

Asimismo, las emulsiones con el mayor tenor de aceite presentan un pico a frecuencias de 5-6 s^{-1} , comportamiento observado en muchos geles de comportamiento eminentemente elástico.

Se puede observar en la tabla A2.1 que para contenidos de aceite de 110,00 ó 230,00 g kg^{-1} , la presencia de Tween aumenta el comportamiento fluido del sistema ($\tan \delta$ aumenta). En cambio, para un contenido de aceite de 460,00 g kg^{-1} , aumenta el comportamiento elástico del sistema con la presencia del emulsificante ($\tan \delta$ disminuye).

Tabla A2.1 Comportamiento de flujo de las emulsiones estudiadas.

Composición	G'	G''	$\tan \delta$
110,00 g. kg^{-1} de aceite, sin Tween	12,3 ± 0,5	6,29 ± 0,05	0,506 ± 0,002
110,00 g. kg^{-1} de aceite, con Tween	10,1 ± 0,9	6,0 ± 0,2	0,59 ± 0,04
230,00 g. kg^{-1} de aceite, sin Tween	18,2 ± 0,2	8,5 ± 0,3	0,47 ± 0,02
230,00 g. kg^{-1} de aceite, con Tween	12,4 ± 0,2	6,9 ± 0,5	0,56 ± 0,03

460,00 g.kg ⁻¹ de aceite, sin Tween	0,3 38,6 ±	14,7 ± 0,2	0,380 ± 0,001
--	---------------	------------	---------------

460,00 g.kg ⁻¹ de aceite, con Tween	0,6 57 ± 3	17,9 ± 0,1	0,32 ± 0,01
--	---------------	------------	-------------

A su vez, en los sistemas con 460,00 g kg⁻¹ de aceite, el agregado de Tween provoca un aumento del carácter sólido. Evidentemente, este sistema tiene un alto grado de comportamiento elástico (alto G') y la disminución del tamaño de gota permite un mayor empaquetamiento, aumentando su carácter sólido aún más.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Aasen, I.M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L. y Naterstad, K., 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185.
- Abee T., Krockel L. y Hill C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185.
- An-Erl King, V., 1993. Studies on the control of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* by using response surface methodology to achieve effective preservation at high water activities. *Int. J. Food Sci. Technol.* 28, 519-529.
- Anzlovar, S., Dalla Serra, M., Dermastia, M. y Menestrina, G., 1998. Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 11, 610-617.
- A.O.A.C., 1990. *Official Methods of Analysis*, 13ra. Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., Estados Unidos.
- Aplin & Barret, 1996. "Dressing & Sauces: The Nisaplin® Advantage" Catalog. Aplin & Barret Ltd., Trowbridge, Wiltshire, Inglaterra.
- Arya, S.S., 1980. Stability of sorbic acid in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1246-1249.
- Arya, S.S. y Thakur, B.R., 1988. Degradation products of sorbic acid in aqueous solutions. *Food Chem.* 29, 41-49.
- Azukas, J.J., 1962. Sorbic acid inhibition of enolase from yeast and lactic acid bacteria. Thesis. Michigan State Univ., Estados Unidos.
- Bani-Jaber A., McGuire J., Ayres J.W. y Daeschel M.A., 2000. Efficacy of the antimicrobial peptide nisin in emulsifying oil in water. *J. Food Sci.* 65, No. 3, 502-506.
- Barry, A.L., 1976. *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices*. Lea and Febiger, Philadelphia, Estados Unidos.

- Bathey, S. A., Duffy, S. y Schaffner, D., 2002. Modelling yeast spoilage in cold filled ready to drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1901-1906.
- Bhatti, M., Veeramachaneni, A. y Shelef, L.A., 2004. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. Int. J. Food Microbiol. 97: 215-219.
- Bean, H.S., Konning G.H. y Malcolm S.A. 1969. A model for the influence of emulsion formulation on the activity of phenolic preservatives. J. Pharm. Pharmac. 21, Suppl., 173 S-181 S.
- BeMiller, J.N. y Whistler, R.L., 1996. Carbohydrates. En: *Food Chemistry*. Ed. Fennema, O.R. Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- BeMiller, J.N. y Daniels, J.R., 2002. Phosphate esters in potato starch. Disponible en: www.cfs.purdue.edu/class/F&N630/Virt_Class_2/starch630.htm
- Beuchat, L. R., 1976. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssoschlamys nivea* ascospores. Mycopathologia, 59, 175-179.
- Beuchat, L.R., 1981 a. Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds. Appl. Environ. Microbiol. 41, 472-481.
- Beuchat, L. R., 1981 b. Synergistic effects of potassium sorbate and sodium benzoate on thermal inactivation of yeasts. J. Food Sci. 46, 771-777.
- Beuchat, L. R., 1982. Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. J. Food Sci. 47, 1679-1682.
- Bills, S., Restaino, L. y Lenovich, L., 1982. Growth response of an osmotolerant sorbate-resistant yeast, *Saccharomyces rouxii*, at different sucrose and sorbate levels. J. Food Prot. 45, 1120-1124.
- Binstok G.F., Campos C.A. y Gerschenson L.N. 1998. Sorbates-Nitrites reaction in meat products. Food Res. Int. 31, 8, 581-585.

- Bjorkroth, K.J. y Korkeala, H.J., 1997. *Lactobacillus fructivorans* spoilage of tomato ketchup. J. Food Prot. 60, 5, 505-509.
- Blackburn P., Polak, J., Gusik, S. y Rubino, S., 1998. Nisin compositions for use as enhanced, broad range bactericides. AMBI, Tarrytown, NY, Estados Unidos, 470929 5,753,614.
- Blocher, J.C. y Busta, F.F., 1985. Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. J. Appl. Bacteriol. 59, 467-478.
- Blom, H., Katla, T., Hagen, B.F. y Axelsson, L., 1997. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect difusión of bacteriocins. Int. J. Food Microbiol. 38, 103-109.
- Bracey, D., Holyoak, C.D. y Coote, P.J., 1998. Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular ph? J. Appl. Microbiol. 85.
- Branen, J.K. y Davidson P.M., 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. Int. J. Food Microbiol. 90, 63-74.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H. y de Kruijff, B., 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. Science 286, 2361-2364.
- Brocklehurst, T.F. y Lund, B.M., 1984. Microbiological changes in mayonnaise-based salads during storage. Food Microbiol. 1, 5-12.
- Brocklehurst, T.F., Parker, M.L., Gunning, P.A. y Robins, M.M., 1993. Microbiology of food emulsions: physicochemical aspects. Lipid Technol., July/August, 83-88.
- Brocklehurst, T.F., Parker, M.L., Gunning, P.A., Coleman, H.P. y Robins, M.M., 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. J. Appl. Bacteriol. 78, 609-615.

Brocklehurst, T.F. y Wilson, P.D.G., 2000. The role of lipids in controlling microbial growth. *Grasas y Aceites* 51 (Fasc 1-2), 66-73.

Brotz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Gotz, F., Bierbaum, G. y Sahl, H.G., 1998a. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30, 317-327.

Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E. y Sahl, H.G., 1998b. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 154-160.

Brul, S., Stratford, M., van der Vaart, J.M., Dielbandhosing, S.K., Steels, H., Klis, F.M. y Verrips, C.T., 1997. The antifungal action of 1,10-o-phenanthroline and EDTA is mediated through zinc chelation and involves cell wall construction. *Food Technol. Biotechnol.* 35, 267-274.

Brul, S. y Coote, P., 1999. Preservative agents in foods . Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 1-17.

Bruno, M.E.C., Kaiser, A. y Montville, T.J., 1992. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environm. Microbiol.* 58, 2255-2259.

Bruno, M.E.C. y Montville, T.J., 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (9), 3003-3010.

Bolin, H.R., King, A.D. Jr. y Stafford, A.E., 1980. Sorbic acid loss from high moisture prunes. *J. Food Sci.* 45, 1434-1438.

Booth, I.R. y Kroll, R.G., 1989. The preservation of foods by low pH. En: *Mechanisms of action of food preservation procedures*, (Ed.) G.W. Gould. Elsevier, Londres, Inglaterra.

- Bouttefroy A., Mansour M., Linder M. y Milliere J-B., 2000. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 109-115.
- Buncic S., Fitzgerald C.M., Bell R.G. y Hudson J.A., 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. *J. Food Safety* 15, 247-264.
- C.A.A. Código Alimentario Argentino. (2006) Disponible en: www.anmat.gov.ar/principal.htm
- Campos, C.A., Gerschenson L.N., Alzamora, S.M. y Chirife, J., 1991. Determination of sorbic acid in raw beef: an improved procedure. *J. Food Sci.* 56, (3): 863-866.
- Campos, C.A., 1995. Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Campos, C.A., Alzamora, S.M. y Gerschenson L.N., 1995. Sorbic acid stability in meat products of reduced water activity. *Meat Sci.* 41, 1, 37-46.
- Campos, C.A. y Gerschenson, L.N., 1996. Effect of certain additives on sorbates stability. *Food Res. Int.* 29 (2), 147-154.
- Campos, C.A., Rojas, A.M. y Gerschenson, L.N., 1996. Studies of the effect of EDTA on sorbic acid degradación. *Food Res. Int.* 29 (3-4), 259-264.
- Campos, C.A., Alzamora, S.M. y Gerschenson L.N., 1997. Sorbate destruction and non-enzymatic browning in model aqueous systems. *Food Sci. Technol. Int.* 3 (6), 405-411.
- Campos, C. A., Alzamora, S. M. y Gerschenson, L. N., 2000. Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 117-122.
- Charlton, D.B., Nelson, F.E. y Werkman, C.H., 1934. Physiology of *Lactobacillus fructivorans* sp. Nov. isolated from spoiled salad dressing. *Iowa State J. Sci.* 9, 1-11.

- Chen, Y., Ludescher, R.D. y Montville, T.J., 1997a. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of Pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4770-4777.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M. y Montville, T.J., 1997b. Functional characterization of Pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 524-531.
- Chen, H. y Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews Food Sci. Food Safety* 2, 82-100.
- Cheng, L., Moghraby, J. y Piper, P. W., 1999. Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 89-95.
- Chikindas, M.L. y Montville, T.J., 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. En: Juneja, V.K., Sofos, J.N., editores. *Control of foodborne microorganisms*. Marcel Dekker, Inc., New York, Estados Unidos.
- Christian, G.C. y Feldman, J.J., 1970. *Atomic Absorption Spectroscopy: Applications in Agriculture, Biology and Medicine*. Wiley-Interscience, New York, Estados Unidos.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Fernández, M.F. y Hernández, P.E., 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15, 289-298.
- Cirigliano, M.C., 1985. Microbiological hazards to processing. Presented at Sanitation Seminar, Sept. 1985. Assn. for Dressings and Sauces, Atlanta, Ga., Estados Unidos.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F. y Chikindas M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.
- Cole, M.B. y Keenan, M.H.J., 1987. Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailii*, and its implications in weak-acid resistance. *Yeast* 3, 23-32.
- Coupland, J.N. y McClements, D.J., 1996. Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 84-90.

- Courthadon, J-L., Girardet, J-M., Chapal, C., Lorient, D. y Linden, G., 1995. Surface activity and competitive adsorption of milk component 3 and porcine pancreatic lipase at the dodecane-water interface. En: *Food Macromolecules and Colloids*. E. Dickinson y D. Lorient, editores, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra, 58-70.
- Crandall, A.D. y Montville, T.J., 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 231-237.
- Crowell, E.A. y Guymon, I.F., 1975. Wine constituents arising from sorbic acid addition, and identification of 2-ethoxyhexa-3,5-diene as source of geranium-like off-odor. *Am. J. Enol. Vitic.* 26, 97-102.
- Cutter, C.N. y Siragusa, G.R., 1995. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Prot.* 58, 977-983.
- Dakin, J.C. y Radwell, J.Y., 1971. Lactobacilli causing spoilage of acetic acid preserves. *J. Appl. Bact.* 34, 541-545.
- Dalgaard P., Ross T., Kamperman L., Neumeyer K. y McMeekin T.A., 1994. Estimation of bacterial growth rates and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 391-404.
- Dalgleish, D.G., 1996. Food Emulsions. En: *Emulsions and Emulsion Stability*, Ed.: Sjoblom, J., Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- Deem, M.W., 2006. Structure and function of cystine-knot peptide antimicrobials. Personal communication. Disponible en: www.mwdeem.rice.edu/mwdeem/
- Delves-Broughton, J., 1990. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technol.*, 44: 100-107.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. y Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 193-202.
- de Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23 (1), 130-135.

- Demetriades, K., Coupland, J.N. y Mc Clements, D.J., 1997. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *J. Food Science* 62, 342.
- Demetriades, K., Coupland, J.N. y Mc Clements, D.J., 1997. Physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions as affected by heating and ionic stress. *J. Food Science* 62, 462.
- Dickinson E., Murray B.S. y Stainsby G., 1988. *Advances in Food Emulsions and Foams*. Ed. E. Dickinson and G. Stainsby. Elsevier Applied Science, London, p. 123.
- Dickinson, E., 1992. *Introduction to Food Colloids*. Oxford University Press. Oxford, Inglaterra.
- Dickinson, E., Ma, J. y Povey, M.J.W., 1994. Creaming of concentrated oil-in-water emulsions containing xanthan. *Food Hydrocolloids* 8 (5), 481-497.
- Dickinson, E., 1995. Recent trends in food colloids research. En: *Food macromolecules and colloids*. Eds.: Dickinson, E. y Lorient, D., Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.
- Dickinson, E. y Mc Clements, D.J., 1995. *Advances in Food Colloids*, Chapman & Hall, Londres, Inglaterra.
- Dodd, C., 1990. Detection of microbial growth in food by cryosectioning and light microscopy. *Food Science and Technol. Today* 4 (3), 180-182.
- Dodd, C. y Waites, W.M., 1991. The use of toluidine for in situ detection of microorganisms in foods. *Letters in Applied Microbiol.* 13, 220-223.
- Driessen, A.J., van den Hooven, H.W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H.-G., Konings, R.N. y Konings, W.N., 1995. Mechanistic studies of antibiotic-induced permeabilization of phospholipids vesicles. *Biochemistry* 34, 1606-1614.
- Eklund, T., 1980. Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 48, 423-432.
- Eklund, T., 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 383.

Eklund, T., 1985. The effect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. J. Gen. Microbiol. 131, 73-76.

Eklund, T., 1989. Organic acids and esters. En: Mechanisms of action of food preservation procedures. Ed.: Gould, G.W., Elsevier Applied Science. London, Inglaterra, y New York, Estados Unidos.

Evans, D.F. y Wennerstrom, H., 1994. *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*. VCH Publishers. New York, Estados Unidos.

Fabian, F.W. y Wethington, M.C., 1950. Bacterial and chemical analyses of mayonnaise, salad dressing, and related products. Food Res. 15, 138.

Fang T.J., Chen C.Y. y Chen, H.H.L., 1997. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* on a vegetarian food treated with nisin combined with either potassium sorbate or sodium benzoate. J. Food Safety 17, 69-87.

FAO/WHO, 1973. 17ª JECFA. Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), Roma, Italia.

Fellows, P., 1994. Tecnología del procesado de los alimentos. Acribia, Zaragoza, España, 454-460.

Fernández Navarro, J., 1985. *El vidrio*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto de Cerámica y Vidrio. Madrid, España.

Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cassand, P. y de Saint Blanquat, G., 2000. Genotoxicity study of reaction products of sorbic acid. J. Agric. Food Chem. 48, 3605-3610.

Finol, M.L., Marth, E.H. y Lindsay, R.C., 1982. Depletion of sorbate from different media during growth of *Penicillium* species. J. Food Prot. 45, 398-404.

Florence, A.T. y Atwood, D., 1988. *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 239-253. Macmillian Press Ltd., London, Inglaterra.

Frazer, A.C., Sharratt, M. y Hickman, J.R., 1962. The biological effects of food additives. 1. Nisin. J. Sci. Food Agric. 13, 32-42.

- Frazier, W.C., 1967. "Food Microbiology", p. 537. McGraw-Hill, New York, Estados Unidos.
- Freese, E., Sheu, C.W. y Galliers, E., 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241, 321-325.
- Furia T.E., 1972. Sequestrants in food, en *Handbook of Food Additives*, Ed Furia, CRC Press, Cleveland, OH, 271-294.
- Gänzle, M.G., Weber, S. y Hammes, W.P., 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 207-217.
- Gerschenson, L.N., Alzamora, S.M. y Chirife, J., 1986. Stability of sorbic acid in model food systems of reduced water activity: sugar solutions. *J. Food Sci.* 51, 1028-1031.
- Gerschenson, L.N., Alzamora, S.M. y Chirife, J., 1987. Effect of sodium chloride and glycerol on the stability of sorbic acid solutions at reduced water activity. *Lebens.- Wiss. u.-Technol.* 20, 98-100.
- Gerschenson, L.N. y Campos, C.A., 1995. Sorbic Acid Stability during processing and storage of high moisture foods. *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications*. Editorial: Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pennsylvania, Estados Unidos, 761-790.
- Gerschenson, L.N., Campos, C.A., Rojas, A.M. y Binstok, G., 2000. Chemical and physicochemical interactions between components and their influence on food stability. En: *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental aspects and applications*. Ed Alzamora, S.M., Tapia, M.S y López-Malo A., Aspen Publishers Inc., Maryland, Estados Unidos.
- Gill, A.O. y Holley, R.A., 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Res. Int.* 33, 83-90.
- Glass, K.A. y Johnson, E.A., 2004. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. *Food Microbiol.* 21, 675-682.
- Gledhill, B., 1998. Soups and saucery. *Food Manufacture* 4, 22-4.

- Gliemmo, M F. C. A. Campos y L. N. Gerschenson. 2001. Interaction between potassium sorbate and aspartame in aqueous model sugar systems. *J. Food Sci.*, 66 (3), 428-431.
- Gliemmo, M F, C A. Campos. and L N. Gerschenson. 2004. Effect of sweet and humectants on stability and antimicrobial activity of sorbates. *J. Food Sci.*, 69, (2). 39-44.
- Golden, D. A. y Beuchat, L. R., 1992. Interactive effects of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 524-530.
- Gooding, C, Melnick, D, Lawrence, R y Luckmann, H., 1955. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. IX Physico-chemical considerations in using sorbic acid to protect foods. *Food Res.*, 20,639-648.
- Gould, S., Woodford, A., Rappaport, H. y Goepfert, J.M., 1976. Factors affecting the behavior of salmonella and Staphylococci in meat salad. Annual Report 1976. Food Res. Inst., Madison, Wisc., Estados Unidos.
- Gould, G.W., 1992. Ecosystem approaches to food preservation. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 73, 58S-68S.
- Gould, G.W. (Ed.), 1995. *New Methods of Food Preservation*, Chapman and Hall, London, Inglaterra.
- Graham, A.F. y Lund, B.M., 1986. The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 39-49.
- Guerrero, S., Alzamora, S.M. y Gerschenson, L.N., 1990. Stability of sorbic acid in aqueous solutions of sodium chloride. *Lebens.- Wiss. u.-Technol.* 23, 271-273.
- Guerzoni, M. E., Gardini, F. y Duan, J., 1990. Interactions between inhibition factors on microbial stability of fruity-based systems. *Int. J. Food Microbiol.*, 10, 1-18.
- Hammes, W.P. y Vogel, R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*, p. 19-54. En: B.J.B. Wood y W.H. Holzappel, editores. *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Inglaterra.

- Hauben, K., Wuytack, E., Soontjens, C.C.F. y Michiels, C.W., 1996. High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer membrane permeability. *J. Food Prot.* 59, 350-355.
- Heintze, K., 1971. Stability of sorbic acid. *Lebens.- Wiss. u.-Technol.*, 4, 64-70.
- Helander, I.M., von Wright, A. y Mattila-Sandholm, 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 146-150.
- Henning, S., Metz, R. y Hammes, W.P., 1986a. New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 135-141.
- Henning, S., Metz, R. y Hammes, W.P., 1986b. Studies on the mode of action of nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 121-134.
- Hiemenz, P.C., 1986. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- Hills, B.P., Manning, C.E., Ridge, Y.P. y Brocklehurst, T.F., 1996. NMR water relaxation, water activity and bacterial survival in porous media. *J. Sci. Food Agric.* 71, 185-194.
- Hills, B.P., Manning, C.E., Ridge, Y.P. y Brocklehurst, T.F., 1997. Water availability and the survival of *Salmonella typhimurium* in porous systems. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 187-198.
- Holyoak, C.D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimmins, K., Brown, A.J.P. y Coote, P., 1996. Activity of the plasma-membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth in the presence of the weak acid preservative sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3158-3164.
- Hsiao, C.-P. y Siebert, K.J., 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 189-201.
- Huang, S.W., Hopia, A., Schwarz, F., Frankel, E. y German, J.B., 1996. Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs. oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 44, 444-452.
- Huhtanen, C. N. y Feinberg, J., 1980. Sorbic acid inhibition of *Clostridium botulinum* in nitrite-free poultry frankfurters. *J. Food Sci.* 45, 453.

- Hunt, J.A. y Dalgleish, D.G., 1994. Effect of pH on the stability and surface composition of emulsions made with whey protein isolate. *J. Food Sci.* 59, 2131.
- Hunt, J.A. y Dalgleish, D.G., 1995. Heat stability of oil-in-water emulsions containing milk proteins: Effect of ionic strength and pH. *J. Food Sci.* 60, 1120.
- Hurst, A., 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27, 85-123.
- Hurst, A. y Hoover, D.G., 1993. Nisin. En: Davidson, P.M., Branen, A.L., editores. *Antimicrobials in foods*. Marcel Dekker Inc., New York, Estados Unidos.
- Israelachvili, J.N. 1992. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London, Inglaterra.
- Ivey, F.J. y Robach, M. C. 1978. Effect of sorbic acid and sodium nitrite on *Clostridium botulinum* outgrowth and toxin production in canned comminuted pork. *J. Food Sci.* 43, 1782.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 836-840.
- Jarvis B. y Burke C.S., 1976. Practical and legislative aspects of the chemical preservation of food. Pp. 345-367. In: F.A. Skinner and W.B. Hugo (eds.) *Inhibition and inactivation of vegetative microbes*. Academic Press, New York, Estados Unidos.
- Jarvis, B., 1989. Statistical variation in relation to microbiological criteria for foods. In B. Jarvis. *Statistical aspects of the microbiological analysis of foods* (pp. 155-171). Elsevier. Amsterdam, Holanda.
- Jones, M.V., Anslow, P.A., Anderson, W.A., Cole, M.B. y Could, G.W., 1990. Food-preserving combination of lysozyme/nisin/citrate. Unilever, EP 90307694.1.
- Jung, G. y Sahl, H.-G., 1991. Nisin and novel antibiotics. ESCOM, Leiden, Bélgica.
- Jung D-S., Bodyfelt, F.W. y Daeschel, M.A., 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.* 75, 387-393.

- Juven, R., 1976. Bacterial spoilage of citric products of pH lower than 3,5. *J. Milk Food Technol.* 39, 819.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P. y Ray, B., 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combinations with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4174-4177.
- Khandelwal, G. D. y Wedzicha, B. L. 1990. Nucleophilic reactions of sorbic acid. *Food Add. Contam.* 7, 685.
- Kinderlerer, J. y Hatton, P., 1990. Fungal metabolites of sorbic acid. *Food Add. Contam.* 7, 657-669.
- Kitano, K., Fukukawa, T., Ohtsuji, Y., Masuda, T. y Yamaguchi, H., 2002. Mutagenicity and DNA-damaging activity caused by decomposed products of potassium sorbate reacting with ascorbic acid in the presence of Fe salt. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1589-1594.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-85.
- Klose, R.E. y Glicksman, M., 1972. Gums. En: *Handbook of Food Additives*. Ed. T.E. Furia, CRC Press, Cleveland, Ohio, Estados Unidos.
- Koch, A.L., 1981. Growth measurement. En: P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow *et al.* (editores). *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC., Estados Unidos. 179-207.
- Kordel, M. y Sahl, H.-G., 1986. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.* 34, 139-144.
- Krebs, H.A., Wiggins, D., Sole, S. y Bedoya F., 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.* 214, 657-663.
- Kuipers, O.P., Bierbaum, G., Ottenwalder, B., Dodd, H.M., Horn, N., Metzger, J., Kupke, T., Gnau, V., Bongers, R., van den Bogaard, P., Kosters, H., Rollema, H.S., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Jung, G., Götz, F., Sahl, H.,-G. y Gasson, M., 1996. Protein engineering of lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 161-170.

- Kurtzman, C.P., Rogers, P.R. y Hesseltine C.W., 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. *Appl. Microbiol.* 21, 870-874.
- Kurup, T.R.R., Wan, L.S.C. y Chan, L.W., 1991a. Effects of surfactants on the antibacterial activity of preservatives. *Pharm. Acta Helv.* 66, 9-10, 274-280.
- Kurup, T.R.R., Wan, L.S.C. y Chan, L.W., 1991b. Availability and activity of preservatives in emulsified systems. *Pharm. Acta Helv.* 66, 3, 76-82.
- Kwon, B.D., Foss, P.A. y Rha, C.H.K., 1987. Rheological characterization of high viscosity polysaccharides. En: *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. Ed. Yalpani, M. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda, 223-266.
- Labuza T.P. y Stalmarch, M., 1980. The non-enzimatic browning reactions affected by water in foods. En: *Properties of water related to food quality and stability*. Ed. L.B. Rockland y G.F. Steward. Academic Press, San Francisco, CA. Estados Unidos.
- Labuza, T.P. y Riboh, D., 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technol.* 36, 66-72.
- Lakamraju, M., McGuire, J. y Daeschel, M., 1996. Nisin adsorption and exchange with selected milk proteins and silanized silica surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 178, 495-504.
- Lambert, R.J. y Stratford, M., 1999. Weak-acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.* 86, 157-164.
- Lazdunski, C.J., 1988. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie* 70, 1291-1296.
- Leistner, L., 1995. Principles and applications of hurdle technology. En: Gould, G.W. (Ed.), *New Methods for Food Preservation*, Blackie Academic and Professional, London, Inglaterra, 1-21.
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181-186.

- Lenovich, L. M., Buchanan, R. L., Worley, N. J. y Restaino, L., 1988. Effect of solute type on sorbate resistance in *Zygosaccharomyces rouxii*. J. Food Sci. 53, 3, 914-916.
- Liewen, M. B. y Marth, E. H., 1985. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: A review. J. Food Prot., 48, 364.
- Lindsay, R.C., 1993. Aditivos alimentarios. En: Química de los Alimentos. Ed. O.R. Fennema. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Liu, W. y Hansen, J.N., 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2551-2558.
- Lodder, J.C.E.D., 1970. *The Yeasts. A taxonomic study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, Holanda.
- López-Malo A. y Palou E., 2000. Modelling the growth/no-growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in mango puree. J. Food Sci. 65 (3), 516-520.
- Lubieniecka-von Shelhorn, M., 1967, a. Distribution of preservatives between fat and water. I. Physical-chemical studies. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 131, 329-332.
- Lubieniecka-von Shelhorn, M., 1967, b. Distribution of preservatives between fat and water. II. Relation between physical-chemical distribution and antimicrobial effectiveness of preservatives in fat-containing foods. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 133, 227-230.
- Lück, E., 1993. Sorbic Acid. En: *Ulmans Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A24, 5ª edición. VCH Publishers, Weinheim, Alemania, 507-513.
- Lück, E. y Jager, M., 2000. Ácido Sórbico. En: *Conservación Química de los Alimentos. Características, usos, efectos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Lynch, M.J. y Griffin, W.C., 1974. Food emulsions. En: *Emulsions and emulsion technology*, Part I. Ed. K. Lissant. Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- Mahoney, J.R. y Graf, E., 1986. Role of α tocoferol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model systems. J. Food Sci. 51, 1293-1296.

- Mahungu, S.M. y Artz, W.E., 2001. Emulsifiers. En: Food Additives, 2nd. Edition. Ed. Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. y Thorngate III, J.H. Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- Makdesi, A. K. y Beuchat, L., 1996. Evaluation of media for enumerating heat-stressed benzoate-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. Int. J. Food Microbiol. 33, 169-181.
- Mari, E., 2002. Migración en envases de vidrio y cerámica esmaltada. En: *Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos*. Eds. Catalá, R. y Gavara R. CyTED y IATA. Valencia, España, 329-346.
- Marquis, R.E., Sim, J., Shin, S.Y., 1994. Molecular mechanisms of resistance to heat and oxidative damage. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 76, 40S-48S.
- Marth, E.H., Capp, C.M., Hasenzahl, L., Jackson, J.W. y Hussong, R.V., 1966. degradation of potassium sorbate by *Penicillium* species. J. Dairy Sci. 49, 1197-1-05.
- Martoadiprawito, W. y Whitaker, J.R., 1963. Potassium sorbate inhibition of yeast alcohol dehydrogenase. Biochem. Biophys. Acta 77, 536-544.
- Mattila, T. y Frost, A.J., 1988. The growth of potential food poisoning organisms on chicken and pork muscles surfaces. J. Appl. Bacteriol. 65, 455-461.
- Mazzotta, A.S. y Montville, T.J., 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin resistant strains at 10°C and 30°C. J. Appl. Microbiol. 82, 32-38.
- McAuliffe, O., Ross, R.p. y Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbial Rev. 25, 285-308.
- McLay, J.C., Kennedy, M.J., O'Rourke, A.-L., Elliot, R.M. y Simmonds, R.S., 2002. Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. Int.J. Food Microbiol. 73, 1-9.
- Meghrou, J., Lacroix, C. y Simard, R.E., 1999. The effects on vegetative cells and spores of 3 bacteriocins from lactic acid bacteria. Food Microbiol. 16, 105-114.

- Meyer R.S., Grant M.A., Luedecke L.O. y Leung H.K., 1989. Effects of pH and water activity on microbiological stability of salad dressing. *J. Food Prot.* 52, 477-479.
- Ming, X. y Daeschel, M.A., 1995. Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 58, 416-420.
- Mc Clements, D.J., 1999. Emulsion Stability. En: *Food Emulsions. Principles, Practice, and Technics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- Morris, S.L., Walsh, R.C. y Hansen, J.N., 1984. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *J. Biol. Chem.* 201, 581-584.
- Multon, J.L., 1988. *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*. Ed. S.A., Zaragoza, España.
- Murray, M. y Richard, J.A., 1997. Comparative study of antilisterial activity of nisin A and pediocin Ach in fresh ground pork stored aerobically at 5°C. *J. Food Prot.* 60, 1534-1540.
- Myers, D., 1988. *Surfactant Science Technology*. VCH Publishers, Weinheim. Alemania.
- Naidu, A.S., 2001. Immobilized lactoferrinantimicrobial agents and use. U.S. patent 6.172.040 BI.
- Naidu, A.S., 2002. Activated lactoferrin- a new approach to meat safety. *Food Technol.* 56, 40-45.
- Namiki, M., Qsawa, T., Kada, T., Tsuju, K. y Namiki, K. 1983. Formation of C-nitro and C-nitroso mutagens by the reaction of nitrite with sorbic acid and its analogues and their inactivation with foods constituents. *Carcinogens Mutagens Environ.* 3, 109.
- Obanu, Z.A. y Ledward, D.A., 1986. Reactivity of sorbate and glycerol in some model intermediate moisture systems. *Food Chem.* 21, 57-75.
- Ojcius, D.M. y Young, J.D., 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motive? *TIBS* 16, 225-229.

- Oka, S., Studies on transfer of antiseptics to microbes and their toxic effect. I. Accumulation of acid antiseptics in yeast cells. Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn. 24, 69-74.
- Parente, E., Giglio, M.A., Ricciardi, A. y Clementi, F., 1998. The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. Int. J. Food Microbiol. 40, 65-75.
- Park, H. S., Marth, E. H. y Olson, N. F., 1970. Survival of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. J. Milk Food Technol. 35, 532-539.
- Parker A., Gunning P.A., Ng K. y Robins M.M., 1995. How does xanthan stabilise salad dressing? Food Hydrocol. 9, 4, 333-342.
- Parker M.L., Brocklehurst, T.F., Gunning P.A., Coleman, H.P. y Robins M.M., 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I-Methods for investigating the form of growth of bacteria in model oil-in-water emulsions and dairy cream. J. Applied Bacteriol. 78, 601-608.
- Peck, M.W., 1997. *Clostridium botulinum* and the safety of refrigerated processed foods of extended durability. Trends Food Sci. Technol. 8, 186-192.
- Pederson, M., Albury, N. y Christiansen, M. D., 1961. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. IV. Fungistatic effects of organic acids. Appl. Microbiol. 9, 162-167.
- Pekkarinen, L. y Porkka, P., 1967. The effects of salts of heavy metals on the stability of sorbic acid in oxygenated dilute sulphuric acid solutions. Suomen Kemistilehti B 40, 54-58.
- Pekkarinen, L. 1969. The mechanism of oxidation of sorbic acid by molecular oxygen in water. Suomen Kemistilehti. 42, 147-152.
- Pethybridge, A. D., Ison, R. W. y Harrigan, W. F., 1983. Dissociation constant of sorbic acid in water and water-glycerol mixtures at 25°C from conductance measurements. J. Food Technol., 18, 789-796.
- Piper, P., Mahe, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Muhlbauer, M., Coote, P. y Kuchler, K., 1998. The Pdr12 ATP-binding cassette ABC is required for the development of weak acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 17, 4257-4265.

- Pitt, J.J., 1974. Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. *Food Technol. Austr.* 26, 238-241.
- Pourkomialian, B., 2000. Sauces and Dressings. En: *The stability and shelf-life of food*. Ed. David Kilcast y Persis Subramanian. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos, y Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, Inglaterra.
- Praphailong, W. y Fleet, G.H., 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiol.* 14, 459-468.
- Pszczola, D.E., 2001. Salad Days? Not for these dressings. *Food Technol.* 55, 4, 78-84.
- Radler, F., 1976. D egradation de l'acide sorbique par les bact eries. *Bull OIV* 49, 629-635.
- Ray, B. y Daeschel, M.A., 1992. *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, CRC Press, Boca Raton, Fl., Estados Unidos.
- Ray, B., 1993. Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. *ASM News* 59, 285-291.
- Rawle, A., 2003. *Basic Principles of Particle Size Analyses*. Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Inglaterra.
- Restaino, L., Lenovich, L. M. y Bills, S., 1982. Effects of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food Prot.*, 45, 1138-1143.
- Robach, M.C. y Stateler, C.L., 1980. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by potassium sorbate in combination with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole or ethylenediamine tetracetic acid. *J. Food Prot.* 43, 208-213.
- Roberts, T. A., Gibson, A. M. y Robinson, A., 1982. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. III. The effect of potassium sorbate. *J. Food Technol.* 17, 307-311.
- Robins, M.M. y Wilson, P.D.G., 1994. Food structure and microbial growth. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 289-293.

- Robins, M.M., Brocklehurst, T.F. y Wilson, P.D.G., 1994. Food structure and the growth of pathogenic bacteria. *Food Technol. Int. Europe*, 31-36.
- Robins, M.M., 2000. Emulsions - creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid and Interface Sci.* 7, 419-425.
- Robinson, D., 1995. *Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Russel, A.D., 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 191-201.
- Russel, N.J. y Gould, G.W., 1991. Factors affecting growth and survival. En: *Food Preservatives*. Ed. N.J. Russel y G.W. Gould. Blackie, Glasgow y Londres, Reino Unido.
- Rymon Lipinski G-W von, Lück, E., Oeser, H. y Lömker, F., 1975. Entstehung und Ursachen des "Geranientons". *Mitt Rebe, Wein, Obstbau Früchteverwert* 25, 387-394.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G. y Booth, I.R., 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 2845-2850.
- Schellekens, M., 1996. New research in sous-vide cooking. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 256-262.
- Schved, F., Henis, Y. y Juven, B.J., 1996. Sensitization of *Escherichia coli* to nisin by maltol and ethyl maltol. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 189-191.
- Segura, A., Moreno, M., Madueno, F., Molina, A. y García-Olmedo, F., 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 12, 16-23.
- Seow, C.C. y Cheah, P.B., 1985 a. Kinetics of degradation of sorbic acid in aqueous glycerol solutions. *Food Chem.* 17, 95-103.
- Seow, C.C. y Cheah, P.B., 1985 b. Reactivity of sorbic acid and glycerol in nonenzymatic browning in liquid intermediate moisture model systems. *Food Chem.* 18, 71-80.

- Seward, R. A., Deibel, R. H. y Lindsay, R. C., 1982. Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores in microcultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1212-1217.
- Sheldrake, P., 2003. Controlling textures in soups, sauces and dressings. En: *Texture in Food. Volume 1: Semi-Solid Foods*. Ed. B. M. McKenna. Woodhead Publishing, Cambridge, Inglaterra.
- Shibasaki, I. y Kato, N., 1978. Combined effects of antibacterial activity of fatty-acids and their esters against gram-negative bacteria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55, A235.
- Shimizu, M., 1995. Structure of proteins adsorbed at an emulsified oil surface. En: *Food Macromolecules and Colloids*. E. Dickinson y D. Lorient Eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra, 34-42.
- Shtenberg, A.J. e Ignatev, A.D., 1970. Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Food Cosmet. Toxicol.* 8, 369-380.
- Skoog, D.A., West, D.M. y Holler, F.J., 1996. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7a. Edición. Saunders, Philadelphia, Estados Unidos.
- Smittle, R.B., 1977. Microbiology of mayonnaise and salad dressing: A review. *J. Food Prot.* 40, 415-421.
- Smittle, R.B. y Flowers R.S., 1982. Acid tolerant microorganisms involved in the spoilage of salad dressings. *J. Food Prot.* 45 (10), 977-983.
- Smittle, R.B., 1987. The microbiology of dressings and sauces. Presented at Microbiology Quality Assurance Seminar, Sept. 1987. Assn. for Dressings and Sauces, Atlanta, Ga., Estados Unidos.
- Smittle, R.B. y Cirigliano M.C., 1994. Salad Dressings. Pág. 53. En: Vanderzant C. y Splittstoesser D.F. (ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3ra. Ed., New York, Estados Unidos.
- Smittle, R.B., 2000. Microbial safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the United States: A review. *J. Food Prot.* 63 (8), 1144-1158.

- Smoot, L. A. y Pierson, M. D., 1981. Mechanisms of sorbate inhibition of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spore germination. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 477-484.
- Sofos, J.N. y Busta, F.F., 1981. Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Prot.* 44, 614-622.
- Sofos, J.N. y Busta, F.F., 1983. Sorbates. En: *Antimicrobials in Food*. Branen, A.L. y Davidson, P.M. Eds., Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- Sofos, J.N., Pierson, M.D., Blocher, J.C. y Busta, F.F., 1986. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 1-7.
- Sofos, J.N., 1989. *Sorbate Food Preservatives*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Estados Unidos.
- Sofos, J.N., 1992. Sorbic acid, mode of action. En: *Encyclopedia of microbiology*. J. Lederberg (ed). Academic Press, New York, Estados Unidos.
- Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davidson, P.M. y Johnson, E.A., 1998. Naturally occurring antimicrobials in food. Task Force Report No. 132. Council For Agricultural Science and Technology, Ames, IA. 103 pp.
- Sofos, J N. 2000. Sorbic acid, Capítulo 23. En: *Natural Food Antimicrobials system*. Ed por A S. Naidu. CRC press, Boca Raton, Estados Unidos.
- Stamp, J.A. y Labuza T.P., 1983. Kinetics of the Maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperature. *J. Food Sci.* 48, 543-547.
- Statgraphics Plus 4,0. 1994. Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, Estados Unidos.
- Steinbach, K.J. y Franzke, C., 1963 Effects of antioxidants and sorbic acid on autooxidation. *Chem. Abstr.*, 59, 4479-4483.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. y Klaenhammer, T.R., 1991. Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3613-3615.
- Stiles, M.E. y Hastings, J.W., 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Food Sci. Technol.* 2, 235-263.

- Stratford, M. y Rose, A.H., 1986. Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 132, 1-6.
- Stratford, M. y Anslow, P.A., 1998. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "weak acid" preservative. Lett. Appl. Microbiol. 27, 203-206.
- Sugihara, N., Shimomichi, K. y Furuno, K., 1997. Cytotoxicity of food preservatives in cultured rat hepatocytes loaded with linolenic acid. Toxicol. 120, 29-36.
- Svorcova, L., 1980. Effect of ascorbic acid, potassium sorbate and the pH on nonsporulating bacteria in nonalcoholic beverages. Chem. Abs., 92, 4825.
- Swaigood, H.E., 1996. *Características de la leche*, en Química de los Alimentos, 3ra. Edición. Fennema, G.R., Ed. Marcel Dekker, New York, Estados Unidos.
- Tapia, M.S., Elguezabal, L.G. y Díaz, R.V., 1994. Ecología microbiana de alimentos conservados por métodos combinados. En: Aplicación de factores combinados en la conservación de alimentos. Ed.: Fito, P., Andrés, A., Chiralt, A. Universidad Politécnica de Valencia, Servicio de publicaciones. Valencia, España.
- ter Steeg, P.F., 1993. Interacties tussen nisine, lysozym en citraat in bioconservering. De Ware(n) Chemicus 23, 183-190.
- ter Steeg, P., Hellemons, J.C. y Kok, A.E., 1999. Synergistic actions of nisin, sublethal ultrahigh pressure, and reduced temperature on bacteria and yeast. Appl. Environ. Microbiol. 65 (9), 4148-4154.
- Thakur, B.R. y Arya, S.S., 1991. Role of sorbic acid in non-enzymatic browning in liquid and solid model food systems. Int. J. Food Sci. Technol. 26, 157-164.
- Thakur, B.R., Singh, R.K. y Arya, S.S., 1994. Chemistry of sorbates – A basic perspective. Food Reviews Int. 10 (1), 71-91.
- The Association for Dressings and Sauces (2006). Disponible en: <http://www.dressings-sauces.org/>
- Thevelein, J.M., 1994. Signal transduction in yeast. Yeast 10, 1753-1790.

- Thomas D.S. y Davenport, R.R., 1985. *Zygosaccharomyces bailii* – a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol.* 2, 157-169.
- Treiner, C. 1982. A generalized Setchenov Approach to the Effect of Polar Additives on Ionic Micellar Solutions. *J. Colloid and Interface Sc.*, 90, 2, 444-453.
- Troller, J.A. y Christian, J.H.B., 1978. *Water activity and food*. Academic Press, New York, Estados Unidos.
- van Kraaij, C., de Vos, W.M., Siezen, R.J. y Kuipers, O.P., 1999. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* 16, 575-587.
- Veiga, A. y Madeira-Lopes, A., 2000. Effects of weak acid preservatives on the growth and thermal death of the yeast *Pichia membranifaciens* in a commercial apple juice. *Int. J. Food Microbiology*, 56, 145-151.
- Vidyasagar, K. y Arya, S.S., 1983. Stability of sorbic acid in orange squash. *J. Agric. Food Chem.* 31, 1262-1264.
- Vidyasagar, K. y Arya, S.S., 1984. Degradation of sorbic acid in fruit squashes and fish paste. *J. Food Technol.* 19, 447-454.
- Waginaire, L. 1997. Place of lipids as emulsifiers in the future. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 44, 271.
- Wallhäußer, K.H. y Lück, E., 1970. Der Einfluß der Sorbinsäure auf mycotoxinbildende Pilze in Lebensmitteln. *Dtsch Lebensm Rundsch* 66, 88-92.
- Wan L.S.C., Kurup T.R.R., y Chan L.W. 1986. Partition of preservatives in oil/water systems. *Pharm. Acta Helv.*, 61, 10-11, 308-313.
- Warth, A.D., 1977. Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic acid, sorbic acid and other weak acids used as food preservatives. *J.Appl.Bacteriol.* 43,215-230.
- Warth, A.D., 1989. Relationships among cell size, membrane permeability, and preservative resistance in yeast species. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2995-2999.

Wedzicha, B.L., Zeb, A. y Ahmed, S. 1988. Distribution of low-molecular weight food additives in dispersed systems. En: *Advances in Food Emulsions*. Eds.: Dickinson, E. y Stainsby, G., Elsevier, Londres, Inglaterra.

Wedzicha, B. L. y Zeb, A., 1990. Catalysis of the reaction between sorbic acid and thiols by surfactants. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25, 168-173.

Wedzicha, B.L., Ahmed, S. y Zeb, A., 1990. Effect of surfactants and dispersed components on the activity and reactivity of sorbic acid. *Food Additives and Contaminants* 7, 5, 695-709.

Wedzicha, B. L. y Zeb, A., 1991. Catalysis of the sorbic acid – thiol reaction by bovine serum albumin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 26, 381-390.

Wedzicha, B.L., Zeb, A. y Ahmed, S. 1991. Reactivity of food preservatives in dispersed systems. En: *Food Polymers, Gels and Colloids*. Ed.: Dickinson, E. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.

Wedzicha, B.L. y Ahmed, S., 1994. Distribution of benzoic acid in an emulsion. *Food Chem.* 50, 9-11.

Wedzicha, B.L. y Couet, C., 1996. Kinetics of transport of benzoic acid in emulsions. *Food Chem.* 55, 1, 1-6.

Wendin, K. y Gunnar, H., 2001. Influences of fat, thickener and emulsifier contents on salad dressings: static and dynamic sensory and rheological analyses. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 34: 222-233.

WHO (World Health Organization), 1969. Specifications for identity and purity of some antibiotics. *World Health Organization/Food Add*, 69, 34, 53-67.

Williams, O.B. y Mrak, E.M., 1949. An interesting outbreak of yeast spoilage in salad dressing. *Fruit Prod. J.* 28, 141.

Wilson, P.D.G., Wilson, D.R. y Waspe, C.R., 2000. Weak acids: dissociation in complex buffering systems and partitioning into oils. *J.Sci. Food Agric.*, 80, 471-476.

Wilson, P.D.G., Brocklehurst, T.F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J.W.T. y Van Impe, J.F., 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 275-289.

Wimpenny, J.W.T., Leistner, L., Thomas, L.V., Mitchell, A.J., Katsaras, K. y Peetz, P., 1995. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *Int.J. Food Microbiol.* 28, 299-315.

Wind, C.E. y Restaino, L., 1995. Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *J. Food Prot.* 58, 11, 1257-1259.

Worrel, L., 1951. Flavors, spices, condiments. En: *The chemistry and technology of food and food products*, vol.2. Ed. MB. Jacobs. Interscience Publ. New York, Estados Unidos.

Xiong, R., Xie, G., Edmonson, A.S., Linton, R.H. y Sheard, M.A., 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modeling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiol.*, 16, 269-279.

York, G.H. y Vaughn, R.H., 1964. Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid. *J. Bacteriol.* 88, 411-417.

Zapico, P., de Paz, M., Medina, M. y Núñez, M., 1999. The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 151-157.

Zielinski, R.J., 1997. Synthesis and composition of food-grade emulsifiers. En: *Food Emulsifiers and Their Applications*. Eds.: Hasenhuettl, G.L. y Hartel, R.W. Chapman y Hall, New York, Estados Unidos.