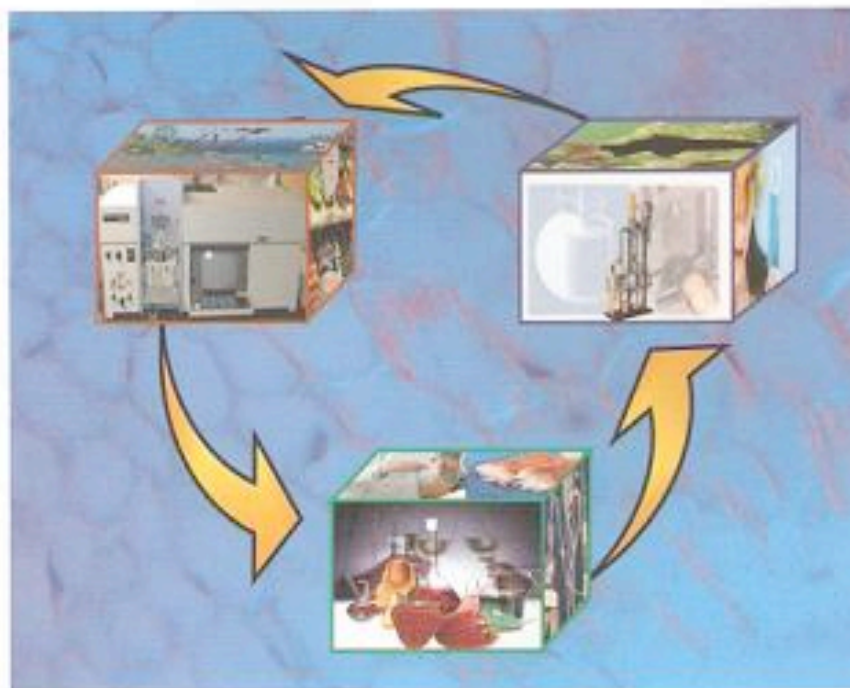


# NUEVAS PERSPECTIVAS SOBRE INOCUIDAD ALIMENTARIA

ROCÍO M. URESTI MARÍN  
JOSÉ ALBERTO RAMÍREZ DE LEÓN  
MANUEL VÁZQUEZ VÁZQUEZ



# **NUEVAS PERSPECTIVAS SOBRE INOCUIDAD ALIMENTARIA**

# NUEVAS PERSPECTIVAS SOBRE INOCUIDAD ALIMENTARIA



**NUEVAS PERSPECTIVAS  
SOBRE INOCUIDAD ALIMENTARIA**

**Editores**

**Jose Alberto Ramírez de León  
Manuel Vázquez Vázquez  
Rocio Margarita Uresti Marín**

Copyright © 2007  
(México)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TAMAULIPAS  
CUERPO ACADÉMICO DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN  
SOCIEDAD MEXICANA DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

<http://www.plazayvaldes.com>  
<http://mcta.uat.edu.mx>

ISBN: 978-970-722-783-5

## Presentación

Los Miembros de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos (SOMENTA) reconocemos la importancia que representa la Inocuidad Alimentaria. La OMS estima que en los países en desarrollo casi dos millones de niños mueren anualmente de diarrea causada sobre todo por consumo de alimentos y agua infectados, mientras que en los países industrializados hasta un tercio de la población padece enfermedades de origen alimentario cada año.

Tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo, los sistemas de inocuidad de los alimentos afrontan desafíos inéditos que surgen de la acelerada urbanización, la globalización del comercio de alimentos, el cambio en los hábitos de consumo y las técnicas más intensivas de producción de alimentos. Para asegurar que un alimento sea Inocuo es necesario detectar alguna contaminación en toda la cadena de producción, incluidos los piensos, los tratamientos químicos en las fases de producción y poscosecha, e incluso la tierra o el agua con que se obtiene dicho alimento." Para reducir los riesgos alimentarios se necesitan sistemas jurídicos, técnicos y administrativos eficaces. Hasta ahora, la inocuidad de los alimentos depende de la aplicación de medidas como retirar del mercado alimentos nocivos "después de los hechos", en vez de prevenir que surjan problemas de inocuidad de los alimentos a través de actividades concertadas. "El resultado de ello es que la orientación de muchos sistemas de reglamentación de la inocuidad de los alimentos ha tendido a ser una reacción a las circunstancias y a regirse por criterios de aplicación, en lugar de recurrir a un método preventivo para evaluar y reducir los riesgos."

La INOCUIDAD ALIMENTARIA preocupa por igual a los consumidores, los agricultores, los pescadores, la industria alimentaria, la industria restaurantera, áreas de salud, los gobiernos y toda empresa que tenga algún nexo con los alimentos.

Esperamos que este libro sobre Nuevas Perspectivas sobre Inocuidad Alimentaria sea útil para estudiantes de Areas de Alimentos y Nutrición, tanto para nivel Licenciatura y Posgrado.

Dra. Rocío Uresti  
Editora

---

### RELACIÓN DE AUTORES

---

---

**A. ANADON NAVARRO**

Dpto. de Toxicología y Farmacología  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
España

**A. GONZÁLEZ MURILLO**

Instituto Tecnológico del Mar de  
Mazatlán  
México

**A. SANCHES-SILVA**

Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Santiago de Compostela,  
España

**A. TORRADO AGRASAR**

Área de Bioquímica  
Departamento de Bioquímica, Genética e  
Inmunología  
Facultade de Ciencias de Ourense.  
Universidad de Vigo.  
España

**B. CANCHO GRANDE**

Área de Nutrición y Bromatología,  
Departamento de Química Analítica y  
Alimentaria,  
Facultad de Ciencias de Ourense  
Universidad de Vigo.  
España

**C. LOPEZ MACÍAS**

Área de Bioquímica  
Departamento de Bioquímica, Genética e  
Inmunología  
Facultad de Ciencias de Ourense.  
Universidad de Vigo.  
España

**D. PAREDES**

Food Process Engineering Group  
Oregon State University

USA

**E. MORALES-BLANCAS**

Instituto de Ciencia y Tecnología de  
Alimentos  
Universidad Austral de Chile  
Chile

**G. BARBA QUINTERO**

Instituto Tecnológico del Mar de  
Mazatlán,  
Instituto Tecnológico de Durango  
México

**G. H. FLORES-GUTIÉRREZ**

Dpto. de Biología Molecular  
Universidad Autónoma de Tamaulipas  
U.A.M. Reynosa-Aztlán  
México

**G. VELÁZQUEZ DE LA CRUZ**

Dpto. de Ciencia y Tecnología de  
Alimentos  
Universidad Autónoma de Tamaulipas  
U.A.M. Reynosa-Aztlán  
México

**J. A. CORTÉS RUIZ**

Instituto Tecnológico del Mar de  
Mazatlán  
México

**J. A. GALLEGOS INFANTE**

Depto. De Bioquímica  
Instituto Tecnológico de Durango  
México

**J. A. RAMÍREZ DE LEÓN**

Dpto. de Ciencia y Tecnología de  
Alimentos  
Universidad Autónoma de Tamaulipas  
U.A.M. Reynosa-Aztlán  
México

**J. SIMÁL GANDARA**

Área de Nutrición y Bromatología,  
Departamento de Química Analítica y  
Alimentaria,  
Facultad de Ciencias de Ourense  
Universidad de Vigo, España

**J. L. SILVA**

Department of Food Science, Nutrition,  
and Health Promotion  
Mississippi State University  
USA

**J. A. TORRES**

Department of Food Science &  
Technology  
Oregon State University  
USA

**L. M. PASTRANA CASTRO**

Área de Bioquímica  
Departamento de Bioquímica, Genética e  
Inmunología  
Facultad de Ciencias de Ourense.  
Universidad de Vigo, España

**M. O. PUNÍN CRESPO**

Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Santiago de Compostela  
España

**M. VÁZQUEZ VAZQUEZ**

Área de Tecnología de los Alimentos  
Dpto. de Química Analítica  
Universidad de Santiago de Compostela  
España

**N. PEREZ GUERRA**

Área de Bioquímica  
Departamento de Bioquímica, Genética e  
Inmunología  
Facultad de Ciencias de Ourense.  
Universidad de Vigo  
España

**P. PASEIRO LOSADA**

Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Santiago de Compostela,  
España

**P. VÁZQUEZ LANDAVERDE**

Department of Food Science &  
Technology,  
Oregon State University.  
USA

**S. ROBERTS**

Department of Food Science, Nutrition,  
and Health Promotion  
Mississippi State University  
USA

**R. DÍAZ SOBAC**

Instituto de Ciencias Básicas  
Facultad de Química Fármaco Biológica  
Universidad Veracruzana.  
México

**R. I. ACOSTA-GONZÁLEZ**

Dpto. de Análisis Clínicos  
Universidad Autónoma de Tamaulipas  
U.A.M. Reynosa-Aztlán  
México

**R. M. URESTI MARIN**

Departamento de Seguridad Alimentaria  
del Medio Ambiente  
UAM Reynosa-Aztlán  
Universidad Autónoma de Tamaulipas  
México

**R. SENDÓN-GARCÍA**

Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Santiago de Compostela,  
España

**R. RIAL OTERO**  
Área de Nutrición y Bromatología,  
Departamento de Química Analítica y  
Alimentaria,  
Facultad de Ciencias de Ourense  
Universidad de Vigo.  
España

**V. PECINA QUINTERO**  
Investigador de Biotecnología  
Campo Experimental Río Bravo  
INIFAP  
México

National Center for Electron Beam Food  
Research  
Texas A&M University  
USA

**T. KIM**  
Department of Food Science, Nutrition,  
and Health Promotion  
Mississippi State University  
United States

**PILLAI SURESH D.**

---

---

---

**ÍNDICE**

---

**NUEVAS PERSPECTIVAS SOBRE INOCUIDAD ALIMENTARIA**

**8**



<b>Introducción</b>	<b>12</b>
<b>Capítulo 1</b>	<b>14</b>
<b>Evaluación del Riesgo de Agentes Químicos en los Alimentos</b> <i>Risk Assessment of Chemical Agents in Foods</i> Anadón Navarro Arturo Universidad Complutense de Madrid (España)	
<b>Capítulo 2</b>	<b>31</b>
<b>Desarrollo de Métodos para Estudiar las Implicaciones Alimentarias y Agroambientales de Fungicidas en Viñedo</b> <i>Development of Methods to Study the Food and Agriculture Effects of Fungicides in Vineyards</i> Rial Otero R., Cancho Grande B., Simál Gándara J Universidad de Vigo (España)	
<b>Capítulo 3</b>	<b>64</b>
<b>Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs) en la Cadena Alimentaria</b> <i>Persistent organic pollutants (POPs) in the food chain</i> Uresti Marín, Rocío M.*; Punín C. María ; Ramírez de León, José A. Universidad Autónoma de Tamaulipas (México) y Universidad de Santiago de Compostela (España)	
<b>Capítulo 4</b>	<b>108</b>
<b>Microbiología de la Irradiación de Alimentos</b> <i>Microbiology of food irradiation</i> Pillai Suresh D. Texas A&M University (USA)	
<b>Capítulo 5</b>	<b>119</b>
<b>Alimentos Transgénicos</b> <i>Transgenic foods</i> Pecina Quintero Víctor INIFAP (México)	
<b>Capítulo 6</b>	<b>136</b>
<b>Producción de Probióticos y Bacteriocinas a partir de</b>	

<p><b>Subproductos de la Industria Alimentaria</b>  <i>Production of probiotics and bacteriocins from by-products of the food industry</i>  Pastrana Castro Lorenzo M., Pérez Guerra Nelson, López Macías Cristina, Torrado Agrasar Ana.  Universidad de Vigo (España)</p>	
<p><b>Capítulo 7</b>  <b>Materiales Plásticos en contacto con Alimentos: Desarrollo de Métodos Analíticos y Estudios de Cinética de Migración</b>  <i>Food contact plastic materials: development of analytical methods and study of migration kinetics</i>  Sanchez-Silva Ana Teresa; Sendón-García Raquel; Paseiro L. Perfecto  Universidad de Santiago de Compostela (España)</p>	205
<p><b>Capítulo 8</b>  <b>Impacto de la Ley de Bioterrorismo en la Producción y Procesamiento de los Alimentos: Historia, Normativas y Plan de Seguridad</b>  <i>Impact of bioterrorism regulation in food production and processing: history, regulations and food security plan</i>  Juan L. Silva; T. Kim; S. Roberts  Mississippi State University (USA)</p>	220
<p><b>Capítulo 9</b>  <b>Conservación y valorización de alimentos de origen marino</b>  <i>Preservation and valorization of marine food</i>  Ramírez de León Jose Alberto y Vázquez Vázquez Manuel  Universidad Autónoma de Tamaulipas (México) y  Universidad de Santiago de Compostela (España)</p>	231
<p><b>Capítulo 10</b>  <b>Altas Presiones en la Industria Alimentaria: Consideraciones Comerciales en el procesamiento de Alimentos por Alta Presión</b>  <i>High pressure in the food industry: Commercial concerns in the food high-pressure processing</i></p>	240

Velazquez Gonzalo, Vázquez Pedro y Torres J. Antonio Oregon State University (USA)	
<b>Capítulo 11</b> <b>Altas Presiones en la Industria Alimentaria: Retos Actuales de Investigación en el Procesado de Alimentos por Alta Presión</b> Velazquez Gonzalo, Vázquez Pedro y Torres J. Antonio <i>High pressure in the food industry: Current challenge of research in</i> Oregon State University (USA)	<b>263</b>
<b>Capítulo 12</b> <b>Crecimiento Microbiano en Alimentos Refrigerados</b> <i>Microbial growth in refrigerated foods</i> Paredes Daniel, Morales-Blancas Elton, Kong Shun Ah-Hen, Velásquez Gonzalo, Torres J. Antonio Oregon State University (USA)	<b>295</b>
<b>Capítulo 13</b> <b>Brotos De Enfermedades Transmitidas Por Alimentos</b> Acosta-González Rosa Issel y Flores-Gutiérrez Gerardo H. Universidad Autónoma de Tamaulipas (México)	<b>313</b>
<b>Capítulo 14</b> <b>Características Físicoquímicas Y Microbiológicas de la Salmuera de Congelación Utilizada en Barcos Atuneros del Pacífico Mexicano</b> Ramírez de León José Alberto, Barba Quintero Guillermo, González Murillo Alfredo, Cortes Ruiz Juan Antonio, Gallegos Infante José Alberto Universidad Autónoma de Tamaulipas (México) Instituto Tecnológico del Mar de Mazatlán (México) Instituto Tecnológico de Durango (México)	<b>334</b>
<b>Capítulo 15</b> <b>Las Buenas Prácticas Agrícolas y su Impacto en la Seguridad</b>	<b>350</b>

<b>de Frutas Frescas.</b> Díaz Sobac José Rafael Instituto de Ciencias Básicas/Facultad de QFB Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz (México)	
--	--

---

## INTRODUCCIÓN

---

En los últimos años en muchos países, incluyendo México, se ha registrado un aumento significativo en la incidencia de enfermedades causadas por alimentos contaminados. Esto se debe principalmente al uso deliberado de aditivos, micronutrientes, plaguicidas y medicamentos veterinarios durante la producción y distribución de alimentos, para garantizar la inocuidad de los alimentos.

Muchos compuestos químicos utilizados tradicionalmente para la conservación de los alimentos han sido prohibidos actualmente; otros compuestos están siendo estudiados o se encuentran en constante proceso de reevaluación para reducir los niveles de exposición a su riesgo potencial sobre los seres humanos y sobre el medio ambiente.

En la actualidad la incorporación de compuestos químicos en los alimentos, además de la conservación, tiene como objetivo mejorar el valor nutritivo (albúmina de huevo, lactosa, lecitina, fibras, extractos), enriquecer los alimentos para proteger el organismo o mejorar las dietas como es el caso de los aditivos nutraceuticos (fibras, minerales, vitaminas, ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, lactobacilos).

Todos los procesos de conservación de alimentos tienen como objetivo inactivar los microorganismos patógenos presentes, minimizar los efectos no deseados durante la vida útil de y solucionar las alteraciones en el sabor, olor o color de los productos. Por ello, la industria alimentaria continua en la búsqueda de métodos alternativos de conservación, algunos cada vez más sofisticados como los envases comestibles con películas de proteínas, almidones o ceras; las atmósferas controladas o modificadas utilizando gases inertes como dióxido de carbono o nitrógeno para desplazar el oxígeno durante el empaquetado de los alimentos.

Las nuevas tecnologías de conservación como alta presión hidrostática, liofilización, calentamiento ohmico, pulsos de alto voltaje, radiación ionizante y ultrasonidos, se encuentran en etapa de investigación y desarrollo para lograr aplicaciones que no están al alcance de las técnicas convencionales de conservación utilizadas actualmente.

La industria alimentaria busca constantemente técnicas novedosas para obtener y comercializar nuevos productos. La biotecnología, que incluye todo proceso industrial aplicado en el que interviene un organismo biológico y la ingeniería genética que utiliza técnicas de recombinación de

genes y ADN, están encontrando cada vez mas aplicaciones en la industria de los alimentos. Las aplicaciones más numerosas de la ingeniería genética y la biotecnología se han encontrado en los alimentos de origen vegetal. Se han conseguido variedades de vegetales transgénicos con diferentes características: maduración retardada de frutas y hortalizas, mayor resistencia de cultivos a plagas, adaptación a distintas condiciones climáticas, refuerzo de componentes nutricionales o de propiedades organolépticas, o portador de otros nutrientes y medicamentos con una finalidad preventiva. El control sobre este tipo de experimentos es riguroso y las pruebas requeridas para autorizar su comercialización son muy estrictas ya que deben determinar con la mayor exactitud la composición nutricional del alimento y detectar su posible efecto tóxico, pruebas que no se exigen para el resto de los alimentos.

El debate sobre la biotecnología y sobre nuevas tecnologías aplicadas al diseño de los nuevos alimentos en su conjunto (alimentos funcionales) se enfoca en el derecho de los consumidores a conocer los métodos que se utilizan en la producción de los alimentos que consumen, en la solicitud de evaluaciones rigurosas sobre los efectos y riesgos de estas nuevas técnicas a la salud humana, animal y ambiental aplicando la metodología del análisis de riesgos y el principio de precaución, y el de la industria de la biotecnología a distribuir sus productos, en el marco de la legislación vigente. Es importante que el consumidor tenga acceso a más formación sobre biotecnología, ingeniería genética y nutrición para que los falsos temores generados por el desconocimiento de la ingeniería genética sean reducidos a los límites razonables y se reconozcan también las enormes posibilidades que ofrece esta ciencia.

## **Capítulo 1**

### **Evaluación del Riesgo de Agentes Químicos en los Alimentos**

*Risk Assessment of Chemical Agents in Foods*

**Prof. Dr. Arturo Anadón Navarro**  
**DVM, PhD, DipECVPT**

Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria  
Director del Departamento de Toxicología y Farmacología,  
Facultad de Veterinaria,  
Universidad Complutense de Madrid  
28040-Madrid, España  
E-mail: anadon@vet.ucm.es

# EVALUACIÓN DEL RIESGO DE AGENTES QUÍMICOS EN LOS ALIMENTOS

## Resumen

En los últimos años, los ciudadanos de la Unión Europea se han preocupado por la seguridad de los alimentos que consumen. Las diferentes crisis alimentarias sucedidas han impulsado a la Comisión Europea (CE) y a los Estados miembros de la Unión Europea (UE) a un replanteamiento fundamental acerca de la integridad de la cadena alimentaria y como debería ser regulada. Se han creado la “Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria” (EFSA) y la Agencia Española para la Seguridad Alimentaria (AESA) como medio más apropiado para satisfacer la necesidad de garantizar un nivel elevado de seguridad alimentaria.

En los alimentos pueden existir contaminantes que se definen como aquellas sustancias que no se adicionan intencionalmente a los mismos. Estas sustancias pueden estar presentes en el alimento como resultado de las diferentes etapas de su producción, empaquetamiento, transporte o almacenamiento. También pueden ser el resultado de una contaminación medio ambiental (dioxinas y metales como cadmio, mercurio y plomo).

Por otra parte, la utilización de medicamentos veterinarios y de productos fitosanitarios o plaguicidas pueden origina la presencia de residuos en los alimentos con un riesgo potencial para la salud (de origen toxicológico, farmacológico, microbiológico y tecnológico).

Para una correcta seguridad alimentaria se necesita establecer para los residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas los LMRs basados en: ingesta diaria admisible (IDA), identificación del residuo-marcador y residuos totales, ingestión diaria máxima teórica de residuos (TMDI) y distribución tisular. Los LMRs son necesarios para establecer tiempos de espera adecuados y para propósitos de vigilancia de residuos. El análisis del riesgo por residuos de sustancias químicas en alimentos es un proceso basado en criterios que consta de las siguientes fases: identificación de la peligrosidad, caracterización de la situación de peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.



## **RISK ASSESSMENT OF CHEMICAL AGENTS IN FOODS**

### **Abstract**

In recent years, European citizens have become increasingly aware of the safety of food that we eat. The different high profile food safety ‘scandals’ have galvanized the European Commission and individual Member States into a fundamental rethink about the integrity of the food chain and how it should be regulated. This has manifested itself in the setting up of the European Food Safety Authority (EFSA) and the creation of the Spanish Food Safety Agency (AESA). The food contaminants are defined as substances that are not added intentionally to foods. These substances can be present in the food like result of the different stages from their production, packing, transport or storage. Also dioxins and metals like cadmium, mercury and lead can be the result of an environmental contamination. The pesticides and veterinary medicinal products use can produce residues in the food products and constitute a potential risk for the health (toxicological, pharmacological, microbiological and technological risk). The determination of the MRLs is based on the acceptable daily intake, ratio of the marker residue/total, the theoretical maximum daily intake (TMDI) and the tissue distribution. The MRLs are necessary to establish suitable withdrawal period and for residue-monitoring in the edible food products. The Risk Analysis of residues from chemical agents is a scientifically-based process consisting of a number of important steps in the overall process: (i) risk assessment which comprises hazard identification, hazard characteristics, exposure assessment and risk characteristics; (ii) risk management; (iii) risk communication.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los ciudadanos de la Unión Europea se han dado cuenta de la seguridad de los alimentos que consumimos, de cómo se producen los alimentos y de como los Estados miembros protegen la salud de los consumidores. Las crisis alimentarias sucedidas en los últimos años, tales como la crisis de las “vacas locas” o “Encefalopatía Espongiforme Bovina” (BSE) en carne de vacuno y su relación con la inducción de la variante humana de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), la muerte trágica de consumidores escoceses como resultado de la presencia de *Escherichia coli* 0157 en carne de vacuno, la pérdida de confianza por parte del consumidor belga en su sector agroalimentario por la crisis de los “pollos belgas” o de contaminación por dioxinas y la crisis de la Listeria, han impulsado a la Comisión Europea y a los Estados miembros de la Unión Europea (UE) a un replanteamiento fundamental acerca de la integridad de la cadena alimentaria y como debería ser regulada. Tras el incidente de las dioxinas en 1999, la UE se planteó ejercer un control más estricto en la alimentación animal (Anadón *et al.*, 2000a, 2000b). Por ello, la Comisión de las Comunidades Europeas publicó en el año 2000 el “Libro Blanco sobre la Seguridad Alimentaria” en el que se comprometía entre otras acciones a la creación de un Organismo Alimentario Europeo independiente denominado “Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria” (EFSA) como medio más apropiado para satisfacer la necesidad de garantizar un nivel elevado de seguridad alimentaria. Se han creado igualmente Agencias de Seguridad Alimentaria en muchos Estados miembros de la UE; a este respecto, en España se ha creado la Agencia Española para la Seguridad Alimentaria (AESA), con el objeto de replantear la política de seguridad alimentaria y disponer de instrumentos para la gestión integral de la seguridad alimentaria en toda la cadena de producción, elaboración, distribución y consumo y también se han creado Agencias en ciertas Comunidades Autónomas.

Así mismo se han establecido las bases para trasladar el autocontrol alimentario a las fases de producción haciendo totalmente válido el dicho de que la seguridad alimentaria debe garantizarse “*desde la granja hasta la mesa*”. También se ha hecho hincapié en la implantación y mejora de sistemas de monitorización y planes de vigilancia de zoonosis y residuos, de sistemas de alerta rápidos, de sistemas de información en el sector agrario, y de acciones paralelas como el seguimiento de la radioactividad natural en el medio ambiente (Anadón *et al.*, 2000).

Los contaminantes se definen como sustancias que no se adicionan intencionalmente a los alimentos. Estas sustancias pueden estar presentes en el alimento como resultado de las diferentes etapas de su producción, empaquetamiento, transporte o almacenamiento. También pueden ser el resultado de una contaminación ambiental. Ya que la contaminación generalmente tiene un impacto negativo sobre la calidad de los alimentos y puede implicar un riesgo para la salud humana, la Unión Europea ha tomado medidas para minimizar los contaminantes en los alimentos.

Los principios básicos de la Legislación de la Unión Europea sobre contaminantes en alimentos se encuentran en el Reglamento del Consejo 93/315/CEE de 8 Febrero de 1993:

- los alimentos que contenga un contaminante en una cantidad inaceptable desde el punto de vista de salud pública y en particular a un nivel toxicológico, no deben ser puestos en el mercado;
- los niveles de contaminantes deberían mantenerse tan bajos como puedan razonablemente ser alcanzados siguiendo las buenas prácticas recomendadas, y
- deben fijarse niveles máximos para ciertos contaminantes con el fin de proteger la salud pública.

Los niveles máximos se fijaron para ciertos contaminantes en alimentos mediante el Reglamento de la Comisión 2001/466/CE de 8 de Marzo de 2001 y en las subsiguientes modificaciones: Nitratos (Reglamento de la Comisión 2002/563/CE), metales pesados tales como plomo, cadmio y mercurio (Reglamento de la Comisión 2002/221/CE), 3-monocloropropano diol (3-MCPD), y Dioxinas (Reglamento del Consejo 2001/2375/CE), entre otros. También se está trabajando en la Unión Europea para reducir los niveles en alimentos y clarificar los posibles riesgos de sustancias tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los compuesto de estaño y la acrilamida.

## **CONTAMINANTES DE LOS ALIMENTOS**

Los contaminantes presentes en los alimentos tienen diversos orígenes, uno que ocurre de forma natural y otro medio ambiental.

## **Contaminantes Ambientales**

Quizás el problema mas señalado fué el de la contaminación medio ambiental por dioxinas en Bélgica en el año 1999. La cronología de este brote ha sido bien descrito; se trato de un incidente por aceite policloro bifenilo (PCB) introducido en la cadena alimentaría. Los piensos para los animales producidos a partir de esta fuente de contaminación se enviaron a 2500 granjas y afecto a diferentes categorías de animales y/o productos para consumo (cerdo, pollos, leche y huevos). Este incidente fue el punto de partida de las concentraciones máximas permitidas de dioxinas en piensos para animales.

## **Dioxinas**

Los compuestos dioxinas, policlorados bifenilos y polibrominados bifenilos pertenecen a un grupo de compuestos químicamente relacionados, cuyo potencial tóxico en humanos y animales se ha demostrado por investigaciones laboratoriales y estudios de exposiciones accidentales. La exposición a este tipo de compuestos de los animales para consumo y el hombre ocurre a menudo a través de las fuentes medio ambientales o de los piensos para los animales.

a) Dioxinas [dibenzo-p-dioxinas (PCDD y dibenzofuranos (PCDF) policlorados]: Los policlorados dibenzo-p-dioxinas (PCDD) y dibenzofuranos (PCDF) pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos lipofílicos y persistentes. Los PCDD y PCDF son a menudo denominados de forma simplificada como “dioxinas”. Dependiendo del grado de cloración (1 – 8 átomos de cloro) y del modelo de sustitución se pueden distinguir entre 75 PCDD y 135 PCDF, denominados “congéneres”. Las dioxinas, son contaminantes con distribución ubicua debido a su formación como subproductos y poco comunes en un gran número de procesos industriales y térmicos.

La toxicidad de las dioxinas difiere considerablemente. En particular, son de especial importancia aquellos congéneres que son sustituidos en posición 2, 3, 7, 9. Por lo tanto, de los 210 teóricos posibles congéneres, sólo 17 tienen implicación toxicológica. Estos compuestos demuestran una toxicidad similar al congénere mas tóxico 2,3,7,8-tetraclorodibenzo dioxina (2,3,7,8-TCDD), también conocido como “dioxina de Séveso (Bertazzi *et al.*, 1998).

**b) Policlorados Bifenilos (PCB):** Son pequeñas moléculas orgánicas pertenecientes a la familia de los hidrocarburos clorados. Existen 209 tipos o congéneres de PCB, de los cuales aproximadamente 100 se han empleados en sistemas cerrados en transformadores eléctricos y transmisores de calor. La volatilidad de los PCB permite su evaporación desde la superficie de las aguas, su movimiento a través del aire y su retorno al suelo y al agua con la lluvia. Esto da como resultado una amplia dispersión y persistencia de estos compuestos químicos tóxicos. Los compuestos de PCB tienen diferentes propiedades físicas y químicas, que se fundamentan en el grado de cloración y la posición de los átomos de cloro en la molécula. Aquellos PCB con anillos bencénicos localizados en el mismo plano se denominan de configuración coplanar, pudiendo tener actividad similar a las dioxinas si las sustituciones de cloro están localizadas en las posiciones 3', 3, 4', 4, 5', 5, o 2, 2' en los anillos bencénicos.

Los PCB han sido asociados con tumores hepáticos y propuestos como promotores de cáncer. Alguno análogos coplanares de los PCB, similares a las dioxinas, tales como 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), se ligan al receptor citosólico aril-hidrocarburo (Ah), afectando la regulación de la expresión del gen. La unión al receptor Ah y la subsecuente inducción de la actividad de la aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH), afecta el metabolismo de los esteroides y otras hormonas y puede disminuir el almacenamiento de glicógeno en el hígado (Lindström et al.1995).

Los compuestos PCB son ubicuos y se encuentran en una gran variedad de alimentos. Se pueden bioconcentrar en la grasa y presentan una larga semivida biológica. Tanto el pescado como otros productos de origen marino, parecen ser la fuente más importante de exposición a los PCBs, para el hombre.

**c) Dioxinas polibromadas y furanos:** Las dioxinas polibromadas (PBDD) y los furanos (PBDF) también tienen problemas toxicológicos. Si están presentes los compuestos clorados y polibromados simultáneamente, debe considerarse la suma de ambos para la ingesta diaria aceptable recomendada. En general, no hay datos sobre las cantidades de estos compuestos que pueden entrar en la cadena alimentaria.

Otros contaminantes medio ambientales serían los metales, entre los que tenemos el cadmio, mercurio y plomo que son acumulativos. El estaño, es un contaminante metálico no acumulativo.

## RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y PRODUCTOS FITOSANITARIOS O PLAGUICIDAS USADOS EN LA PRODUCCION DE ALIMENTOS

Muchas sustancias se utilizan durante la producción de los alimentos por lo que pueden crear cantidades residuales en los productos alimentarios para consumo. Entre estos agentes xenobióticos tenemos los medicamentos veterinarios y plaguicidas.

El propósito principal que contempla la Legislación Veterinaria y Fitosanitaria en la Unión Europea es la protección al consumidor frente a peligrosidad o riesgo que pueden presentar los residuos de xenobióticos en los productos alimenticios de origen animal y vegetal.

Para los medicamentos veterinarios, se ha publicado el Reglamento del Consejo 90/2377/CEE de 26 de junio por el que se establece un procedimiento Comunitario para fijar los límites máximos de residuos (LMRs) o tolerancias de medicamentos veterinarios. En este Reglamento se contemplan 4 Anexos para los principios activos componentes de los medicamentos veterinarios:

- **Anexo I:** incluye aquellos principios activos con LMRs establecidos.
- **Anexo II:** incluye aquellos principios activos que no necesitan fijarse sus LMRs.
- **Anexo III:** incluye aquellos principios activos con LMRs provisionales establecidos.
- **Anexo IV:** incluye los principios activos que no pueden fijarse un LMR porque cualquier nivel de residuos es peligroso.

Con respecto a los productos fitosanitarios los LMRs en productos vegetales se basan en las Directivas 76/895/CEE, 79/700/CEE; 80/428/CEE, 81/36/CEE; 82/528/CEE, y 88/298/CEE.

La Directiva del Consejo 91/414/CEE de 15 de julio relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, determina una completa armonización de legislaciones para los grupos de productos fitosanitarios, establece los requisitos y el procedimiento para la aceptación Comunitaria de las sustancias activas nuevas que puedan utilizarse en la elaboración de productos fitosanitarios y los requisitos, normas y criterios que han de observarse para su autorización. Esta Directiva establece, asimismo, las bases de un programa Comunitario para la revisión de las sustancias activas y productos fitosanitarios existentes anteriormente en el mercado (*Anadón et*

*al.*, 2001). La materia regulada es compleja, por lo que los requisitos técnicos, necesarios para asegurar la suficiente uniformidad en su aplicación por los distintos Estados miembros, aparecen establecidos en sus anexos con los contenidos:

- **Anexo I:** lista comunitaria de sustancias activas admitidas en los productos fitosanitarios.
- **Anexo II:** información que se debe aportar con la solicitud de inclusión de una sustancia en el Anexo I.
- **Anexo III:** información que se debe aportar con la solicitud de autorización de un producto fitosanitario.
- **Anexo IV:** frases normalizadas referentes a los riesgos especiales.
- **Anexo V:** frases normalizadas de medidas de seguridad.
- **Anexo VI:** principios uniformes para la evaluación de los productos fitosanitarios.

La Directiva de la Comisión 94/79/CEE, modifica el Reglamento 91/414/CEE (sección 5 de la Parte A del Anexo II), describiendo la información requerida sobre los “Estudios toxicológicos y de metabolismo”. Otra Directiva de la Comisión 95/36/CE de 14 de julio de 1995 modifica también el Reglamento 91/414/CEE (parte A del Anexo II y parte A del Anexo III relativas a requerimientos en la disposición y comportamiento en el medio ambiente)(Anadón *et al.*, 2001).

El límite máximo de residuos (LMR) para un medicamento veterinario se define como el contenido máximo de residuos resultantes de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg, ppm o µg/kg, ppb sobre la base del peso del alimento de origen animal en fresco) permitido en la Unión Europea, es decir reconocido como nivel admisible en un producto alimenticio. El LMR se expresa en términos de niveles de fármaco inalterado o en términos de niveles de un metabolito marcador, si se conoce el porcentaje del metabolito marcador formado a partir del compuesto inalterado (Anadón *et al.*, 1999, 1999a, Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999). La función primaria del sistema LMR es que pueda establecerse un tiempo de espera, que asegure que los productos de origen animal sean seguros para ser consumidos; el programa de vigilancia del LMR soporta este esquema controlando el cumplimiento de estos requisitos. La monitorización del LMR puede ser siempre llevada a cabo en unos pocos tejidos de una minoría de animales. Basados en esta suposición, el objetivo

de la legislación es la monitorización de uno o dos tejidos-diana, es decir el cumplimiento del LMR para el tejido que tiene la más baja depleción.

La determinación de los LMRs está basada en:

1) **ingesta diaria admisible (IDA)**,

2) **identificación del residuo-marcador y los residuos totales:** El residuo marcador se define como el residuo (fármaco inalterado y/o metabolitos) cuya concentración en un tejido declina en función del tiempo y su concentración representa el conjunto de los residuos totales presentes y cubiertos por el LMR. Los estudios farmacocinéticos (incluido el metabolismo) sirven para identificar el residuo marcador y con técnicas analíticas sensibles determinar sus concentraciones titulares en los animales tratados en función del tiempo que permitan el control práctico del cumplimiento del LMR establecido (Anadón *et al.*, 2001; Anadón *et al.*, 2002; Martínez-Larrañaga *et al.*, 2004). Un LMR se establece con un valor numérico referido a una sustancia(s) química denominada residuo-marcador y a un producto alimenticio denominado tejido-diana (son los tejidos comestibles que presentan mayor afinidad por el fármaco y con más lenta eliminación, y que se utilizan para controlar la presencia del residuo-marcador y de sus niveles).

3) **ingesta diaria máxima teórica (TMDI):** Se estima usando el paquete de consumo ('EU food basket') en fresco para productos de origen animal (ver **Tabla 2**). Los residuos de medicamentos veterinarios incluyen los fármacos inalterados así como sus metabolitos. Los metabolitos se toman en consideración si están presentes en una considerable cantidad o tienen un potencial toxicológico o farmacológico.

4) **distribución tisular:** Información acerca de la distribución de los residuos en los tejidos comestibles de los animales-diana.

## ANÁLISIS DEL RIESGO

Este es un proceso basado en criterios científicos que consta de las siguientes fases (**Tabla 1**):

- 1) identificación de la peligrosidad,
- 2) caracterización de la situación de peligro,
- 3) evaluación de la exposición y
- 4) caracterización del riesgo.



Cuando se efectúan evaluaciones del riesgo a nivel nacional conviene que las autoridades dispongan de datos epidemiológicos sobre la incidencia de las intoxicaciones / enfermedades transmitidas por los alimentos así como información sobre el nivel de exposición de la población en particular de los grupos vulnerables, a peligros asociados con los alimentos.

**Tabla 1.- Fases del Análisis del Riesgo**

Comunicación del riesgo Comunicación eficaz del proceso y caracterización del riesgo		
Investigación del riesgo	Evaluación del riesgo	Gestión del riesgo
- conocimiento de la relación mecanística entre las fuentes de los fármacos, dosis/exposición y respuesta	- identificación de la peligrosidad, - caracterización de la peligrosidad, - evaluación de la exposición, - caracterización del riesgo, - identificación de las necesidades de investigación.	- la gestión del riesgo incorpora los resultados de la caracterización del riesgo y las consideraciones sobre la salud pública. socio-económicas y políticas.

La **identificación de la peligrosidad**, consiste en la identificación de los residuos del fármaco presentes en los alimentos capaces de originar efectos adversos sobre la salud del consumidor y potencialmente presentes en alimentos seleccionados procedentes de los animales.

La **caracterización de la peligrosidad** consiste en el conocimiento de la naturaleza de los efectos adversos asociados con los residuos de medicamentos veterinarios que pueden estar presentes en el alimento siendo evaluados cualitativamente y/o cuantitativamente sobre la base de los estudios toxicológicos y farmacológicos en especies de animales de laboratorio. Si se disponen las observaciones en humanos deben de ser consideradas. En esta etapa se establece la IDA. Como punto de partida para calcular la IDA se utiliza la dosis sin efecto tóxico (NOEL) o la dosis sin efecto adverso observado (NOAEL) respecto de los parámetros toxicológicos y/o farmacológicos más sensibles, generalmente en la especie animal más sensibles. Al NOEL o NOAEL más bajo se le aplica un factor de seguridad que tiene en cuenta el tipo de efecto, la severidad o reversibilidad del efecto, y los problemas de variabilidad entre las especies y dentro de

ellas, para determinar la IDA para los seres humanos. Si se dispone de ellos, pueden usarse datos pertinentes sobre los seres humanos al estimar la IDA, generalmente con un factor de seguridad reducido (Jones, 1997, Anadón et al., 1999, 1999a; Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999)(**Tabla 2**). En definitiva, se aplican factores de seguridad de 10, 100 (10 x 10, para corregir las variabilidad dentro de la misma especie y entre especies) o superiores para extrapolar del NOEL la IDA. Los márgenes de seguridad usados para calcular la IDA se consideran necesarios para cubrir las incertidumbres sustanciadas en los modelos usados y su relevancia para una población de consumidores diversa.

Las IDAs de la mayoría de los plaguicidas están basadas en datos animales; esto llama la atención ya que los peligros potenciales para el hombre debidos a la presencia de residuos de plaguicidas en el alimento son muchos. Por ello, se aplican factores de seguridad de 100 o superiores (ver **Tabla 3**). Esto significa que la IDA es usualmente el 1% del NOAEL en la especie más sensible. En los pocos casos, donde hay datos de toxicidad disponible en el hombre, se aplica un factor de seguridad de 10, para cubrir la variación entre humanos (Concon, 1988).

**Tabla 2.- Pasos a seguir en la fijación de los LMR(s)**

1°	Toxicología
2°	NOEL en el animal más sensible, mg/kg p.c.
3°	IDA o ADI para el hombre, mg/kg p.c., teniendo en cuenta factor de seguridad (10, 100 y superior)
4°	LMR o MRL, microgramo/kg o mg/kg, teniendo en cuenta peso corporal (60 kg) e ingestas alimentarias(*)
(*) <i>Grandes animales:</i> músculo 300 g, hígado 100 g, riñón 50 g, grasa 50 g (en caso de los cerdos, 50 g de piel + grasa en proporciones naturales; leche 1500 g <i>Aves:</i> músculo 300 g, hígado 100 g, riñón 10 g, piel + grasa 90 g en proporciones naturales; <i>huevos</i> 100 g <i>Pescado:</i> músculo 300 g + piel en proporciones naturales <i>Miel:</i> 20 g	

**Tabla 3.- NOAELs y ADIs de algunos plaguicidas**

Pesticida	NOAEL (µg/kg p.c.) (especies)	ADI (µg/kg p.c.)	Factor de seguridad	Residuo máximo* en carne, pescado (µg/kg)
Mutagenicidad y carcinogenicidad				
aldrin/dieldrin	25(rata/perro)	0.1	250	1-86
DDT	50 (rata)	5	10**	3-10
m-paration	100 (hombre)	1	100	-
captan	1.25x10 <sup>4</sup> (monos)	100	125	26-40
Mutagenicidad y carcinogenicidad				
diclorvos malation	33(hombre) 5000 (rata) 200/day (hombre)	4 20	8 10	4-96

\*Residuos altos, se encuentran en carne, pescado, y pollos

\*\*Debido a que el potencial carcinogénico es para el hombre se aplica solo 10.

Se señala que se ha expresado cierta preocupación por el hecho de que pueden causarse efectos tóxicos agudos por el consumo de alimentos que contienen residuos de ciertos plaguicidas o puntos / lugares de administración para animales de consumo. Ello ha originado que se haya establecido la “dosis de referencia aguda” para evaluar las situaciones de peligro agudas usando los mismos principios y métodos básicos empleados para calcular la ADI. Se determina el NOAEL observado a partir de las bases de datos de efectos agudos (por ejemplo, discrasias sanguíneas y efectos neurotóxicos como neuropatía retardada e inhibición de la colinesterasa).

La **evaluación de la exposición** refiere a la evaluación cualitativa y cuantitativa de la probabilidad de la ingesta de residuos de medicamentos a través de los alimentos de origen animal (es decir el estimado de ingesta del consumidor). Para la evaluación de la exposición la identificación de un residuo-marcador es importante, así como su relación con el residuo total relevante. El método usado es el de la extrema prudencia, sobreestimando las posibilidades de ingesta alimentaria utilizando la ración diaria estándar internacional para una persona de 60 kg de peso (**Tabla 2**).

En la **caracterización del riesgo** se hace un estimado cualitativo y/o cuantitativo de los riesgos para el consumidor a partir de los residuos

presentes en los productos animales, aportando las incertidumbres de la evaluación de la probabilidad de la aparición y severidad del conocido o potenciales efectos adversos sobre la salud en una población dada basada en la identificación de la peligrosidad, la caracterización del riesgo y la evaluación de la exposición. La consideración de la caracterización del riesgo conducirá a las conclusiones, si los LMR necesitan ser establecidos o no. El LMR garantiza el respeto de la IDA. En el establecimiento de los LMRs, la TMDI se estima usando el paquete de consumo en fresco para productos de origen animal indicado anteriormente pero no se tienen en cuenta los efectos industriales o de procesamiento domésticos sobre el contenido de los residuos.

La caracterización del riesgo se traduce por el establecimiento del LMR para una sustancia en los tejidos comestibles de las diferentes especies sobre la base de los datos precedentes, tras la estimación de las frecuencias y naturaleza de los efectos indeseables. El LMR siempre garantiza el respeto de la IDA.

Los residuos de medicamentos veterinarios incluyen los fármacos inalterados así como sus metabolitos. Los metabolitos se toman en consideración si son toxicológicamente relevantes, es decir, si están presentes en una considerable cantidad o tienen un potencial toxicológico o farmacológico. El LMR por tanto, se expresa en términos de niveles de fármaco inalterado o en términos de niveles de un metabolito marcador, si se conoce el porcentaje del metabolito marcador formado a partir del compuesto inalterado o padre (Anadón *et al.*, 1999, 1999a).

Los LMRs para plaguicidas se establecen comparando la ingesta diaria de los residuos de un plaguicida calculado sobre la base del LMR con la ADI. La ingesta diaria se calcula multiplicando cada LMR con la cantidad del componente de la dieta correspondiente, seguido por la suma de las cantidades de residuos obtenidos. Se debe de indicar que el uso del LMR en el cálculo de la ingesta puede conducir a un valor más alto que la ingesta actual, ya que los niveles residuales actuales a menudo son más bajos que los LMRs recomendados. Los modelos de consumo alimentario varían considerable de un país a otro, y de una cultura a otra; a nivel internacional la ingesta total se calcula sobre la base de un paquete de consumo alimentario global medio hipotético, compuesto de acuerdo a las recomendaciones de la FAO, es decir consistente de componentes de cada dieta cultural. A nivel nacional, la ingesta total se calcula sobre la base de los datos de consumo actuales. Como se ha señalado en el apartado de evaluación del riesgo existen tres vías para calcular la ingesta diaria de

pesticidas: TMDI (ingesta diaria máxima teórica), EMDI (ingesta diaria media estimada) y EDI (ingesta diaria estimada).

Para contaminantes o sustancias que son nutrientes esenciales o constituyentes inevitables del alimento en estos casos se emplea el PMTDI (ingesta diaria tolerable máxima provisional). Para los metales contaminantes con propiedades no acumulativas, se emplea el PMDI (ingesta diaria máxima provisional). El PTWI (ingesta semanal tolerable provisional) ha sido establecido para contaminantes metálicos con propiedades acumulativas (por ejemplo, cadmio, mercurio y plomo). Finalmente, para nutrientes esenciales así como constituyentes inevitables del alimento, se establece una MTDI (ingesta diaria tolerable máxima)

La **gestión del riesgo**, será el proceso consistente en sopesar las distintas políticas posibles a la luz de los resultados de la evaluación del riesgo, y si fuera necesario, en seleccionar y aplicar medidas de control, incluidas las medidas reglamentarias. Las acciones más prominentes en esta etapa son la inclusión de una sustancia en el Anexo I, Anexo II, Anexo III o Anexo IV del Reglamento del Consejo 2377/90/CEE y el establecimiento de los LMRs, el establecimiento subsiguiente de los tiempos de espera, así como la vigilancia de los residuos de acuerdo con la Directiva del Consejo 23/96/CEE, para los que se necesita proporcionar los métodos analíticos validados en el procedimiento del LMR.

La comunicación del riesgo, será el intercambio interactivo de información y opiniones concernientes con el riesgo y los factores relacionados con el riesgo entre los asesores del riesgo, los gestores del riesgo, consumidores y otras partes interesadas.

## **RIESGOS PARA LA SALUD PÚBLICA**

Los riesgos potenciales para la salud pública que pueden conllevar los residuos de agentes químicos en los productos alimenticios suelen ser de origen toxicológico, farmacológico, microbiológico e inmunológico. Algunos de los antibióticos usados como promotores del crecimiento han planteado riesgos (indirectos) para la salud humana. La ingestión de estos antibióticos puede conducir a un aumento de resistencia a las bacterias. Esto puede implicar: (a) transferencia de la bacteria resistente al antibiótico al hombre vía ingesta de alimentos; (b) transferencia de factor de resistencia (factor-R) a partir de bacterias resistentes no patógenas a otra bacteria la cual conduce a difundir la resistencia (Anadón *et al*, 1999c). Ha atraído particular

inquietud la resistencia entre enterococos a los antibióticos glicopéptidos tales como vancomicina; alto nivel de resistencia a glicopéptidos mediados por los genes *van* detectados en el *Enterococcus faecium* y otras especies de enterococos (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999b). Por último, los residuos de antibióticos también pueden alterar las fermentaciones implicadas en la tecnología de alimentos.

Los productos fitosanitarios o plaguicidas son compuestos que se usan para el control o eliminación de especies de insectos indeseados (insecticidas), acáridos (acaricidas), hongos (fungicidas), plantas superiores (herbicidas), roedores (rodenticidas), o nematodos (nematococidas). La acción biocida de los plaguicidas incluye una variedad de perturbaciones de los procesos fisiológicos, tales como inhibición de la acetilcolinesterasa por insecticidas organofosforados, bloqueo de la neurotransmisión por hidrocarburos clorados (por ejemplo aldrin), e inhibición de la fosforilización oxidativa por herbicidas dinitrofenoles (por ejemplo dinitro-O-cresol).

La contaminación de vegetales puede ser el resultado del tratamiento así como de las condiciones tales como uso inapropiado de productos fitosanitarios, residuos a partir de tratamientos previos en el suelo y contaminación cruzada (particularmente durante el almacenamiento). Fuentes de residuos en productos de origen animal incluyen la contaminación del agua o pienso, tratamiento de los alojamientos con pesticidas y contaminación de la leche)(De la Riva y Anadón, 1991).

En general, se han encontrado niveles de plaguicidas en los alimentos tales como: cereales, leche y productos lácteos, huevos, carne, pescado y mariscos, frutos, y vegetales entre otros. Los insecticidas organoclorados merecen particular atención, pues son muy estables y pueden acumularse en las cadenas alimentarias (De la Riva y Anadón, 1991). Productos de origen animal así como la leche de mujer casi siempre contiene residuos de compuestos organoclorados.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., y MARTÍNEZ, M.A. (1999). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (I). **Industria Farmacéutica XIV** (1), 113-118
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., y MARTÍNEZ, M.A. (1999a). Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal (y II). **Industria Farmacéutica XIV** (2), 111-120
- ANADÓN, A. and MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (1999b). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. **Livestock Production Science** 59, 183-198
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. y FREJO, M.T. (1999c). Problemática actual de los antibióticos como promotores del crecimiento. **Revista Anaporc** 188 (XIX), 5-52.
- ANADÓN, A., DIAZ, P. y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2000). Contaminación de materias primas destinadas a la alimentación animal y sus consecuencias en la salud del consumidor. **Nuestra Cabaña** 303 (Noviembre/Diciembre), 34-46.
- ANADÓN, A., FREJO, M.T., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J., MARTÍNEZ, M.A. (2000b). Aditivos en la Alimentación Animal. Compendio Reglamentario. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General de Agricultura y Alimentación, Dirección General de Ganadería, Madrid. pp. 1-219. (ISBN: 84-491-0460-2).
- ANADÓN, A. y MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R. (2001). Residuos de medicamentos veterinarios y fitosanitarios: implicaciones en seguridad alimentaria y salud pública. **Nuestra Cabaña** 309 (Julio/Agosto), 82-92.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ITURBE, I., MARTÍNEZ, M.A., DÍAZ, M.J., FREJO, M.T., MARTÍNEZ, M. (2001a) Pharmacokinetic and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. **Research in Veterinary Science** 71, 101-109.
- ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J., MARTÍNEZ, M.A., FREJO, M.T., MARTÍNEZ, M., TAFUR, M., CASTELLANO, V.J. (2002). Pharmacokinetic characteristics and tissue residues for marbofloxacin and its metabolite N-desmethyl-marbofloxacin in broiler chickens. **American Journal of Veterinary Research** 63 (7): 927-933.
- BERTAZZI, P.A., BERNUCCI, I and BRAMBILLA, G. (1998). The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. **Environmental Health Perspectives** 106 (suppl. 2), 625-633.
- CONCON, J.M. (1988). Food Toxicology. Marcel Dekker Inc., New York.
- DE LA RIVA, C. and ANADÓN, A. (1991). Organochloride pesticides in cow's milk from agricultural region of northwestern Spain. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 46 (4), 527-533.
- JONES, P. (1997). Regulatory harmonization for veterinary medicines in the European Union. Proceedings of the 7<sup>th</sup> European Association for Veterinary Pharmacology & Toxicology (EAVPT). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** (Suppl. 1), 1-9.
- LINDSTRÖM, G. and HOOPER, K. (1997). Workshop on perinatal exposure to dioxin-like compounds, I, Summary. **Environmental Health Perspectives** 103 (suppl.), 135.
- MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M.A., DÍAZ, M.J., FREJO, M.T., CASTELLANO, V.J., ISEA, G., DE LA CRUZ, C.O. (2004). Pharmacokinetics of amoxicillin and the rate of depletion of its residues in pigs. **The Veterinary Record** 154 (20): 627-632.

## Capítulo 2

### **Desarrollo de Métodos para Estudiar las Implicaciones Alimentarias y Agroambientales de Fungicidas en Viñedo**

*Development of Methods to Study the Food and Agriculture Effects of Fungicides in Vineyards*

**Rial Otero R., Cancho Grande B., Simál Gándara J.\***

Área de Nutrición y Bromatología,  
Departamento de Química Analítica y Alimentaria,  
Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Campus de Ourense  
32004 Ourense, España  
Email: jsimal@uvigo.es



## **DESARROLLO DE MÉTODOS PARA ESTUDIAR LAS IMPLICACIONES ALIMENTARIAS Y AGROAMBIENTALES DE FUNGICIDAS EN VIÑEDOS**

### **Resumen**

La aplicación de fungicidas en los viñedos para el tratamiento de diversas enfermedades causadas por hongos es una práctica habitual y necesaria en viticultura. No obstante, el uso sistemático y abusivo de estos productos, sin respetar los plazos de seguridad indicados por el fabricante, conlleva una importante acumulación de residuos de fungicidas en las uvas, que posteriormente pasan al vino. Los residuos de fungicidas presentes en las uvas de vinificación en el momento de la recolección pueden alterar el proceso fermentativo, la calidad y seguridad final del vino. Asimismo, es prácticamente imposible evitar que parte del fungicida alcance el suelo en el momento de su aplicación pero además, la lluvia puede arrastrar hacia al suelo cierta cantidad de producto depositada sobre la superficie de la planta. Una vez en el suelo estos fungicidas pueden modificar la microbiota del suelo, alterando su fertilidad, lo que constituye un problema agrario serio. La problemática asociada a estos compuestos pone de manifiesto la necesidad de controlar sus residuos en las uvas de vinificación, los vinos y los suelos.

## **DEVELOPMENT OF METHODS TO STUDY THE FOOD AND AGRICULTURE EFFECTS OF FUNGICIDES IN VINEYARDS**

### **Abstract**

The use of fungicides for the prevention and treatment of the fungi encountered in vineyards is a frequent and necessary practice in viticulture. However, their improper use without respecting the safety intervals recommended by the manufacturer, implicate an important accumulation of fungicide residues in grapes and later in the wine. The fungicide residues present in grapes for vinification can disturb the fermentative process and decrease the quality of wine with the resulting risk to the consumer's health. On the other hand, it is practically impossible to avoid that some parts of the fungicide applied fall to soil during the treatment. Moreover, the rain can contribute to wash away the fungicide residues from leaves to soil. These residues can modify the microbial properties of the soil and their fertility which can represent a serious agricultural problem. As a conclusion, the problems associated to the fungicides make necessary the monitorization of these compounds in grapes for vinification, in wines and also in the vineyard soils.

## 1.- INTERÉS DEL USO DE FUNGICIDAS EN VIÑEDOS

La producción enológica en el mundo supone el 2.5 % de la producción alimentaria total. A nivel mundial, en el año 2003 se destinaron aproximadamente 7.5 millones de hectáreas (Ha) para el cultivo de la vid, lo que supuso una producción de aproximadamente 62.1 millones de toneladas métricas (Tm) de uva. Europa es el continente que mayor superficie destina a este fin (57 %), produciendo un 48 % de la producción mundial de uva y un 68 % de la producción mundial de vino. España ocupa el primer lugar en cuanto a superficie destinada al cultivo de la vid seguida a distancia por Francia e Italia. Sin embargo, es el tercer productor mundial de uva y vino debido, en gran parte, al bajo rendimiento de la zona de La Mancha [1].

En Galicia el viñedo ha permitido el aprovechamiento de terrenos no aptos para otros cultivos. Actualmente, ocupa una superficie de casi 27 mil Ha y representa, aproximadamente, el 2.3 % de la superficie española destinada a este cultivo. La producción de vino en Galicia se centra prácticamente en la zona Sur, donde se distinguen cinco denominaciones de origen (D.O.): Rías Baixas, Ribeira Sacra, Ribeiro, Valdeorras y Monterrei (figura 1). A su vez, la D.O. Rías Baixas comprende 5 subzonas de producción: Val do Salnés, O Rosal, Condado do Tea, Soutomaior y Ribeira do Ulla. En el año 2003, la superficie total inscrita bajo las cinco denominaciones de origen existentes fue de 8 mil Ha, lo que representa el 29 % de la superficie destinada a este cultivo en Galicia.

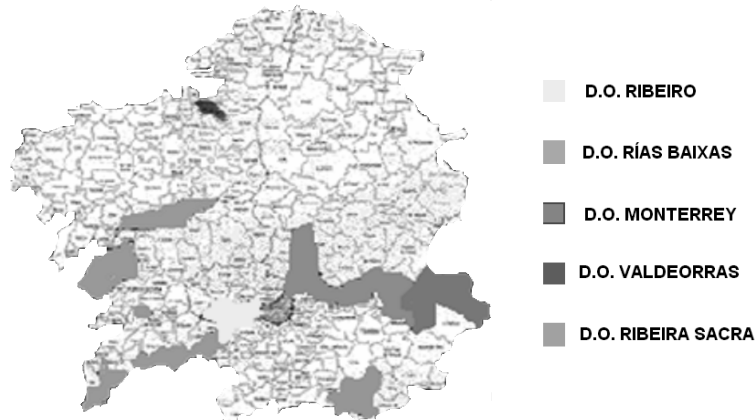


Figura 1. Localización geográfica de las cinco denominaciones de origen gallegas.

A lo largo de su ciclo productivo, la vid puede verse afectada por distintas enfermedades producidas por virus, hongos, bacterias, ácaros e insectos. Caben resaltar las enfermedades producidas por hongos debido a las importantes pérdidas de cosecha que ocasionan. El clima gallego, caracterizado por humedades relativas altas, temperaturas suaves y lluvias primaverales, favorece la incidencia de las principales enfermedades de origen fúngico: mildiu (*Plasmopara viticola*), oidio (*Uncinula necator*) y botrytis (*Botrytis cinerea*). Entre las consecuencias asociadas a estas plagas destacan los daños producidos en tallos, hojas y brotes; la podredumbre del racimo; las pérdidas de mosto; las modificaciones en la composición de la uva, el mosto y el vino; así como el envejecimiento rápido de los vinos blancos [2, 3]. Aunque para minimizar la incidencia de estas enfermedades se recomiendan distintas prácticas vitícolas, el único medio de lucha realmente eficaz es el uso de distintos fungicidas pertenecientes a diferentes familias químicas [4].

Los compuestos comúnmente utilizados pertenecen a la familia de las ftalimidias, los bencimidazoles y las dicarboximidias, entre otras. El uso prolongado y frecuente de estas sustancias activas ha contribuido a reducir su efectividad debido al desarrollo de fenómenos de resistencia. Recientemente, se están comercializando nuevos fungicidas de otras familias químicas como el ciprodinil, la fenhexamida, el fludioxonil, el pirimetanil y el tebuconazol, que muestran un alto nivel de efectividad contra las cepas de *Botrytis cinerea* resistentes [5]. Encuestas de campo realizadas recientemente entre los viticultores, los consejos reguladores de las distintas denominaciones de origen y los establecimientos destinados a la venta de productos fitosanitarios, ponen de manifiesto que los fungicidas más ampliamente utilizados en Galicia para el control y tratamiento de estas enfermedades son el azoxistrobin, la carbendazima, el cimoxanilo, el ciprodinil, la diclofluanida, la fenhexamida, el fludioxonil, el folpet, el metalaxil, el metiltiofanato, el penconazol, el pirimetanil, la procimidona, el tebuconazol y el vinclozolin. Casi la mitad de estas sustancias activas han mostrado efectos cancerígenos y/o sobre el sistema reproductor de los animales [6]. En el caso de la carbendazima y el metiltiofanato también se han observado efectos cancerígenos en nuestra especie. Por lo que respecta a los efectos ambientales cabe destacar que más de la mitad de estas sustancias presentan una movilidad alta o moderada en el suelo lo que facilita su dispersión en el medio físico natural. Además, en algunos casos se trata de sustancias altamente persistentes y bioacumulables en la cadena trófica [6].

Por ello, resulta interesante el estudio de las implicaciones alimentarias y agroambientales del uso de fungicidas en los viñedos.

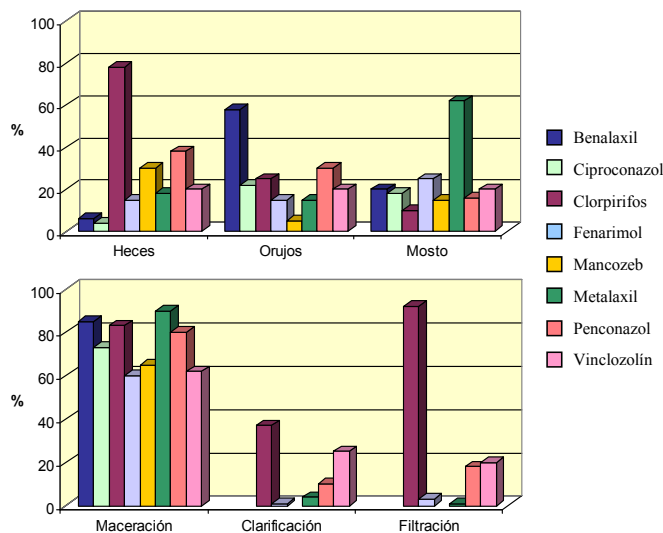
## **2.- IMPLICACIONES ALIMENTARIAS DE LOS RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN UVAS PARA VINIFICACIÓN Y VINO**

### **2.1.- Interacciones entre los fungicidas y el proceso de vinificación**

Si bien el empleo de fungicidas es primordial en la defensa de los cultivos, su utilización también conlleva ciertos riesgos directa o indirectamente. El uso abusivo de estos productos puede dar lugar a una acumulación de residuos del fungicida o de sus metabolitos de degradación en las uvas para vinificación. La concentración de residuos de fungicidas en uva depende del tipo de fungicida utilizado, de la dosis aplicada, del número de tratamientos, del tiempo transcurrido desde la última aplicación, del momento de la recolección, así como de factores de tipo mecánico, físico o químico [7]. En este sentido, los fungicidas de una misma familia química difieren en la dosis aplicada e incluso en los intervalos de desaparición de sus residuos [8]. Entre las anilino pirimidinas, el ciprodinil muestra una vida media en uva de 12 días mientras que el pirimetanil tiene una vida media de 57 días [9, 10]. Los fungicidas fluazinan y tebuconazol se degradan rápidamente en uva (entre 4 y 5 días) mientras que el azoxistrobin y el fludioxonil lo hacen más lentamente (entre 15 y 24 días, respectivamente) [9, 10].

La concentración de residuos de fungicidas en uvas para vinificación es determinante en la concentración final de estos compuestos en el vino. El paso de fungicidas de la uva al vino depende de las características químico-físicas de la materia activa y, en especial, de su solubilidad en agua y en la mezcla alcohol-agua. Los compuestos solubles en agua, como los benzimidazoles y el metalaxil, pasan en grandes cantidades mientras que los menos hidrosolubles, como las dicarboximidias, el penconazol, el mancozeb y la vinclozolina, lo hacen parcialmente [7, 11]. Pero además, la presencia de fungicidas en uvas para vinificación puede alterar la calidad final del vino. En ocasiones, los residuos de ciertos fungicidas pueden dar lugar a olores y/o sabores extraños en el vino debido a su naturaleza química [7]. Otras veces, las alteraciones organolépticas en los vinos se deben a que la actividad de la microflora fermentativa puede verse afectada por la presencia de estos residuos [8]. Por ello, el correcto manejo de los fungicidas y el respeto de los

periodos de supresión resulta primordial. Así, cuando los tratamientos fitosanitarios se interrumpen tres semanas antes de la vendimia se puede conducir sin problemas el proceso fermentativo, y es posible prolongar la maceración para una mayor extracción de polifenoles [12]. Por el contrario, cuando no se ha respetado este intervalo de tiempo, los residuos de fungicidas pueden interferir en el proceso fermentativo, modificar la calidad organoléptica e higiénico-sanitaria de los vinos y, por supuesto, provocar cierto riesgo para la salud del consumidor [7]. En aquellos casos en que se entorpece la finalización de la fermentación, el deseo de prolongarla puede dar lugar a una acidez volátil elevada, lo que es indeseable desde el punto de vista de la calidad del vino [12]. El efecto negativo de estos compuestos se incrementa a medida que aumenta la tasa de contaminación en el mosto [13-15].



**Figura 2. Porcentaje de residuos en heces, orujos y mosto tras el prensado y el trasiego (superior) y porcentaje de residuos remanentes tras la maceración y eliminados con la clarificación y la filtración (inferior).**

Si bien es cierto que la presencia de fungicidas puede afectar a la calidad final del vino también lo es que el proceso de vinificación puede reducir las tasas de contaminación (figura 2).

A partir de la entrada de la uva en la bodega tienen lugar distintos mecanismos de reducción de residuos como son la adsorción y posterior eliminación con los orujos y las heces, la hidrólisis ácida y la acción de las levaduras y las enzimas, entre otros [16]. Durante el proceso de vinificación

suele producirse una importante disminución del contenido en residuos, aunque variable en función del tipo de fungicida y las características del proceso de vinificación [11]. La importancia de la técnica de vinificación utilizada es obvia puesto que las diferentes etapas de maceración, prensado, desfangado, fermentación y clarificación pueden contribuir a la eliminación de estos compuestos [7, 17-30]. En general, se ha observado que los vinos blancos presentan tasas de contaminación más bajas que los vinos tintos puesto que para los primeros el proceso de extracción es más suave [14]. A modo de ejemplo, Cabras y colaboradores observaron un descenso notable de las tasas de contaminación de ciprodinil y fludioxonil en vino con respecto al valor inicial en uva, siendo del 80 % para el ciprodinil y del 70 % para el fludioxonil [9].

Con el fin de proteger la salud de los consumidores se ha regulado el uso de fungicidas y se han establecido límites máximos de residuos (LMRs). En la tabla 1 se recogen los LMRs de estos compuestos, en las uvas para vinificación, fijados por la legislación española a través del Real Decreto (R.D.) 280/1994 y sus posteriores modificaciones. Hay que resaltar que, a pesar de los efectos de estos compuestos en el vino, ni en España ni en la Unión Europea existe actualmente ningún documento normativo por el que se establezcan LMRs de fungicidas en el vino. Solo algunos países como Suiza han tomado la iniciativa de fijar sus propios LMRs [31]. En los otros países, entre ellos España, los niveles recomendables en vino han de estimarse teniendo en cuenta el porcentaje de materia prima inicialmente utilizado y los posibles efectos del proceso de vinificación sobre los fungicidas [16].

**Tabla 1. Límites máximos de residuos en uvas para vinificación, mosto y vino.**

<b>Fungicida</b>	<b>Uvas<sup>a</sup></b>	<b>Mosto<sup>b</sup></b>	<b>Vino<sup>b</sup></b>
Azoxistrobin	2	-	0.5
Carbendazima <sup>(1)</sup>	2	-	2
Cimoxanilo	0.2	-	-
Ciprodinil	2	-	0.5
Diclofluanida	10	1 <sup>(3)</sup>	1 <sup>(3)</sup>
Fenhexamida	5p	-	1.5
Fludioxonil	1	-	0.5
Folpet <sup>(2)</sup>	10	-	3
Metalaxil	1	-	0.6
Metiltiofanato <sup>(1)</sup>	2	-	2
Penconazol	0.2	-	-
Pirimetanil	5	-	1
Procimidona	5	-	2
Tebuconazol	2	0.3	0.3
Vinclozolin	5	-	1

<sup>(1)</sup>: suma de benomilo, carbendazima y metiltiofanato; <sup>(2)</sup>: suma de captan y folpet; <sup>(3)</sup>: suma de diclofluanida y dimetilaminosulfanilida; <sup>a</sup>: LMRs establecidos por el R.D. 280/1994 y sus posteriores modificaciones; <sup>b</sup>: LMRs establecidos por la legislación suiza; p: LMR provisional.

## **2.2.- Estimación de las tasas de contaminación por fungicidas de los vinos blancos**

Al ser el vino el producto final que llega al consumidor, es éste el producto que debe ofrecer unas ciertas garantías de calidad y seguridad. Los fungicidas antibottríticos, al ser aplicados en el último tratamiento de la vid antes de la vendimia son los más susceptibles de aparecer en el vino. Recientemente ha salido al mercado un nuevo producto fitosanitario, el Switch® que combina la acción de dos nuevos fungicidas, el ciprodinil y el fludioxonil, para el control y tratamiento de *Botrytis cinerea* en los viñedos. Con el fin de evaluar la presencia de ambos compuestos en muestras de vino se ha desarrollado un método analítico basado en la técnica de

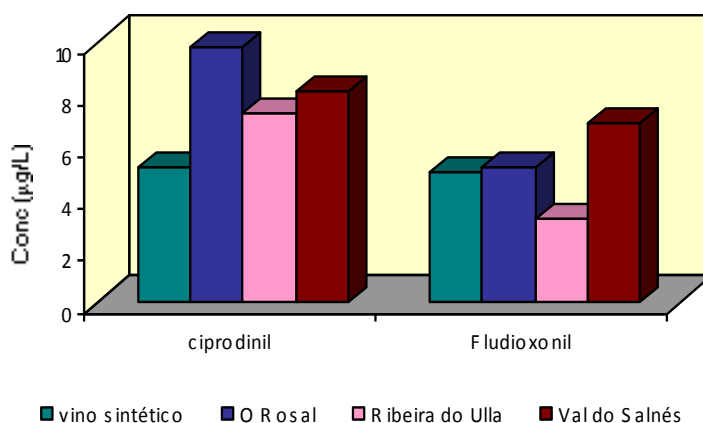


microextracción en fase sólida (SPME) seguida de una etapa de identificación y cuantificación por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS) [32]. La SPME permite extraer y concentrar los analitos simultáneamente utilizando una fibra de sílice fundida recubierta por una fase estacionaria en la que se adsorben los analitos [33]. Esta técnica comprende dos etapas: una primera etapa de extracción-adsorción, en la que tiene lugar el reparto de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase estacionaria de la fibra, y una segunda etapa de desorción, en la que los analitos se desorben térmicamente en el inyector del equipo cromatográfico.

Con el fin de maximizar la extracción de estos compuestos es necesario optimizar una serie de parámetros de la técnica tales como son la elección de la fibra, el volumen de muestra, la adición de sal, la temperatura y el tiempo de extracción, así como los parámetros de desorción. Todos estos ensayos se han llevado a cabo utilizando una matriz de vino sintético cuya composición simula la de un vino Rías Baixas [32]. Las mejores recuperaciones se obtienen al extraer 30 mL de muestra con la fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) en agitación y a temperatura ambiente durante 30 min y desorbiendo la fibra, posteriormente, en el inyector split/splitless del equipo cromatográfico a 240 °C durante 5 min. La separación e identificación cromatográfica de los compuestos se ha llevado a cabo en un cromatógrafo de gases equipado con una columna apolar MDN-5S (30 m x 0.25 mm d.i.; 0.25 µm de espesor) y un detector de espectrometría de masas (MS). Para aumentar la sensibilidad y selectividad del método se ha decidido trabajar en modo SIM o monitorización de unos pocos iones, eligiendo para la cuantificación aquellos fragmentos masa/carga más característicos [32]. El método propuesto resulta menos laborioso que otros existentes en la bibliografía consultada. El empleo de la SPME como técnica de extracción de los fungicidas evita además el manejo de disolventes orgánicos como el diclorometano [34, 35] y permite la cuantificación de estos compuestos a niveles de 0.2 y 2 mg/L para ciprodinil y fludioxonil, respectivamente. Cabe resaltar que estos niveles de cuantificación son inferiores a los obtenidos con otros métodos de análisis que sitúan estos límites entre 10 y 100 mg/L [5, 34-36].

Antes de proceder al análisis de muestras reales, se ha evaluado la existencia de efecto matriz. Para ello, se han analizado, por triplicado, muestras enriquecidas de vino sintético y vino real libre de pesticidas. Tal y como se muestra en la figura 3, la cuantificación de las muestras reales conduce a resultados que difieren entre sí y con los resultados obtenidos para

el vino sintético. Este hecho pone de manifiesto la existencia de efecto matriz y que este efecto varía según la subzona de producción. Esto podría explicarse en base a la presencia de compuestos coextraídos desde la muestra junto con nuestros analitos y que posteriormente interfieren en el proceso de ionización de la muestra en el detector de espectrometría de masas, bien aumentando o disminuyendo la intensidad de la ionización. Con el fin de evitar la existencia de efecto matriz, a la hora de cuantificar las muestras, se ha recurrido al método de la adición estándar.



**Figura 3. Concentraciones medias de ciprodinil y fludioxonil en muestras enriquecidas de vino sintético y vino comercial Rías Baixas, a niveles de 5 µg/L, determinadas por el método SPME/GC-MS propuesto.**

El método SPME/GC-MS se ha aplicado al análisis de vinos blancos comerciales de la D.O. Rías Baixas para evaluar las tasas de contaminación por ciprodinil y fludioxonil de estos vinos. Al analizar un total de 15 muestras de vino, facilitadas por el Consello Regulador de esta denominación y procedentes de las cinco subzonas de producción, se ha observado que la mayoría de los vinos analizados presentan residuos de ambos compuestos en concentraciones inferiores a los 5 µg/L (tabla 2). Sin embargo, un porcentaje importante de las muestras, el 13 %, presenta residuos de estos compuestos a niveles entre 15 y 30 µg/L. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores como Scarponi y Martinetti que encontraron residuos del orden de 32 µg/L en vinos blancos y rosados de Italia [35]. Cabe señalar que estos valores no son alarmantes

puesto que, en todos los casos, son inferiores a los LMRs fijados por la Legislación Suiza (500 µg/L).

Diversos estudios recomiendan un consumo moderado de vino tinto para prevenir enfermedades cardiovasculares e incluso alzheimer. Si esto se extrapola a los vinos blancos y se tiene en cuenta que la ingesta diaria admisible (IDA) del ciprodinil es de 37.5 µg/kg/día [6], en el caso de un hombre tipo de 70 kg de peso, la ingesta máxima sería de 2.6 mg/día.

**Tabla 2. Análisis de vinos blancos comerciales de la D.O. Rías Baixas por el método SPME/GC-MS propuesto.**

Subzona Rías Baixas	Muestras	Conc (µg/L) ± SD	
		Ciprodinil	Fludioxonil
O Rosal	A	24.7± 0.7	10.3± 1.2
	B	n.d.	n.d.
	C	5.6± 0.1	13.0± 0.9
Val do Salnés	D	n.d.	n.d.
	E	3.9± 0.4	2.5± 0.1
	F	1.8± 0.1	2.4± 0.5
	G	7.8± 0.7	16.2± 1.1
	H	3.0± 0.2	7.9± 0.5
	I	7.7± 0.4	15.4± 0.5
Condado do Tea	J	10.3± 1.0	4.0± 0.5
	K	0.9± 0.2	n.c.
	L	1.5± 0.2	2.7± 0.6
Ribeira do Ulla	M	24.9± 0.4	28.6± 0.6
	N	n.d.	n.c.
Soutomaior	O	2.2± 0.4	2.6± 0.8

n.d.: no detectado; n.c.: no cuantificado

Por lo tanto, el consumo de 2 copas (240 mL) de un vino que contenga ciprodinil a niveles de 30 µg/L supone un aporte del 0.3 % de la IDA. A la vista de estos resultados podemos concluir que el consumo moderado de vino no representa un problema serio desde el punto de vista de la salud pública. No obstante son necesarios nuevos estudios para determinar la influencia de estas concentraciones de fungicida en la calidad organoléptica del vino. Por otra parte, si se asume que el proceso de vinificación reduce en un 80 % los niveles de ciprodinil y en un 70 % los niveles de fludioxonil [9], los datos obtenidos en vino equivaldrían a niveles de partida en uva inferiores a 0.13 y 0.1 mg/Kg para ciprodinil y fludioxonil, respectivamente. Estos niveles de contaminación en uva son inferiores a los LMRs establecidos por el R.D. 280/1994 y sus posteriores modificaciones (2

y 1 mg/Kg, respectivamente) y, por tanto, los vinos habrían sido elaborados a partir de uva apta para la vinificación.

### **2.3.- Monitorización de residuos de fungicidas en las uvas para vinificación**

La existencia de residuos de fungicidas en los vinos analizados, aunque a niveles no alarmantes, pone de manifiesto la presencia de estos compuestos en las uvas de vinificación. La problemática asociada a la existencia de estas sustancias en uvas y sus consiguientes implicaciones en el proceso de vinificación hace oportuna la determinación de estos residuos en uvas. Por otra parte, dado que la calidad de la materia prima condiciona la calidad del producto final y que la legislación española y europea establecen LMRs de estos compuestos en uvas para vinificación y no en vinos, se ha decidido evaluar la calidad higiénico-sanitaria de las uvas blancas para vinificación en el momento previo a su recolección. A la hora de desarrollar este objetivo y, dado que las bodegas necesitan herramientas analíticas para la determinación de fungicidas en uvas que les permita evaluar si la uva de la que disponen cumple la legislación establecida o, si por el contrario, se exceden los LMRs, se ha propuesto un método de análisis por cromatografía de líquidos con detector de fotodiodos (HPLC-DAD) [37] y un método de confirmación por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS) [38] para las 15 sustancias activas más ampliamente utilizadas en los viñedos gallegos en el control y tratamiento de mildiu, oidio y botrytis.

La extracción de los fungicidas desde la matriz de uva conlleva el uso de la mezcla de diclorometano/acetona (75/25, v/v). Esta mezcla de disolventes ya ha sido propuesta por otros autores aunque en diferente proporción (50/50, v/v) [34], sin embargo estudios llevados a cabo con diclorometano/acetona (25/75; 50/50 y 75/25, v/v) confirman que la proporción (75/25, v/v) es la más adecuada, por ser la que conduce a mayores recuperaciones absolutas [37]. Tras la extracción de la muestra de uva durante 5 minutos, una alícuota del extracto orgánico (20 mL) se puede llevar a sequedad y a continuación redisolverse en acetonitrilo para su inyección en el equipo HPLC-DAD. Sin embargo, los extractos orgánicos de uva presentan numerosos compuestos interferentes lo que dificulta la determinación de aquellos fungicidas más polares. Por ello, es necesario incluir una etapa de purificación de la muestra por extracción en fase sólida (SPE). Se han probado diferentes fases estacionarias comprobando que los

mejores resultados se obtienen con la minicolumna de sílica la cual presenta recuperaciones entorno al 100 % para todos los compuestos excepto para el metiltiofanato, en cuyo caso se recomienda el uso de las fases amino o ciano (tabla 3). Por tanto, el extracto de uva se pasa a través de una minicolumna de sílica y los fungicidas retenidos se eluyen con 5 mL de una mezcla de diclorometano/acetona (50/50, v/v). A continuación, el eluato se evapora a sequedad y finalmente se redisuelve en acetonitrilo para su inyección en el equipo de HPLC-DAD. Para obtener una correcta separación de los fungicidas es necesario emplear como fase móvil acetonitrilo/agua grado HPLC y una columna Ultracarb ODS 30 (250 mm x 4.6 mm d.i.; 5 µm) termostatazada a 40 °C [37]. Por otra parte, el extracto orgánico de uva se puede llevar a sequedad y redisolver en acetato de etilo para su inyección directa en el equipo de GC-MS, dado que la especificidad de este detector permite eliminar la etapa de purificación de la muestra [38]. Al analizar, por duplicado, muestras de uva blanca enriquecida, de distinta procedencia y libres de los fungicidas objeto de estudio, se ha observado la existencia de efecto matriz por ello, a la hora de cuantificar las muestras, se ha aplicado el método de la adición estándar.

**Table 3. Eficacia de diferentes fases estacionarias en la purificación de extractos orgánicos de uva blanca.**

Fungicidas	Fase estacionaria de la minicolumna SPE (% Recuperación)						
	Amino	Ciano	Diol	Alumina ácida	Alúmina neutra	Alúmina neutra	Sílica
Azoxistrobin	129	110	83	112	>150	>150	99
Carbendazima	83	77	93	27	–	–	70
Cimoxanilo	97	92	94	–	–	–	92
Ciprodinil	85	94	103	113	>150	>150	103
Diclofluanida	–	39	30	15	–	–	101
Fenhexamida	–	65	102	–	–	–	84
Fludioxonil	90	89	105	111	>150	–	98
Folpet	–	38	31	–	–	–	112
Metalaxil	104	103	97	102	>150	142	102
Metiltiofanato	114	120	–	–	–	–	–
Pirimetanil	88	103	100	111	>150	>150	101
Penconazol	102	108	106	77	>150	–	103
Procimidona	118	>150	>150	116	>150	>150	85
Vinclozolin	–	28	35	72	–	49	117

(n=2) determinaciones. –: no recuperado.

Finalmente, el método propuesto se ha aplicado al análisis de muestras de uva blanca para vinificación de la D.O. Rías Baixas recogidas, en el momento de la vendimia, mediante un muestreo aleatorio estratificado realizado en tres bodegas representativas y de mayor producción de las subzonas Val do Salnés, O Rosal y Condado do Tea. Tal y como se observa en la tabla 4, la mayoría de las muestras presentan residuos de varios fungicidas a niveles entre 0.1 y 2.4 mg/Kg. Los valores obtenidos son superiores a los encontrados por otros autores como Cabras y Angioni [8] o Flori y Brunelli [39] los cuales afirman que en el momento de la vendimia los residuos de fungicidas en uva son muy bajos o prácticamente no determinables.

**Tabla 4. Análisis de uvas blancas producidas en la D.O. Rías Baixas.**

Fungicidas	LMRs (mg/Kg)	albariño						loureira		treixadura	
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Azoxistrobin	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbendazima <sup>(1)</sup>	2	-	-	-	-	-	-	n.c.	-	-	-
Cimoxanilo	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprodinil	2	-	0.1	0.4	-	0.1	0.3	1.5	0.4	0.5	0.5
Diclofluánida	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenhexamida	5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fludioxonil	1	-	0.2	0.3	-	0.1	0.2	0.6	0.2	0.4	0.2
Folpet <sup>(2)</sup>	10	-	0.1	0.4	-	-	-	-	-	-	-
Metalaxil	1	-	-	0.2	-	-	0.1	-	-	0.1	-
Metiltiofanato <sup>(1)</sup>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penconazol	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pirimetanil	5	-	-	-	-	n.c.	n.c.	2.3	0.2	-	0.2
Procimidona	5	-	2.4	-	-	0.1	-	-	-	-	-
Vinclozolin	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tebuconazol	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: no detectado (límite de detección 1 - 7 µg/Kg); n.c.: no cuantificado (límite de cuantificación 2 – 150 µg/Kg); <sup>(1)</sup>: suma de benomilo, carbendazima y metiltiofanato; <sup>(2)</sup>: suma de captan y folpet.

Hay que destacar que el ciprodinil y el fludioxonil son los compuestos que aparecen en un mayor número de muestras, concretamente en el 80 % de las muestras analizadas. Además aparecen conjuntamente por la aplicación del producto fitosanitario Switch®, ampliamente utilizado en esta denominación de origen para el control de *Botrytis cinerea*. En base a los bajos niveles encontrados para estos dos compuestos podría ser posible un recorte del intervalo de seguridad indicado por el fabricante entre el tratamiento y la vendimia. No obstante, en el caso concreto de la muestra G se observan residuos a concentraciones muy próximas al LMR. Teniendo en cuenta que el ciprodinil se aplica en mayor concentración que el fludioxonil y que la vida media de estos compuestos en uva es de 12 y 24 días, respectivamente [9], en el momento de la recolección, es decir 21 días después del último tratamiento, la concentración de fludioxonil debería ser mayor que la concentración de ciprodinil (figura 4). Sin embargo, en la muestra G se observa lo contrario lo que hace suponer que no se han respetado los plazos de seguridad, es decir, que las uvas han sido recogidas antes de los 12 días posteriores al último tratamiento.

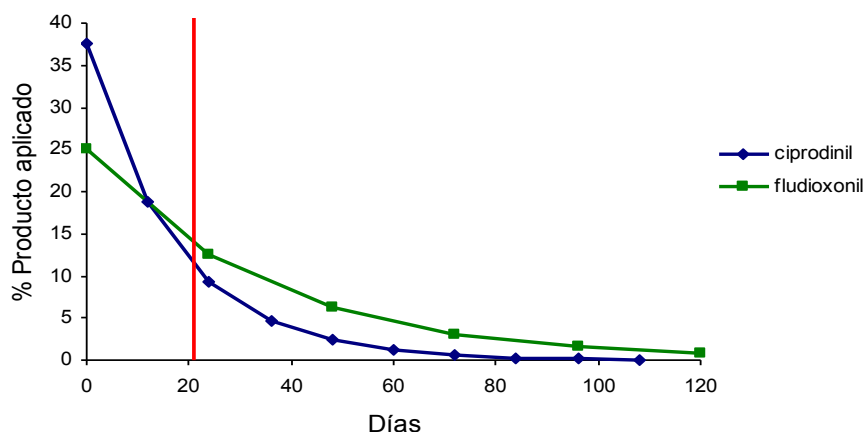


Figura 4. Curvas de desaparición de ciprodinil y fludioxonil.

### 3.- IMPLICACIONES AGRARIAS DE LOS DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN LOS SUELOS DE CULTIVO

#### 3.1.- Efectos ambientales del uso de fungicidas

A pesar de que los fungicidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, lo cierto es que el uso de estos productos puede tener importantes implicaciones agrarias y medioambientales. Si bien la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) afirma que el uso correcto de los mismos no entraña riesgos para la degradación del medioambiente, lo cierto es que se han detectado residuos de estos compuestos incluso lejos de su ámbito de aplicación ya sea en cursos de agua, en aguas freáticas o en sedimentos [40]. Por ello, la introducción de nuevos productos de uso agrícola en el mercado ha sido objeto de controles crecientes. Se pretende evitar así el empleo de estos productos en tanto no haya evidencias científicas de que, utilizados de acuerdo con sus instrucciones de uso, son seguros para el operador, el consumidor y el medioambiente. Entre los efectos ambientales asociados al uso de fungicidas caben resaltar la contaminación de los suelos y los cursos de agua, la aparición de fenómenos de resistencia y bioconcentración, la alteración de los equilibrios existentes en la cadena trófica y la desaparición de enemigos naturales de las plagas, entre otros. Tal y como se muestra en la figura 5, las aguas contaminadas expanden el tóxico a la flora y a la fauna produciendo la





mayor, disminuyendo su fertilidad y pudiendo convertirse en un suelo no apto para el cultivo. La degradación de los fungicidas en el suelo puede llevarse a cabo mediante procesos biológicos o no biológicos.

- ✓ Biológicos. Los productos fitosanitarios pueden ser digeridos por el metabolismo enzimático de los microorganismos del suelo, degradándose, en muchos casos, a moléculas más sencillas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , etc.) y perdiendo, de este modo, sus posibilidades de contaminación.
- ✓ No biológicos. Las reacciones más importantes son la oxidación, la hidrólisis y la degradación fotoquímica. Los productos resultantes de la hidrólisis pueden presentar riesgos de contaminación para la capa freática ya que a veces son más tóxicos que la molécula de partida. Numerosos fungicidas se degradan por reacciones fotoquímicas provocadas especialmente por la radiación ultravioleta. La degradación fotoquímica está limitada por la ausencia de luz solar una vez que el producto es incorporado al suelo.

La vida media de los fungicidas está condicionada por su formulación química (muchos fungicidas orgánicos son biodegradables y su actividad dura unas pocas semanas o meses, mientras que los fungicidas inorgánicos son más persistentes), por su concentración y por el tipo de preparación aplicada (los productos aplicados en emulsiones se descomponen en la mitad de tiempo que si se aplican en forma de agregados). Las características del suelo también influyen en la vida media de estos productos, de tal forma que la persistencia aumenta, y por tanto el riesgo de contaminación, con el contenido en materia orgánica del suelo mediante procesos de adsorción; el contenido en arcillas; el contenido en humedad del suelo, para los compuestos solubles en agua; la acidez del suelo, para pesticidas con posibilidad de protonación ya que la adsorción es más alta; el pH del suelo, para productos que den lugar a formas aniónicas mucho más estables que en forma no ionizada; y el descenso de la temperatura, ya que decrece la actividad microbiana.

La persistencia del producto más allá del tiempo necesario para acabar con la plaga se considera una característica no deseable, ya que su uso continuado podría provocar la acumulación de residuos hasta niveles potencialmente tóxicos, lo que afectaría a la fertilidad del suelo y al medioambiente. Ahora bien, sintetizar nuevos fungicidas cuya degradación sea más rápida no resulta sencillo. Un aspecto a considerar es que estos productos, al ser menos eficaces, pueden exigir mayor número de

tratamientos, lo que incide tanto sobre el medio como sobre la rentabilidad. Otro aspecto a tener en cuenta es que la inactivación del producto por degradación no asegura su mineralización y puede ocurrir que sus metabolitos sean iguales o más tóxicos que el producto de partida.

Una vez en el suelo, el producto puede quedar retenido mediante procesos de adsorción o bien puede dispersarse a través de distintos mecanismos como son la movilidad, la absorción por la planta, la volatilización y el lavado [41, 43].

□ Adsorción: los fenómenos de adsorción afectan tanto a los fungicidas como a sus metabolitos y constituye uno de los mecanismos más importantes de retención de fungicidas en el suelo. La adsorción de fungicidas se verá afectada por la naturaleza y tamaño molecular del pesticida así como por el contenido en materia orgánica y arcillas del suelo [40]. Si la adsorción es muy baja el producto será muy móvil pudiendo pasar a las aguas freáticas mientras que las adsorciones muy altas hacen que el elemento sea tan inmóvil que puede llegar a perder su actividad biológica útil, lo que ocurre en suelos con contenidos muy altos en materia orgánica.

□ Movilidad: otro aspecto a tener en cuenta es la movilidad de los fungicidas en el interior del suelo. Su movilidad dependerá de los siguientes aspectos [41]:

▪ *La textura del suelo*, es decir, la proporción relativa de arena, limo y arcilla. Los productos fitosanitarios tienden a ser adsorbidos por las arcillas y la materia orgánica. Los suelos de textura arenosa o franca generalmente permiten que el agua se mueva rápidamente a través de ellos dando pocas oportunidades para la adsorción. Sin embargo, los suelos de textura fina obligan a la disminución de la velocidad del flujo de agua, así como a una mayor adsorción de los fungicidas sobre las arcillas.

▪ *La permeabilidad del suelo* da idea de la velocidad con la que el agua se mueve en el suelo. En aquellos suelos muy permeables, el lavado se realiza fácilmente, con el consiguiente riesgo de contaminación de las aguas subterráneas.

▪ *El contenido en materia orgánica del suelo* que afecta, por una parte, aumentando la capacidad de retención de agua del suelo, y por otra, adsorbiendo algunos fungicidas.

□ Absorción por la planta: los fungicidas pueden pasar a la solución del suelo, quedando así a disposición de las plantas o fauna del suelo. Una vez acumulados en la planta pueden conservar su estructura química original o alterarse como consecuencia de su metabolismo.

□ Volatilización: las pérdidas de fungicida por volatilización tienen lugar en las capas más superficiales del suelo. Estas pérdidas son muy variables, desde insignificantes a más de un 50 % de lo aplicado, dependiendo de la porosidad del suelo, del contenido en materia orgánica, de la humedad del suelo, de la temperatura, de las condiciones de aplicación y del tipo de fungicida.

□ Lavado: los fungicidas incorporados al suelo pueden ser lavados del mismo, en profundidad o lateralmente, y pasar a las aguas freáticas. Los factores que determinan este arrastre son la formulación del producto (los compuestos más solubles presentan mayor movilidad), las características del suelo (los suelos con mayor capacidad de cambio disminuyen la lixiviación) y la pluviometría (en igualdad de condiciones, a mayor pluviometría mayor lixiviación).

De lo dicho anteriormente se deduce que en materia de suelos contaminados, es necesaria una actuación inmediata y precisa. Sin embargo, la legislación actual no está suficientemente desarrollada en lo que a establecimiento de estándares para la evaluación de suelos contaminados y el listado de actividades contaminantes se refiere. Uno de los países que actúa como referente en temas de protección ambiental es Holanda. Este país mantiene en vigencia una normativa provisional desde 1998, que es su Ley de Protección del Suelo en donde se establecen las características para distinguir un suelo contaminado y las medidas de actuación ante emplazamientos contaminados. Los actuales valores de referencia holandeses se encuentran recogidos en “*Circular on target values and intervention values for soil remediation*”, de febrero de 2000 [44]. En dicho documento se establecen valores de referencia (concentración por debajo de la cual los compuestos no afectan a las propiedades naturales del suelo) y valores de intervención (concentración máxima tolerable por encima de la cual son necesarias labores de descontaminación) para ciertos pesticidas entre los que se incluye un único fungicida, el maneb.

En España, en marzo de 1994, se promulgó la Ley Orgánica por la que se adoptan las directrices para la redacción del Plan de Recuperación de Suelos Contaminados aprobado por el Consejo de Ministros el 17 de febrero de 1995, con vigencia por el período 1995 – 2005. En dicho documento se indicaba que se habían detectado 4532 emplazamientos potencialmente contaminados por razón del tipo de contaminante, su concentración y potencial de dispersión, el sistema biofísico y antrópico en el que se encontraban y la vulnerabilidad de estos medios. El 21 de abril de 1998, se aprobó la Ley 10/1998 de Residuos en donde se establece el concepto de

suelo contaminado definiéndolo como aquel cuyas características químicas, físicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes de carácter peligroso de origen humano en concentración tal que comporte un riesgo para la salud humana o el medio ambiente, de acuerdo con los criterios y estándares que determine el Gobierno. Sin embargo, cinco años después de la aprobación de esta ley, todavía no existe un listado de las industrias que pueden ser contaminantes de los suelos ni se han establecido los criterios y estándares para elaborar el mapa de suelos contaminados o poner en marcha las políticas de descontaminación de los mismos. En los últimos años, ante el evidente vacío existente en el Estado Español, algunas Comunidades Autónomas han aplicado o están aplicando criterios aprobados por otros países de la Unión Europea. Sin embargo, estos documentos autonómicos no están suficientemente desarrollados y sólo establecen valores de referencia para los compuestos de la familia del hexaclorociclohexano.

### **3.2.- Presencia de residuos de fungicidas en los suelos de viñedo**

Si bien es cierto que en España no existe una legislación específica por la que se establezcan valores tolerables de fungicidas en suelo, las implicaciones agrarias de su presencia hace necesario el control de estas sustancias en suelo con el fin de evaluar su aptitud para el cultivo. A la hora de estimar las tasas de contaminación por fungicidas de los suelos de viñedo se propone un método basado en la extracción con un disolvente orgánico y posterior determinación por GC-MS [45]. Para facilitar la liberación de los fungicidas desde la matriz del suelo y su paso hacia el disolvente orgánico la muestra se trata en ultrasonidos en presencia de una fase acuosa. Además, se han optimizado una serie de parámetros de la técnica tales como el efecto de mantener la matriz del suelo durante toda la extracción, el pH de la fase acuosa y su volumen, el disolvente orgánico de extracción y su volumen y el tiempo de extracción. Las mayores recuperaciones se obtienen al tratar la muestra de suelo con agua destilada (5 mL) en ultrasonidos durante 10 min y al extraer posteriormente la mezcla suelo-agua con acetato de etilo (10 mL) durante 45 min. La separación e identificación de los compuestos se ha llevado a cabo en un cromatógrafo de gases equipado con una columna apolar MDN-5S (30 m x 0.25 mm d.i.; 0.25 µm de espesor) y un detector de espectrometría de masas operando en modo SIM. El método propuesto resulta más rápido y menos laborioso que otros existentes en la bibliografía

consultada en los que el suelo se extrae por calentamiento a refluo durante varias horas o incluyen distintas etapas de partición y purificación de la muestra, previas a su análisis [46-60].

A la hora de conocer cómo influye la matriz de la muestra en el proceso de cuantificación, el método propuesto se ha aplicado al análisis de suelos con propiedades químico-físicas diferentes y libres de los fungicidas objeto de estudio. Para ello, se han analizado, por triplicado, 7 muestras de suelo sobrecargadas obteniendo los valores que se recogen en la tabla 5. Diferencias significativas se pueden observar entre las distintas muestras, comprobando que las mejores recuperaciones se obtienen para el suelo A el cual posee un pH en torno a 7, mientras que el resto de las muestras son más ácidas, con un pH en torno a 4 o 5. Esto puede explicarse en base a la gran capacidad tampón del suelo que modifica el pH de la fase acuosa durante el proceso de extracción y, como se ha confirmado en estudios previos, a pH ácido disminuyen los porcentajes de recuperación. Para evitar este efecto del pH del suelo, y garantizar un medio alcalino durante todo el proceso de extracción de la muestra, se han sustituido los 5 mL de agua destilada por 15 mL de un tampón de pH=8 compuesto por carbonato cálcico y polifosfato sódico. Al realizar de nuevo el estudio del efecto matriz sustituyendo el agua destilada por este tampón se obtienen recuperaciones más elevadas y más constantes (tabla 6). Sin embargo, aún se observan diferencias significativas entre los valores obtenidos para los diferentes suelos, hecho que pone de manifiesto la existencia de efecto matriz. Cabe resaltar que la recuperación de la diclofluanida fue en todos los casos muy baja lo cual puede ser atribuido a procesos de hidrólisis, tal y como apuntan otros investigadores [6, 61].

**Tabla 5. Recuperación media (%) y desviación estándar de fungicidas desde muestras de suelo sobrecargadas a niveles de 0.25 mg/Kg para cada compuesto excepto para la diclofluanida (1 mg/Kg), empleando agua destilada como fase acuosa**

Fungicidas	A	B	C	D	E	F	G
Ciprodinil	78 ± 3 <sup>a</sup>	63 ± 5 <sup>b,c</sup>	56 ± 9 <sup>c,d</sup>	71 ± 9 <sup>a,b</sup>	68 ± 2 <sup>a,b</sup>	30 ± 2 <sup>e</sup>	46 ± 2 <sup>d</sup>
Diclofluanida	4 ± 2 <sup>e</sup>	29 ± 2 <sup>b</sup>	4 ± 2 <sup>e</sup>	40 ± 2 <sup>a</sup>	27 ± 2 <sup>b</sup>	12 ± 2 <sup>d</sup>	17 ± 2 <sup>c</sup>
Fludioxonil	60 ± 2 <sup>a</sup>	29 ± 8 <sup>c,d</sup>	32 ± 4 <sup>c,d</sup>	39 ± 2 <sup>b,c</sup>	47 ± 4 <sup>b</sup>	26 ± 2 <sup>d</sup>	14 ± 2 <sup>e</sup>
Metalaxyl	94 ± 2 <sup>a</sup>	83 ± 2 <sup>b</sup>	89 ± 2 <sup>a,b</sup>	84 ± 6 <sup>b</sup>	88 ± 2 <sup>a,b</sup>	35 ± 6 <sup>d</sup>	50 ± 2 <sup>c</sup>
Penconazol	70 ± 2 <sup>a</sup>	16 ± 6 <sup>c</sup>	27 ± 2 <sup>b,c</sup>	47 ± 10 <sup>a,b</sup>	33 ± 2 <sup>b,c</sup>	12 ± 3 <sup>c</sup>	27 ± 8 <sup>c</sup>
Pirimetamil	65 ± 2 <sup>a,b</sup>	68 ± 2 <sup>a</sup>	61 ± 2 <sup>c</sup>	60 ± 3 <sup>c</sup>	63 ± 2 <sup>b,c</sup>	23 ± 2 <sup>e</sup>	34 ± 2 <sup>d</sup>
Procimidona	88 ± 3 <sup>a</sup>	44 ± 2 <sup>d</sup>	44 ± 4 <sup>d</sup>	70 ± 5 <sup>b</sup>	56 ± 3 <sup>c</sup>	14 ± 2 <sup>f</sup>	27 ± 3 <sup>e</sup>
Tebuconazol	68 ± 2 <sup>a</sup>	14 ± 2 <sup>c,d</sup>	26 ± 7 <sup>b,c</sup>	30 ± 11 <sup>b</sup>	35 ± 6 <sup>b</sup>	11 ± 2 <sup>d</sup>	10 ± 2 <sup>d</sup>
Vinclozolin	93 ± 3 <sup>a</sup>	92 ± 4 <sup>a</sup>	55 ± 5 <sup>b</sup>	93 ± 3 <sup>a</sup>	96 ± 2 <sup>a</sup>	25 ± 2 <sup>d</sup>	36 ± 2 <sup>c</sup>

. (n=3) número de determinaciones; <sup>a</sup> to <sup>f</sup>: suelos agrupados desde alto a bajo porcentaje de recuperación para un fungicida dado aplicando un test multirango basado en la comparación de pares por la t de Student.

Tal y como se puede observar en la tabla 6, la recuperación de fludioxonil resultó ser de aproximadamente el 100 % para el suelo A y entre el 60 y el 90 % para el resto de los suelos. Sin embargo, los otros fungicidas estudiados muestran porcentajes de recuperación de aproximadamente el 100 % desde las siete muestras de suelo, a pesar de pertenecer a familias químicas diferentes. Este comportamiento distinto podría explicarse en base a que el fludioxonil es el único fenilpirrol y además posee una estructura plana y un pKa > 13 mientras que los otros compuestos no poseen estructuras planas y su pKa está comprendido entre 5 y 6. Otros autores apuntan a que el contenido en calcio cambiante del suelo juega un papel muy importante en la recuperación de los pesticidas.

**Tabla 6. Recuperación media (%) y desviación estándar de fungicidas desde muestras de suelo sobrecargadas a niveles de 0.25 mg/Kg para cada compuesto excepto para la diclofluanida (1 mg/Kg), empleando un tampón de pH 8 como fase acuosa.**

	A	B	C	D	E	F	G
Ciprodinil	113 ±15 <sup>a</sup>	$\frac{10}{8}$ ±19 <sup>..ab</sup>	112 ±3 <sup>..ab</sup>	124 ±6 <sup>a</sup>	108 ±7 <sup>..ab</sup>	92 ±2 <sup>..bc</sup>	80 ±5 <sup>c</sup>
Diclofluanida	14 ±13 <sup>d</sup>	35 ±3 <sup>a</sup>	3 ±26 <sup>c</sup>	19 ±9 <sup>c</sup>	23 ±3 <sup>b</sup>	24 ±2 <sup>b</sup>	24 ±3 <sup>b</sup>
Fludioxonil	94 ±6 <sup>a</sup>	74 ±10 <sup>..cd</sup>	88 ±9 <sup>..ab</sup>	82 ±2 <sup>..bc</sup>	79 ±4 <sup>..bcd</sup>	72 ±3 <sup>..dc</sup>	62 ±5 <sup>c</sup>
Metalaxil	121 ±5 <sup>..bc</sup>	$\frac{11}{0}$ ±8 <sup>d</sup>	127 ±4 <sup>..ab</sup>	132 ±2 <sup>a</sup>	111 ±3 <sup>..cd</sup>	105 ±3 <sup>d</sup>	96 ±3 <sup>c</sup>
Penconazol	116 ±2 <sup>a</sup>	$\frac{10}{4}$ ±3 <sup>b</sup>	100 ±7 <sup>b</sup>	100 ±5 <sup>b</sup>	107 ±2 <sup>b</sup>	84 ±3 <sup>c</sup>	74 ±7 <sup>d</sup>
Primetanil	105 ±11 <sup>..bcd</sup>	$\frac{11}{5}$ ±9 <sup>..ab</sup>	119 ±3 <sup>b</sup>	110 ±2 <sup>..abc</sup>	101 ±5 <sup>..cd</sup>	95 ±3 <sup>..dc</sup>	86 ±3 <sup>c</sup>
Procimidona	98 ±16 <sup>a</sup>	95 ±17 <sup>..a</sup>	97 ±11 <sup>..a</sup>	86 ±4 <sup>..ab</sup>	90 ±3 <sup>..ab</sup>	73 ±3 <sup>..bc</sup>	63 ±3 <sup>c</sup>
Tebuconazol	109 ±2 <sup>..bc</sup>	$\frac{10}{0}$ ±7 <sup>c</sup>	114 ±9 <sup>..ab</sup>	120 ±2 <sup>a</sup>	101 ±2 <sup>c</sup>	91 ±2 <sup>d</sup>	75 ±3 <sup>c</sup>
Vinclozolin	95 ±5 <sup>b</sup>	$\frac{11}{5}$ ±10 <sup>a</sup>	76 ±9 <sup>c</sup>	108 ±2 <sup>..ab</sup>	114 ±9 <sup>a</sup>	60 ±13 <sup>d</sup>	76 ±8 <sup>b</sup>

(n=3) número de determinaciones; <sup>a</sup> to <sup>f</sup>: suelos agrupados desde alto a bajo porcentaje de recuperación para un fungicida dado aplicando un test multirango basado en la comparación de pares por la t de Student.

Mortland observó este efecto en la desorción de 3-aminotriazol, viendo que los complejos coloide-Ca-herbicida eran menos estables que los complejos formados con otros elementos presentes en la muestra como cationes metálicos cambiables [62]. En nuestro caso, sólo se observó la existencia de una correlación entre el porcentaje de recuperación y el contenido en cambiable calcio del suelo en el caso del fludioxonil [45]. El encalado de los suelos ácidos puede tener el mismo efecto, facilitando la movilidad del fungicida y contribuyendo así a magnificar su actividad fitotóxica e incluso pudiendo contaminar las aguas. Dado que las propiedades químico-físicas del suelo influyen en la recuperación de los fungicidas, a la hora de cuantificar residuos de estos compuestos en muestras de suelo se ha decidido recurrir al método de la adición estándar.

Cuando el método propuesto se aplica al análisis de suelos de viñedo recogidos en la D.O. Rías Baixas, concretamente en la subzona Val do Salnés nueve meses después del último tratamiento, se observa la presencia de residuos de alguno de los fungicidas objeto de estudio aunque en concentraciones inferiores a los 52 µg/Kg (tabla 7). Concentraciones mayores son encontradas cuando el suelo se analiza sólo 1 mes después del último tratamiento (Octubre de 2003). Los fungicidas ciprodinil y



fludioxonil están presentes en todas las muestras analizadas, apareciendo el fludioxonil en concentraciones mayores que las del ciprodinil a pesar de que en el producto comercial Switch® éste se encuentra en menor proporción. Si los resultados obtenidos se comparan con el valor de intervención en suelo fijado por la Legislación Holandesa para el maneb (35 mg/Kg de suelo seco), podemos concluir que los niveles de residuos encontrados no son alarmantes puesto que las propiedades del suelo para las personas, las plantas y la vida animal no se verían comprometidas.

**Tabla 7. Presencia de fungicidas en muestras de suelo de viñedo de la D.O. Rías Baixas.**

<b>Fungicidas (µg/Kg)</b>	<b>Suelo 1 Oct. 03</b>	<b>Suelo 1 Mayo 03</b>	<b>Suelo 2 Mayo 03</b>	<b>Suelo 3 Mayo 03</b>	<b>Suelo 4 Mayo 03</b>
Ciprodinil	260	LD	LC	LC	LD
Diclofluanida	-	-	-	-	-
Fludioxonil	991	LC	45	52	LC
Metalaxil	-	-	LD	-	LD
Penconazol	-	-	-	-	-
Pirimetamil	-	-	-	-	-
Procimidona	20	LD	-	-	LD
Tebuconazol	12	-	LD	-	LC
Vinclozolin	-	-	-	-	-

-: no detectado; LD o LC: detectado a niveles del límite de detección o cuantificación, respectivamente. (LD= 60 µg/Kg para diclofluanida; entre 2 y 10 µg/Kg para metalaxil, ciprodinil y tebuconazol; y entre 10 y 20 µg/Kg para el resto. LC= 200 µg/Kg para diclofluanida; entre 5 y 25 µg/Kg para metalaxil, ciprodinil y tebuconazol; y entre 30 y 50 µg/Kg para el resto).

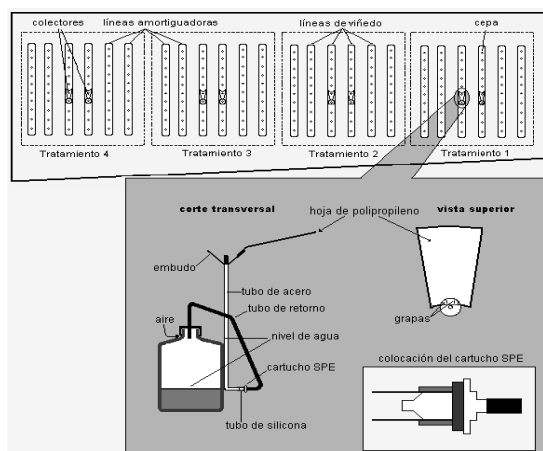
### **3.3.- Aporte de fungicidas al suelo a través de las aguas de pluvio lavado**

El agua de lluvia puede lavar las hojas de las plantas arrastrando hacia el suelo parte del fungicida depositado sobre su superficie. La cantidad de fungicida lavado por la lluvia depende de numerosos factores como son el tipo y cantidad de producto aplicado, su solubilidad en agua y el tipo de vegetación presente en la zona de aplicación [63, 64]. Por ello resulta

interesante estimar la proporción del fungicida aplicado que alcanza el suelo a través de las aguas de pluviolavado.

Estos estudios se han desarrollado en una parcela experimental cedida por la Estación de Viticultura y Enología de Galicia y dedicada a la producción de uva treixadura. Tal y como se muestra en la figura 6, la parcela se ha dividido en 4 subparcelas cada una de las cuales está compuesta por seis filas de viñedo y ha recibido un tratamiento fitosanitario contra mildiu, oidio y botrytis diferente. Los productos elegidos son aquellos de uso más habitual en los viñedos gallegos entre los que se incorporan los fungicidas de nueva generación ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil y fenhexamida [65]. A lo largo de este estudio se han realizado cinco aplicaciones de producto (14 de junio, 3 de julio, 2 de agosto, 20 de agosto y 10 de septiembre de 2002), siguiendo las instrucciones de uso y las dosis indicadas por el fabricante. En todos los casos se ha realizado un tratamiento conjunto contra mildiu, oidio y botrytis excepto en la primera y tercera aplicación, en las cuales el tratamiento antibottrítico se ha suprimido. Asimismo, se han realizado un total de cinco muestreos tras un episodio de lluvia significativo (20 de agosto, 10 de septiembre, 27 de septiembre y 20 de noviembre de 2002 y 18 de enero de 2003). Para la recogida de las muestras de pluviolavado se ha desarrollado el dispositivo colector de la figura 6. El agua de lavado de las hojas es recogida sobre una hoja de polipropileno y conducida a través de un tubo de acero en cuyo extremo se encuentra una minicolumna  $C_{18}$  en la que se adsorben los fungicidas. El dispositivo de muestreo se ha colocado sólo en las dos filas centrales dejando las otras filas de viñedo como filas amortiguadoras para evitar efectos cruzados entre los distintos tratamientos. La fracción de fungicida liberada se puede estimar teniendo en cuenta el volumen de viñedo sobre el que se aplica el producto fitosanitario, la cantidad de producto aplicado y que el dispositivo colector sólo muestrea un volumen de viñedo de  $34.8 \text{ m}^3$ . Los datos obtenidos permiten concluir que las entradas de fungicidas al suelo a través de las aguas de pluviolavado no son muy importantes, variando entre el 0.03 % para el folpet y el 2.95 % para la procimidona [65]. Estos datos pueden ser explicados en términos de estabilidad y transporte.

**Figura 6. Diseño de la parcela experimental y del dispositivo de muestreo de aguas de pluviolavado.**



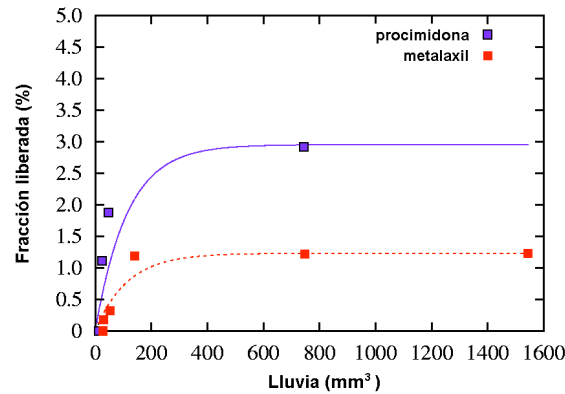
Estudios previos realizados en el laboratorio para evaluar la estabilidad de los fungicidas en las minicolumnas  $C_{18}$ , a temperaturas de 5 °C (temperatura de conservación de los cartuchos desde el muestreo hasta su análisis) y 30 °C (temperatura máxima alcanzada en la parcela experimental) han permitido clasificar los fungicidas en cuanto a su estabilidad. Así, la fenhexamida y el folpet serían inestables en el cartucho SPE, sobre todo el folpet a temperaturas de 30 °C, mientras que el resto de los fungicidas aplicados en la parcela permanecerían estables. Con los datos de estabilidad a 30 °C se ha estimado la vida media del folpet y la fenhexamida en 1 y 36 días, respectivamente. Cabe resaltar que la vida media del folpet es muy baja como para obtener datos fiables de entrada de fungicida al suelo por pluviolavado. A la vista de estos resultados se recomienda recoger las minicolumnas lo antes posible y siempre dentro de la semana siguiente al episodio de lluvia y analizarlas en el plazo de una semana.

Los mecanismos que controlan la liberación y transporte de los fungicidas desde la planta al suelo son difíciles de identificar. Al representar la fracción de fungicida liberada frente a la lluvia acumulativa se puede observar que el mayor lavado de los fungicidas se produce rápidamente después de 140 mm de lluvia y posteriormente la liberación no aumenta salvo en el caso de la procimidona. Si nos centramos en el metalaxil y la procimidona podemos observar que la liberación del metalaxil es lineal con los primeros 140 mm de lluvia y su liberación y transporte estaría controlado por su solubilidad en agua, mientras que en caso de la procimidona se

observa una liberación exponencial con la lluvia. Teniendo en cuenta que la procimidona es poco soluble en agua y que se aplica como polvo mojable, el mecanismo que controla su liberación y transporte sería el desprendimiento de los sólidos a los que la procimidona se encuentra unida. En el caso de altos flujo de lavado el desprendimiento está totalmente controlado por un proceso de transferencia de masa:

$$dC/dR = -K_R C^n$$

donde  $dC/dR$  es el grado de liberación del fungicida con la lluvia,  $K_R$  es el coeficiente de transferencia de masas y  $n$  es el orden del proceso. Este modelo puede ser utilizado para comparar el transporte de metalaxil y procimidona (figura 7). En el caso de la procimidona el mejor ajuste dio un coeficiente de transferencia de masa de  $0.025 \text{ mm}^{-1}$  siendo el orden del proceso igual a 1, mientras que en el caso del metalaxil el proceso simula un orden de reacción de 0.5 con una liberación constante de  $0.017 \text{ mm}^{-1}$ . Este descenso del orden de reacción sugiere que la liberación del metalaxil depende más de la variabilidad del lavado sobre la superficie de la hoja que de la masa de fungicida acumulada.



**Figura 7. Datos observados (símbolos) y modelo de liberación de primer orden (líneas) para el metalaxil y la procimidona; fracción liberada frente a lluvia acumulativa.**

#### 4.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una utilización respetuosa de los fungicidas, cumpliendo los plazos de seguridad y las dosis indicadas por el fabricante, lo que refleja la buena situación del sector vitivinícola gallego. En vista de estos resultados se plantean una serie de propuestas de futuro, entre ellas: conocer la distribución de los fungicidas así como de sus productos de degradación a lo largo del proceso de vinificación; ofrecer al sector vitivinícola sensores rápidos para la determinación de estos compuestos en uvas para vinificación en el momento de la vendimia, así como levaduras con un elevado potencial enológico resistentes a la presencia de fungicidas; estudiar los procesos de distribución de los fungicidas en el medio físico natural y los parámetros que controlan su movilidad; y evaluar el impacto ambiental de la aplicación de fungicidas en cultivos de viñedo en laderas, principalmente en las aguas superficiales de la zona.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] FAOSTAT. Base de datos estadísticos sobre agricultura. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2004.
- [2] Mansilla J.P., Abelleira A., Aguín O., Pérez R., Berea B., Sabarís M., Vieitez C., Vela P., Salinero C., Orcajo C. 1999. Ed. Asociación Profesional Jóvenes Agricultores.
- [3] Bovey R., Baggiolini M., Bolay A., Bovay E., Corbaz R., Mathys G., Meylan A., Murbach R., Pelet F., Savary A., Trivelli G. 1989. "La defensa de las plantas cultivadas". Ed. Omega. Barcelona, España.
- [4] Bermejo P., Fernández C. 2001. "Botrytis una amenaza en estado latente". *Rías Baixas*, 6: 50-51.
- [5] Cabras P., Angioni A., Garau V.L. 1997. "Gas chromatographic determination of cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole in grapes, must, and wine. *Journal of AOAC International*, 80: 867-870.
- [6] Tomlin, C. 2000. "The pesticide manual". 12ª edición. Ed. The British Crop Protection Council. Surrey, UK.
- [7] Coscolla R. 1993. "Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales". Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- [8] Cabras P., Angioni A. 2000. "Pesticide residues in grapes, wine and their processing products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4(4): 967-973.
- [9] Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Minelli E.V., Cabitza F., Cubeddu M. 1997. "Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil and tebuconazole) from vine to wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7): 2708-2710.
- [10] Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Pirisi F.M., Espinoza J., Mendoza A., Cabitza F., Pala M., Brandolini V. 1998. "Fate of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipyrim and tetraconazole from vine to wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8): 3249-3251.

- [11] Oliva J., Pardo F., Navarro S., Barba A., Navarro G. 2000. "Eliminación de residuos de plaguicidas durante el proceso de vinificación". *Enólogos*, N°4.
- [12] Ruiz M. 1998. "Calidad de los mostos. Prueba de residuos de pesticidas". *Semana Vitivinícola*, 2713: 2814-2817.
- [13] Schopfer J.L. et al. 1967. "Enologie et produits antiparasitaires". *Agriculture Romande*, 6: 103-106.
- [14] Gnaegi F., Aerny J., Bolay A., Crettenand J. 1983. "Effect of antifungal treatment of grapevines on vinification and wine quality". *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 15(4): 243-250.
- [15] Cabras P., Meloni M., Pirisi F.M. 1987. "Pesticide fate from vine to wine". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 99: 83-117.
- [16] Cabras P., Meloni M., Pirisi F.P., Lalli M.G. 1986. "Riduzione di alcuni fungicidi durante il processo di vinificazione". *L'Enotecnico*, 12: 1219-1222.
- [17] García-Cazorla J., Xirau-Vayreda M. 1994. "Persistence of dicarboximidic fungicide residues in grapes, must and wine". *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(3): 338-340.
- [18] Zironi R., Farris G.A., Cabras P., Fatichenti F. 1991. "Pesticide residues from vine to wine". *Proc. Acc. Ital. Vite Vino*, 43: 351-365.
- [19] Sala C., Fort F., Busto O., Zamora F., Arola L., Guasch J. 1996. "Fate of some common pesticides during vinification". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11): 3668-3671.
- [20] Flori P., Cabras P. 1990. "I residui di fitofarmaci nei vini". *Vignevini*, 7-8: 31-37.
- [21] Farris G.A., Cabras R., Spanedda L. 1992. "Pesticide residues in food processing". *Italian Journal of Food Science*, 3: 149-169.
- [22] Lanari P., Canella M., Binci M.F. 1993. "I residui dei fitofarmaci in vitivinicoltura". Ed. ESAM.
- [23] Katerova L., Todorova M., Khaigrov V. 1995. "Defining chlorotalonil, folpan, bamper and topaz residues in grapes and wines first results". *Rasteniiev"dni Hauki*, 32(7): 205-206.
- [24] Molina R., Mingot J., Manrique De Lara A., Martin G. 1995. "Oenological aspects of bentonite. I". *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 14(8): 61-65.
- [25] Navarro S., García B., Navarro G., Oliva J., Barba A. 1997. "Effect of wine-making process on the concentrations of fenarimol and penconazole in rose wines". *Journal of Food Protection*, 60(9): 1120-1124.
- [26] Navarro S., Barba A., Oliva J., Navarro G., Pardo F. 1999. "Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of winemaking procedures in their disappearance". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 264-270.
- [27] Flori P., Frabboni B., Cesari A. 1999. "Pesticide decay models in winemaking process and wine storage". *Proceedings of Pesticides in Food in Mediterranean Countries (I.S. 99)*, 167.
- [28] Blaya L. 1999. "Evolución de los residuos de diversos plaguicidas durante la elaboración de vinos tintos obtenidos mediante maceración carbónica". Tesina de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- [29] Cabras P. 1999. "Pesticide residues in grapes, wine and their processing products". *Proceedings of Pesticides in Food in Mediterranean Countries (I.S. 99)*, 159-166.
- [30] Zamorano M. 1999. "Influencia de los fungicidas benalaxil y ciproconazol en la viabilidad de levaduras durante la fermentación de uvas Monastrell". Tesina de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- [31] Ordennance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC, RS 817.021.23), cuya última modificación es la OSEC, de 27 de marzo de 2002.
- [32] Rial R., Yagüe C., Cancho B., Simal J. 2002. "Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines". *Journal of Chromatography A*, 942: 41-52.
- [33] Pawliszyn J. 1997. "Solid phase microextraction - theory and practice". Ed. Wiley. New York.

- [34] Navarro S., Barba A., Navarro G., Vela N., Oliva J. 2000. "Multiresidue method for the rapid determination in grapes, must and wine of fungicides". *Journal of Chromatography A*, 882(1/2): 221-229.
- [35] Scarponi L., Martinetti L. 1999. "Trattamenti e residui nei vini". *Vignevini*, 1/2: 27-29.
- [36] Jiménez J.J., Bernal J.L., del Nozal M<sup>a</sup>J., Toribio L., Arias E. 2001. "Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection". *Journal of Chromatography A*, 919: 147-156.
- [37] Rial R., Cancho B., Simal J. 2003. "Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection". *Journal of Chromatography A*, 992: 121-131.
- [38] Fernández C., Rial R., Cancho B., Simal J. 2003. "Determination of fungicide residues in white grapes for winemaking by gas chromatography with mass spectrometric detection and assessment of matrix effects". *Journal of AOAC internacional*, 86: 1008-1014.
- [39] Flori P., Brunelli A. 1995. "Residues of EBI fungicides on grape, must and wine". Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen (Universiteit Gent), 60(2b, Proceedings, 47th International Symposium on Crop Protection, Pt. 2, 1995), 503-509.
- [40] Porta J., López-Acebo M., Roquero C. 1999. "Edafología para la agricultura y el medio ambiente". 2<sup>a</sup> edición. Ed. Mundi Prensa. Madrid. España.
- [41] Díaz M.C., Garrido S., Hidalgo R. 1989. "Contaminación agraria difusa". Unidades Temáticas Ambientales de la Dirección General de Medio Ambiente. Ed. Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo. Madrid. España
- [42] Fuentes Yagüe J.L. 1994. "El suelo y los fertilizantes". 4<sup>a</sup> edición. Ed. Mundi Prensa. Madrid. España.
- [43] Arnold D.J., Briggs G.G. 1990. "Fate of pesticides in soil: Predictive and practical aspects". In D.H. Huston and T.R. Roberts. Ed. Environmental fate of pesticides. John Wiley & Sons. Chichester.
- [44] *Circular on target values and intervention values for soil remediation, Ministry of Housing, Spatial Planning and Environment Directorate-General for Environmental Protection, Department of Soil Protection* (Netherlands Government Gazette N° 39, 4/02/2000).
- [45] Rial R., González R.M<sup>a</sup>, Cancho B., Simal J. "Parameters affecting extraction of selected fungicides from vineyard soils". (Pendiente de aceptación).
- [46] Getzin L.W., Cogger C.G., Bristow P.R. 1989. "Simultaneous gas chromatographic determination of carbofuran, metalaxyl and simazine in soils". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72(2): 361-364.
- [47] Martínez J.L., Gil M.D., Martínez M., Garrido A. 1997. "Comparison of multicomponent determination of iprodione, procymidone and chlorothalonil by partial least squares modelling using spectrophotometric and high-performance liquid chromatography data". *Analytical Letters*, 30(13): 2409-2432.
- [48] Tafuri F., Marucchini C., Patumi M., Businelli M. 1981. "Gas chromatographic determination of metalaxyl in soils and sunflower". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6): 1296-1298.
- [49] Tsukioka T. 1988. "Determination of the fungicide tricyclazole in river water, soil and animals samples". *Analyst*, 113(1): 193-195.
- [50] Mogadati P.S., Louis J.B., Rosen J.D. 1999. "Multiresidue determination of pesticides in high-organic-content soils by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 82(3): 705-715.
- [51] Shin H.S., Hong J.E., Pyo H., Park S., Lee W. 2001. "Sensitive determination of Benomyl in environmental samples by GC/MSD". *Analytical Sciences*, 17 supplement: a49-a52.
- [52] Marucchini C., Zadra C. 2002. "Stereoselective degradation of metalaxyl and metalaxyl-M in soil and sunflower plants". *Chirality*, 14(1): 32-38.

- [53] Specht W., Tillkes M. 1980. "Method for gas-chromatographic determination of crop protectant residues after cleanup by gel permeation chromatography and silica gel mini-column chromatography. Determination of the fungicides bitertanol, fluotrimazol, fuberidazol, imazalil, rabenzazole, triadimefon and triadimenol in plants and soil". *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 33(1): 61-85.
- [54] Brennecke R. 1984. "Method for gas-chromatographic determination of residues of Bayleton® and Bayfidan® fungicides in plant material, soil and water". *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 37(1): 68-93.
- [55] Brennecke R. 1985. "Method for gas-chromatographic determination of residues of the fungicide Baycor® in plant material, soil and water". *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 38(1): 33-54.
- [56] Maasfeld W. 1987. "Method for gas-chromatographic determination of residues of the fungicide Folicur® in plant material, soil and water". *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 40(1): 29-48.
- [57] Allmendinger H. 1991. "A method for determining residues of the fungicides Folicur® and Bayfidan® in plant material and soil by gas chromatography". *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 44(1): 5-66.
- [58] Amore F. 1979. "Analysis of soil and sediment to determine potential pesticide of a water supply impoundment". *National Bureau of Standards Special Publication*, 519: 191-203.
- [59] Yunxiang X., Defang F., Hexing C. 1990. "Gas chromatographic determination of systemic fungicide tricyclazole in soil and water". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 73(5): 761-763.
- [60] Papadopoulou-Mourkidou E., Patsias J., Kotopoulou A. 1997. "Determination of pesticides in soils by gas chromatography-ion trap mass spectrometry". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 80(2): 447-454.
- [61] Rübél A., Bierl R. 1999. "Routine analysis of viticultural relevant fungicides, insecticides and herbicides in soil samples using enhanced solvent extraction (ESE)". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 364(7): 648-650.
- [62] Mortland M.M. 1970. "Clay-organic complexes and interactions". *Advance in agronomy*, 22: 75-117.
- [63] Komorowska-Kulik J. 2000. "Laboratory comparative test to determine cupric fungicides susceptibility to washing off by rainwater". *Pestycydy*, 1-2: 71-75.
- [64] Ribolzi O., Valles V., Gomez L., Voltz M. 2002. "Speciation and origin of particulate copper in runoff water from a Mediterranean vineyard catchment". *Environmental Pollution*, 117(2): 261-271.
- [65] Rial R., Cancho B., Arias M., López E., Simal J. 2003. "Procedure for the measurement of soil inputs of plant-protection agents washed off through vineyard canopy by rainfall". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5041-5046.



### Capítulo 3

#### Compuestos orgánicos persistentes (COPs) en la cadena alimentaria

*Persistent organic pollutants (POPs) in the food chain*

Uresti Marín Rocío M.\*; Punín C. María O.;  
Ramírez de León José Alberto  
Departamento de Bromatología y Nutrición.  
Universidad Autónoma de Tamaulipas,  
UAM Reynosa- Aztlán México  
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de  
Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.  
E-mail: ruresti@uat.edu.mx

## COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COPs) EN LA CADENA ALIMENTARIA

### Resumen

Los compuestos orgánicos persistentes (COP's) o Persistent Organic Pollutants (POP's, por sus siglas en inglés) son sustancias químicas muy estables, de alta toxicidad, resistentes a la degradación natural, que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Permanecen en el ecosistema durante años y son capaces de bioacumularse en la cadena trófica. Debido a que la salud y la alimentación están íntimamente relacionadas, se exige cada vez más que los alimentos sean seguros y con mejor calidad.

En este trabajo se realiza una revisión de la problemática ambiental relacionada con estos compuestos, abarcando sus antecedentes, origen, propiedades, toxicología y metodología analítica necesaria para su determinación, así como algunos estudios realizados en esta área. Se llevó a cabo la revisión bibliográfica de los policlorobifenilos, las dioxinas y dibenzofuranos y los pesticidas de la docena sucia; que son aquellas sustancias químicas clasificadas como los contaminantes más peligrosos liberados al medio ambiente.

### *PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs) IN THE FOOD CHAIN*

### Abstract

Persistent organic compounds (COP's) or Persistent Organic Pollutants (POP's) are very stable chemical substances, of high toxicity, resistant to the natural degradation, which are distributed widely in the environment. They remain in the ecosystem during years and are able to bio-accumulate themselves in the food chain. Due health and feeding are intimately related, it is demanded safer food with better quality.

In this work, is made a problematic environmental revision related to these compounds, including their preliminary data, properties, toxicology, and the necessary analytical methodology for its determination, such as some studies made in this area. It was make the bibliographic revision of the Polychlorinated Biphenyls (PCBs), the dioxins and dibenzofurns and the pesticides of the dirty dozen; which are the chemical substances classified as the most dangerous polluting agents released to the environment.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es un problema preocupante para la mayoría de los países del mundo, ya que sus efectos sobre el planeta desequilibran los ecosistemas y debido a su biomagnificación, perjudican la salud del hombre.

El hombre, como vértice de la cadena trófica, consume seres vivos de niveles más inferiores, de esta manera se consigue un equilibrio en el ecosistema, el cual se encuentra afectado por la contaminación medioambiental, lo cual origina una acumulación en los tejidos animales y vegetales y, por tanto, en los alimentos.

Una de las preocupaciones sociales en la actualidad es conseguir salud a través de la alimentación, no sólo porque se han relacionado gran cantidad de enfermedades con determinados hábitos dietéticos, sino porque se exige cada vez más que la alimentación sea de calidad, completa y segura nutricionalmente. Así, cada vez más, se extrema el control y la determinación de contaminantes en los alimentos. Sin embargo, es un hecho evidente, que no podemos eliminar los múltiples contaminantes ambientales que están presentes en nuestro ecosistema, (Angulo R., *et. al.*, 1999).

Los compuestos orgánicos persistentes (COPs), constituyen un grupo de sustancias declaradas internacionalmente como potencialmente peligrosas para la salud; de todos los contaminantes liberados al ambiente cada año por la actividad humana, los COPs son considerados los más peligrosos. Son compuestos de alta estabilidad (pueden permanecer estables por años, incluso décadas) que se generan en la industria química o que se producen de manera no intencionada a partir de ciertas actividades humanas. Además de persistentes, estos compuestos son liposolubles, semivolátiles y tóxicos. Se transportan por la atmósfera, tienden a bioacumularse a lo largo de la cadena trófica. Todos los seres humanos en el mundo portan pequeñas cantidades de estos químicos en sus cuerpos. Estos químicos circulan globalmente a través de un proceso conocido como “efecto saltamontes.” La liberación de COPs en un lugar del mundo pueden, a través de un proceso repetitivo y generalmente estacional de evaporación y depósito, ser transportados, a través de la atmósfera, a regiones muy lejanas de la fuente original.

Estos compuestos deben gran parte de su estabilidad química al hecho de tener átomos de cloro como substituyentes, los cuales tienen un gran volumen y blindan a la molécula contra un ataque oxidante (Grimalt, J. O., 2002). Conforman este grupo los pesticidas organoclorados, los

policlorobifenilos, las dioxinas y los dibenzofuranos. La primera docena de COPs iniciales, conocidos como la docena sucia, son: Aldrina, Dieldrina, Endrina, Heptacloro, Hexaclorobenceno (HCB), Mirex, Toxafeno, Clordano, DDT y sus metabolitos (DDD y DDE), BPC, Dioxinas y Furanos.

Sintetizados en su mayoría para ser utilizados como plaguicidas o como dieléctricos en transformadores, retardantes de llama, aceites de alta estabilidad térmica, etc.; hoy en día su uso está prohibido. Los países de la Unión Europea, así como México, forman parte de los 91 países que firmaron en mayo de 2001 el Convenio de Estocolmo, en el cual se comprometían a reducir o eliminar las emisiones de los compuestos orgánicos persistentes clorados, así como eliminar su uso en la mayoría de los casos e investigar sobre su incidencia en el medioambiente y la salud humana.

Hasta el momento, de los 150 países que han firmado el Convenio de Estocolmo 64 ya lo han ratificado. Debido a que era necesaria la ratificación de al menos 50 países, el Convenio no entró en vigor hasta el pasado 17 de mayo de 2004.

## **ANTECEDENTES COPS**

### ***Disruptores Endocrinos***

Los disruptores endocrinos (DE) son sustancias químicas capaces de alterar el sistema hormonal y de ocasionar diferentes daños sobre la salud de las mujeres y hombres expuestos, así como la de sus descendientes. En los niveles en los que se encuentran normalmente en el entorno, las sustancias químicas disruptoras hormonales no matan células ni atacan al ADN; su objetivo son las hormonas, los mensajeros químicos que se mueven constantemente dentro de la red de comunicaciones del cuerpo.

Los efectos de los DE se producen a dosis bajas, en general muy por debajo de los límites de exposición legalmente establecidos. Se está expuesto a los DE tanto en nuestros lugares de trabajo, como en nuestros hogares debido a la contaminación de alimentos con plaguicidas, la exposición a productos plásticos y a plastificantes, el uso de algunos detergentes y la contaminación del medio ambiente.

Muchas sustancias químicas artificiales y algunas naturales, se han vertido al medioambiente, las cuales tienen potencial para perturbar el sistema endocrino de los animales, incluidos los seres humanos. Entre ellas se encuentran las sustancias persistentes, bioacumulativas y organohalógenas que incluyen algunos plaguicidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas) y las sustancias químicas industriales, otros productos sintéticos y algunos metales pesados. Entre las repercusiones figuran la disfunción tiroidea en aves y peces; la disminución de la fertilidad en aves, peces, crustáceos y mamíferos; la disminución del éxito de la incubación y deformidades de nacimiento en aves, peces y tortugas; anormalidades metabólicas en aves, peces y mamíferos; anormalidades de comportamiento en aves; demasculinización y feminización de peces, aves y mamíferos machos; defeminización y masculinización de peces y aves hembras y peligro para los sistemas inmunitarios en aves y mamíferos.

Los disruptores endocrinos pueden poner en peligro la supervivencia de especies enteras y quizá, a largo plazo, la especie humana. El impacto de los efectos de los DE varían de una especie a otra, así como de una sustancia a otra.

Sin embargo hay 4 consideraciones que deben tomarse en cuenta:

1. Estas sustancias químicas pueden tener efectos totalmente distintos sobre el embrión, el feto o el organismo perinatal que sobre el adulto;
2. Los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en las crías, que en el progenitor expuesto.
3. El momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar su carácter y potencial futuro.
4. Aunque la exposición crítica tiene lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones obvias pueden no producirse sino hasta la madurez.

La especie humana carece de experiencia evolutiva con estos compuestos sintéticos. Estos imitadores artificiales de los estrógenos difieren en aspectos fundamentales de los estrógenos vegetales. Nuestro organismo es capaz de descomponer y excretar los imitadores naturales de los estrógenos, pero muchos de los compuestos artificiales resisten los procesos normales de descomposición y se acumulan en el cuerpo, sometiendo a los humanos y animales a una exposición de bajo nivel pero de larga duración.

Los imitadores hormonales artificiales suponen un peligro mayor que los compuestos naturales, porque pueden persistir en el cuerpo durante años, mientras que los estrógenos vegetales se pueden eliminar en un día.

Estados Unidos gastó de 20 a 30 millones de dólares en 400 proyectos, con el fin de analizar los efectos de las sustancias químicas en el sistema endocrino. El objetivo de la Agencia de Medio Ambiente (EPA) de EEUU es desarrollar toda una estrategia para investigar y someter a prueba 600 plaguicidas y 72.000 sustancias químicas sintéticas de uso comercial en Estados Unidos, con el objeto de analizar sus efectos como posibles disruptores endocrinos. La National Academy of Sciences de Estados Unidos, ha emprendido un amplio estudio para profundizar en los peligros de los disruptores endocrinos. Raro es el mes en el que no se publica artículo alguno en las más prestigiosas revistas científicas, confirmando y profundizando los peligros de las sustancias químicas; engrandeciendo cada vez más la lista de las sustancias químicas catalogadas como disruptores endocrinos.

El 35 por ciento de los alimentos consumidos tienen residuos de plaguicidas detectables. Sin embargo, los métodos de análisis, sólo detectan un tercio de los más de 600 plaguicidas en uso. La contaminación de los alimentos por plaguicidas es frecuentemente superior en aquellos países que se encuentran en desarrollo.

Atacar este problema requiere la acción en varios frentes, con la intención de eliminar las nuevas fuentes de disrupción endocrina y minimizar la exposición a contaminantes que interfieren el sistema hormonal y que ahora se encuentran en el ambiente. Para ello se requiere mayor investigación científica, rediseño de las sustancias químicas, de los procesos de producción y de los productos por parte de las empresas; nuevas políticas gubernamentales; y esfuerzos para eliminar estas sustancias del medio ambiente.

### ***Convenio de Estocolmo***

Recientemente, la comunidad internacional hizo un llamado para la toma de acciones globales urgentes, que conlleven a reducir y eliminar emisiones y descargas de contaminantes orgánicos persistentes. En su decimonovena reunión, de febrero de 1997, mediante la Decisión 19/13C, el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP), solicitó a su Director Ejecutivo que preparara y convocara un comité intergubernamental de negociación, con el mandato de elaborar un

instrumento legal vinculante para la implementación de acciones sobre doce contaminantes orgánicos persistentes (COPs).

En forma resumida la cronología de actividades realizadas es la siguiente:

- **Febrero de 1997**: El Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), encargó al Comité Intergubernamental de Negociación (INC) desarrollar para fin del año 2000 el instrumento internacional jurídicamente vinculante sobre la primera docena de COPs, previendo asimismo la constitución de un grupo de expertos para la identificación de otros contaminantes orgánicos persistentes.

- **Junio de 1998**, Reunión INC-1: Entre otras cuestiones organizativas, se pidió al Secretariado que preparara el documento de discusión para INC-2.

- **Enero de 1999**, Reunión INC-2: Para esta reunión el Secretariado había preparado un borrador para un documento internacional legalmente vinculante, sobre el que se desarrollaron las discusiones entre los delegados de los 100 países que participaron.

- **Septiembre de 1999**, Reunión INC-3: con la asistencia de delegados de 120 países, se adoptaron las recomendaciones elaboradas por el grupo de expertos en su segunda reunión, como base para la negociación: lenguaje para el articulado, medidas de reducción o eliminación, planes nacionales de eliminación, listado de sustancias para los anexos, intercambio de información.

- **Marzo de 2000**, INC-4: asistiendo alrededor de 500 representantes de 121 países, agencias intergubernamentales y organizaciones no gubernamentales, se avanzó mucho en el borrador de artículos sobre asistencia técnica y recursos y mecanismos financieros, el texto permanecía con muchos corchetes o paréntesis (partes de texto sujeto a ajuste en futuras reuniones), producto de las diferencias existentes entre los países desarrollados y los países en desarrollo, los cuales mantenían posiciones contrapuestas, especialmente, en el aspecto financiero.

- **Diciembre de 2000**, INC-5: Se negoció y aprobó el borrador del texto.

- **Mayo de 2001**: Reunión Plenipotenciaria, diplomáticos y representantes de más de cien países de todo el mundo, se reunieron en Estocolmo,

Suecia, para la suscripción del Acta Final y del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes.

*-Mayo de 2004:* Dado que era necesaria la ratificación de al menos 50 países, el Convenio no entró en vigor hasta el pasado 17 de mayo de 2004. (<http://www.quimica.org.ar/Estocolmo.htm>)

### ***Docena Sucia***

Los 12 contaminantes que integran la docena sucia son los siguientes: (Tabla 1 y 2).

1. Aldrina	4. Dieldrina	7. Mirex	10. HCB
2. Clordano	5. Endrina	8. Toxafeno	11. Dioxinas
3. DDT	6. Heptacloro	9. BPC	12. Furanos

**Tabla 1. - Docena sucia**

**Aldrina:** Insecticida usado para proteger las cosechas contra insectos y plagas; tales como el gusano de la raíz del maíz, el gorgojo acuático del arroz y los saltamontes. En México, está prohibido su uso.

**Clordano:** Insecticida de amplio espectro, utilizado principalmente para combatir las termitas. En México, a partir de 1992, su uso estuvo restringido para ser utilizado solo por personal capacitado y autorizado. En 1998, la única empresa formuladora en México, canceló voluntariamente su registro y agotó sus reservas.

**DDT:** El Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) es utilizado profusamente para el control de insectos transmisores de enfermedades, siendo su uso más común contra el paludismo o malaria. En muchos países su uso está prohibido. En México su uso está restringido a las campañas sanitarias contra el paludismo. La última vez que se utilizó en México fue en 1999.

**Dieldrina:** Insecticida utilizado para combatir plagas que atacan productos textiles y agrícolas. También es utilizado para combatir insectos vectores de enfermedades. En México, su uso está prohibido.



**Endrina:** Insecticida empleado para proteger a los cultivos de parásitos e insectos. Este químico también es usado como rodenticida. Su uso está prohibido en México.

**Heptacloro:** Insecticida usado para combatir plagas en suelo y cultivos; tales como termitas, saltamontes, hormigas rojas y mosquitos. Este compuesto no está registrado en México, lo que significa que no puede ser producido, formulado, comercializado, usado o importado de manera legal dentro del país.

**Mirex:** Insecticida utilizado principalmente contra varios tipos de hormigas; también se usa como piroretardante en plásticos, caucho, pinturas y en productos eléctricos y de papel. Su uso está prohibido en México.

**Toxafeno:** Insecticida usado para proteger cultivos y combatir garrapatas y ácaros que afectan al ganado. Este compuesto no está registrado en México, lo que significa que no puede ser producido, formulado, comercializado, usado o importado de manera legal dentro del país.

**BPC:** Los Bifenilos Policlorados (BPC o PCB, por sus siglas en inglés) son compuestos termoestables, no inflamables, de baja presión de vapor y alta constante dieléctrica, lo que los hace ideales como medio aislante en capacitores y transformadores eléctricos y como fluidos de intercambio de calor. Los BPC son también subproductos de combustión incompleta en procesos industriales. La Norma Oficial Mexicana NOM-133-ECOI-2000, establece las especificaciones de manejo de estos compuestos.

**HCB:** El hexaclorobenceno (HCB) es usado para el tratamiento de semillas y, a menudo, se encuentra presente en los plaguicidas clorados. El HCB es generado no intencionalmente como subproducto en la fabricación de plaguicidas y de productos químicos industriales, en procesos industriales de plantas de cloro-álcali, en productos pirotécnicos y como resultado de combustión incompleta. En cuanto a su uso en agricultura, este compuesto no está registrado en México, lo que significa que no puede ser producido, formulado, comercializado, usado o importado de manera legal dentro del país.

**Dioxinas:** Estos compuestos son generados como subproductos de procesos industriales; no son producidos comercialmente y no tienen utilidad

conocida. Son generados no intencionalmente y su principal fuente de producción es la incineración, emisiones de automóviles, la combustión de carbón y madera y en procesos de blanqueo de pulpa y papel.

**Furanos:** Son subproductos no intencionados comunes en la producción de los BPC, en incineradores, en emisiones de automóviles, entre otras fuentes.

## PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

### *Recuerdo Histórico*

La era de los pesticidas químicos comenzó en el siglo pasado, cuando se desarrollaron los sulfuros y se encontró una aplicación práctica como fungicidas. Posteriormente fueron los compuestos arsenicales los que se emplearon para el tratamiento de las plagas de insectos en la producción agrícola. En ambos casos, se trataban de sustancias de una elevada toxicidad lo que limitó su empleo generalizado.

Fue en 1940 cuando aparecieron los primeros pesticidas organoclorados, que tienen su máximo exponente en el dicloro difenil tricloroetano (DDT). Se utilizaron tanto en los tratamientos agrícolas, como en el control de plagas vehiculizadas por insectos portadores. Puesto que, en principio, estos organoclorados presentan baja toxicidad, su empleo se vio enormemente favorecido y ocuparon una posición dominante entre los pesticidas químicos de nueva síntesis. La vida “autorizada” del DDT fue de treinta años, si se cuenta desde su comercialización hasta el fin de su empleo legal, es tiempo excesivamente largo para un compuesto que ha demostrado ser bioacumulable y tóxico. Durante este tiempo, el acúmulo del pesticida en suelos, acuíferos y en la cadena alimentaria fue tremendamente significativo; de tal manera que no hay, hoy en día, población humana que no contenga niveles significativamente importantes de DDT y sus derivados acumulados, debido a su solubilidad en grasas y depósito en el tejido adiposo. Además, si bien su empleo está restringido o prohibido, lo cierto es que su producción y venta en países en vías de desarrollo es libre, ya que se emplea de forma habitual para el tratamiento de plagas, vehículo de organismos infectivos.

No obstante su regulación estricta, todavía existe algún comercio para los organoclorados ya sea porque su uso está restringido a aplicaciones

específicas, o debido a que, extrañamente, no se han clasificado bajo esta denominación genérica (Olea, Nicolás, 2004).

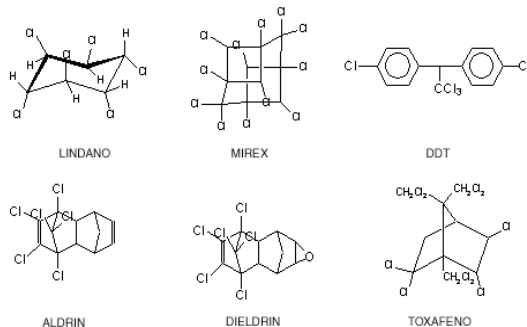
**Definición y estructura química.**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales, que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, producción de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, así como aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.

Los insecticidas organoclorados, desde el punto de vista estructural, constituyen un grupo de sustancias, heterogéneos, teniendo en común la presencia de estructuras monocíclicas o policíclicas con distinto número de sustituyentes cloro.

Pueden agruparse, por su estructura química, en diferentes grupos (Figura 1):

- Grupo del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano): p-p'-DDT, o-p'-DDT, p-p'-Metoxiclor.
- Grupo de los Ciclodienos: Aldrín y su epóxido, el Dieldrín, Mirex
- Grupo del Hexaclorociclohexano (HCH) y Hexaclorobenceno (HCB): HCH,  $\gamma$ -HCH, HCB.
- Grupo de los indenos clorados: hepatacloro,  $\alpha$ -Clordano.



**Figura 1.- Diferentes grupos pesticidas organoclorados**

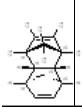
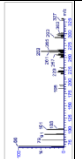

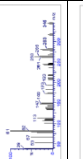

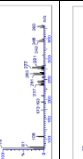
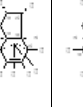
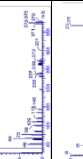
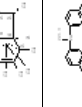
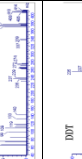
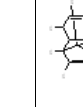
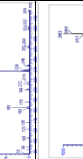
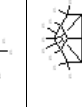
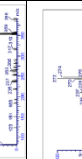
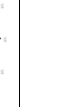
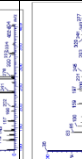
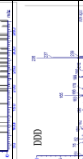




CAS No.	Nombre Químico	Peso Molecular	Formula	Punto ebullición (°C)	Punto de Inflamación (°C)	Aplicación	Estructura	Datos de Espectro
309-00-2	Aldrin	364.91	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	384.9±22.0		Insecticida		
72-20-8	Endrin	380.92	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	416.2±30.0	155.3±44.4	Insecticida		
60-57-1	Dieldrin	380.91	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	416.2±30.0	155.3±44.4	Insecticida		
5103-71-9	Cis-Clordano	409.78	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>8</sub>	424.7±25.0	212.5±37.0	Insecticida		
5103-74-2	Trans-Clordano	409.78	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>8</sub>	424.7±25.0	212.5±37.0	Insecticida		
50-29-3	DDT	354.49	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	416.2±25.0	203.9±37.0	Insecticida		
76-44-8	Heptacloro	373.32	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub>	392.3±22.0	192.9±35.5	Insecticida		
2385-85-5	Mirex	545.5	C <sub>10</sub> Cl <sub>12</sub>	419.9±25.0	201.1±37.0	Insecticida		
8001-35-2	Toxafeno	413.82	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>8</sub>			Insecticida		
72-54-8	DDD	320.04	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	405.7±25.0	199.3±37.0	Insecticida		
72-55-9	DDE	318.02	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	383.1±22.0	183.7±35.5	Insecticida		

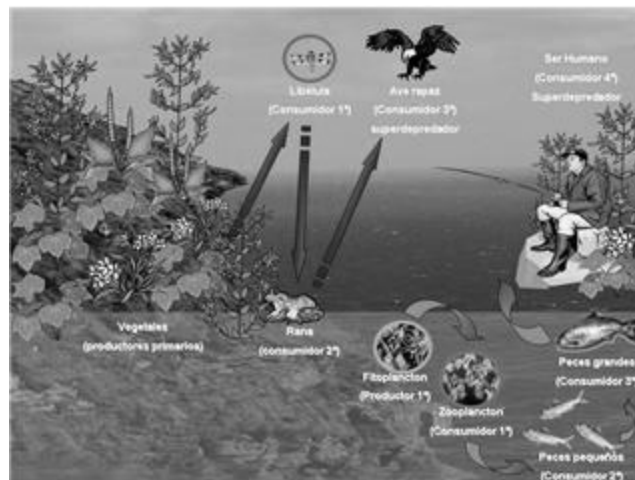
Tabla 2.- Propiedades de pesticidas organoclorados (Docena Sucia)

## ***Propiedades de los Pesticidas Organoclorados***

Algunas propiedades características que presentan estos compuestos son:

1. Extremadamente alta estabilidad
2. Poca solubilidad en agua
3. Alta solubilidad en medio orgánico
4. Alta toxicidad en insectos

Por su alta solubilidad en medios orgánicos, la mayoría de los organoclorados presentes en el medioambiente acuático penetran al tejido adiposo de los peces y acumulándose ahí. Este fenómeno es llamado *factor de bioconcentración*, el cual representa la capacidad de la sustancia de acumularse en organismos acuáticos y entrar a la cadena alimentaría provocando una concentración peligrosa y letal, cuando el organismo acuático es consumido por un organismo mayor. Esto es definido como la constante de equilibrio de la concentración de una sustancia química en particular en un pez, comparando su concentración en el agua del medioambiente. (Figura 2).



**Figura 2.- Cadena Trófica (Factor de Bioconcentración)**

## ***Metodología analítica***

El procedimiento general del análisis de los pesticidas organoclorados incluye las siguientes etapas: muestreo, extracción de los analitos de interés, purificación, concentración (si es requerida), determinación, que incluye identificación y cuantificación de los analitos y confirmación.

### ***Extracción y Purificación***

Los análisis medioambientales frecuentemente involucran una amplia variedad de matrices, desde muestras de aire, aguas inmundas, y muestras contaminadas de suelos, hasta alimentos con diferentes propiedades. Una apropiada preparación de la muestra es necesaria para obtener resultados analíticos óptimos. La Agencia de Protección al Medioambiente (EPA), en EEUU, es la secretaría del gobierno responsable de la definición, desarrollo y aplicación de las medidas analíticas para contaminantes específicos, que son considerados como nocivos en el medio ambiente. Los métodos de la EPA (*Test Methods for Evaluating Solid Waste -SW-846*) proveen un recurso comprensivo de información acerca de las muestras medioambientales, y la FDA (Food and Drug Administration), es la agencia reguladora que se encarga de especificar los límites permitidos de detección en los alimentos.

El análisis de residuos de pesticidas organoclorados involucra varios pasos para la detección de los mismos, entre ellos se encuentran: la preparación de las muestras, extracción, purificación y concentración. Debido a su carácter lipofílico, estos compuestos se encuentran depositados en la parte grasa de las muestras y sus concentraciones se ajustan frecuentemente a las variaciones del contenido lipídico de las mismas.

Un tratamiento previo a muestras de alimentos grasos es la extracción de la misma, para una posterior purificación y concentración del analito. Anteriormente, la extracción y purificación previas se realizaban mediante diferentes procedimientos según el tipo de muestra. En los grupos de huevos, leche y derivados lácteos la extracción se realizaba por el método de Stijve T. y Cardinale E. (1974), con algunas modificaciones. En los grupos de carne, derivados cárnicos y pescados, la extracción se lleva a cabo de acuerdo al método de la AOAC, edición 1984 sec.

29.01213 y en el resto (excepto aceites y grasas), por el procedimiento referido en la sec. 29.01114. Las muestras del grupo de aceites y grasas se someten directamente a la purificación. Los extractos de todos los grupos, excepto los de bebidas alcohólicas, se purifican por cromatografía de gel de permeación (GPC).

Se han desarrollado una variedad de diversos métodos de purificación para remover los lípidos (Liem, A. K. D., *et. al.* 1992; Mukherjee, I., *et. al.*, 1996), incluyendo métodos destructivos, tales como el tratamiento del hidróxido del ácido sulfúrico (Berdí, L., *et. al.*, 1998) o del sodio (Tuinstra, L.G.M.Th., 1980); y métodos no destructivos, incluyendo la cromatografía de columna con impregnación del gel (Kuehl D.W., Haebler, R., 1980), el florisil (Bush, B., *et. al.*, 1984), el alúmina, la silicona o una combinación de ambos (Wells, D.E., 1993; Veningerova, M., *et. Al.*, 1997; Kuclik, J. R., J. E. Baker, 1998) y la extracción de Fluidos Súper Críticos (SFE) (Camel, V., 2000). Sin embargo, los métodos destructivos degradan algunos COPs (Meadows, J., *et. al.*, 1993), mientras que los métodos no destructivos generalmente requieren de grandes volúmenes de solventes y múltiples pasos de operación de extracción, los cuales consumen mucho tiempo y más trabajo para el análisis de grandes cantidades de muestra.

Existe una necesidad de desarrollar más procedimientos simples de purificación (preferiblemente de un paso), que se puedan automatizar y realizar en línea para la medida analítica final. La Microextracción en Fase Sólida (SPME) (Lord, H., Pawliszyn, J., 2000; Arthur, C. L., *et. al.*, 1992; Killan., L. M., 1996), es una técnica analítica novedosa en la que no se requiere el uso de solventes, capaz de integrar la extracción y la concentración de la muestra en un solo paso. Esta técnica, ha demostrado ofrecer una técnica simple, rápida y fácil de automatizar, mucho mejor que las técnicas tradicionales de extracción. (Kataoka, H., *et. al.*, 2000; Boyd-Boland A., 1996; Beltrán, J. F. J., López, F. Hernández, 2000).

La técnica de SPME emplea generalmente una fibra revestida para extraer y concentrar los analitos no polares que se desorben en el puerto de inyección en un cromatógrafo de gases para el análisis. Ahora los métodos de SPME se han desarrollado para una variedad de usos, incluyendo la determinación de COPs en diversos tipos de muestras (agua, suelo, alimento y líquidos biológicos) (Beltrán, J. F. J., López, F. Hernández, 2000). Mientras que la aplicación de SPME en muestras de agua, es mas simple, en muestras sólidas, (biota), presenta más dificultad, de hecho, son pocos los

estudios realizados que se relacionen al uso de SPME en análisis de COPs en muestras de biota (Hidalgo, N., *et. al.*, 2003).

Otras técnicas de extracción actual, son la Barra agitadora de Adsorción (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE), Extracción en Fase Sólida (Sorptive phase extraction SPE) y la extracción líquido-líquido.

### ***Determinación***

La determinación de los plaguicidas organoclorados se realiza por cromatografía de gases con detector de captura electrónica, con fuente de Níquel Ni<sup>63</sup>, debido a que es la técnica analítica más empleada para el análisis cualitativo y cuantitativo de pesticidas organoclorados. Las columnas más utilizadas por este método son las capilares, debido a las ventajas que éstas presentan. La fase estacionaria elegida, por la mayoría de los autores, para la identificación y cuantificación de estos pesticidas es la de 5% fenil 95% metil polisiloxano y en segundo lugar, la de 100% metil polisiloxano.

### ***Técnica rápida de detección***

La técnica “Elisa” implica la interacción de antígenos organoclorados con anticuerpos monoclonales de elevada especificidad, ligados a la superficie de los micropocillos. La muestra es extraída con agua y sobre el extracto se realiza el test Elisa. La lectura del color desarrollado por el test puede leerse a simple vista o con la ayuda de un espectrofotómetro, para resultados cuantitativos. Los resultados obtenidos se refieren al total de ciclodienos clorados en la muestra.

Para la determinación de pesticidas del grupo ciclodienos clorados, el kit detecta sólo los plaguicidas pertenecientes a este grupo químico; no distingue entre los plaguicidas del mismo grupo, pero los detecta con elevada sensibilidad. Muestras: Piensos y materias primas. Método no oficial. Los límites de detección (ppb) son: Endrín: 0,5, Endosulfan: 0,5, Dieldrín: 0,9; Clordano: 2; Heptacoloro: 3; Aldrín: 3. Estos valores están por debajo de los límites establecidos por la legislación vigente. (FEDNA, 2004)



## **Confirmación**

Después de los análisis en la determinación de pesticidas organoclorados, se requiere confirmar los resultados obtenidos, este análisis se puede realizar mediante espectrometría de masas o mediante análisis cromatográficos adicionales.

## **PCBs**

### **Recuerdo histórico**

El término policlorobifenilo (PCB) abarca una familia de compuestos fabricados por el hombre, cada uno de ellos con distinta toxicidad, y que se encuentran en considerables niveles tanto en aire como en agua y suelos (Antón A., Lizaso, J., 2001).

Se sintetizaron por primera vez a finales del siglo XIX pero se comenzaron a producir y a utilizar con fines comerciales en 1930, como dieléctricos para cables, capacitadores y transformadores usados en la industria eléctrica. También se han utilizado en el aceite de inmersión para microscopios, como suspensión o vehículos de pigmentos de carbón en papel de copia, fluidos aislantes y como dispersadores de pesticidas (Angulo R., *et. al.*, 1999).

Desde ese momento se produjeron y se utilizaron con numerosas finalidades en muchos países. La producción mundial total en 1976 se estimó en  $6.1 \times 10^8$  Kg, de los cuales  $5.7 \times 10^8$  Kg. fueron producidos por Monsanto Corporation en los Estados Unidos (Erickson, M. D., 1986).

En 1936 se demostró que la exposición ocupacional causaba efectos tóxicos y consecuentemente se fijaron los niveles límite en los lugares de trabajo. En el medioambiente la presencia de PCBs como contaminantes no fue detectada sino hasta 1964, cuando Jensen observó en sus cromatogramas unos compuestos desconocidos y ampliamente difundidos en el medioambiente de Suecia, mientras investigaba residuos de organoclorados. Dos años antes, similares picos característicos habían interferido cromatogramas en otros países de Europa y en Estados Unidos, siendo registrados como contaminantes del DDT; posteriormente serían identificados como Bifenilos Policlorados (Angulo R., *et. al.*, 1999).

El descubrimiento de su gran distribución en el medioambiente, el aumento del interés general por el mismo y su aparente relación con la carcinogénesis, provocaron un grito público que culminó en Estados Unidos en 1976 con la regulación de los PCBs por la Toxic Substances Control Act (TSCA), que en una de sus secciones regula específicamente la síntesis, procesado, distribución comercial y el uso de los PCBs. En Estados Unidos, la Agencia de Protección Medioambiental (USEPA) fue la encargada de la promulgación y ejecución de estas leyes (Erickson, M. D., 1986).

En 1973, los veinticuatro países de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) adoptaron limitar el empleo de PCBs a ciertas aplicaciones específicas y establecer el control de la manufactura, importación y exportación de PCBs a granel, con el fin de establecer un adecuado tratamiento de residuos y sistemas de etiquetado para los productos que los contengan (Angulo R., *et. al.*, 1999).

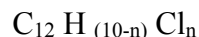
Muchos productores en el mundo disminuyeron o pararon su fabricación en los años 70, sin embargo alguna producción continuó hasta por lo menos 1983. La producción de Monsanto cesó en 1977 (Erickson, M. D., 1986).

En 1978, la OCDE, toma una Decisión-Recomendación, en la que se prohíben los nuevos usos que se pudieran dar a los PCBs y se articulan medidas para acelerar el abandono de los empleos actuales. No obstante, se limita el uso de los PCBs a los sistemas cerrados.

### ***Definición y estructura química***

Los bifenilos policlorados son hidrocarburos aromáticos clorados formados por varios átomos de cloro en dos radicales bifenilo. Algunas de sus propiedades se muestran en la 3 y 4.

Su fórmula empírica corresponde a:



Donde n es el número de átomos de cloro en la molécula y toma valores del 1 al 10.

Son sintetizados por cloración de los bifenilos con cloro anhidro y en presencia de trazas de hierro o cloruro de hierro como catalizador. El producto crudo es purificado para eliminar el color, las trazas de HCl y de

catalizador, normalmente mediante tratamiento con álcalis y destilación. El producto resultante es una complicada mezcla de clorobifenilos con diferente número de átomos de cloro por molécula y sus isómeros. Este hecho es responsable del estado físico de las preparaciones de PCBs; así muchos clorobifenilos individualmente son sólidos a temperatura ambiente, mientras que en mezclas comerciales son aceites fluidos, líquidos viscosos o resinas pegajosas, debido a la depresión mutua de los puntos de ebullición de sus componentes (Hutzinger, O., *et. al.*, 1974).

La cloración puede realizarse a su vez en 10 posiciones diferentes de los anillos, existe un gran número de isómeros posicionales a cada nivel, pudiendo diferenciarse 209 compuestos químicos pero, de éstos, solo 140 son detectados técnicamente en productos comerciales.

La denominación de los bifenilos policlorados ha estado muy condicionada, debido a los productos comerciales que los contienen, por lo que los nombres más frecuentes son: Aroclor (Estados Unidos), Pheno-chlor (Francia), Clophen (Alemania), Kanechlor (Japón), Fenclor (Italia).

De todos ellos, el denominado Aroclor, comercializado por Monsanto Corporation, ha sido el más empleado en investigaciones y, por tanto, del que se dispone mayor información.

Dentro de estas denominaciones cada fabricante tiene su sistema de identificación de sus gamas de productos. En el caso del Araclor, un dígito de cuatro cifras lo identifica. Las dos primeras cifras indican el tipo de molécula (n=12 indica bifenilo policlorado, n=54 indica terfenilos policlorados) y las dos últimas indican el porcentaje en peso de cloro en la mezcla (Angulo R., *et. al.*, 1999).

El grupo entero de los 209 PCBs forma el grupo de congéneres, cuando los PCBs se subdividen por el grado de cloración, se usa el término homólogo, 12 congéneres presentan propiedades toxicológicas similares a las dioxinas, por los que se les conoce como "PCB similares a las dioxinas".

Puesto que los investigadores adoptaban diferentes nomenclaturas, en 1980 Ballschmiter y Zell ordenaron los 209 congéneres en orden numérico ascendente, empezando por los monoclorados, asignándoles los llamados números "Ballschmiter" o "IUPAC" (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) del 1 al 209. Esta denominación se ha popularizado, ya que facilita y aclara el manejo de estos compuestos (Erickson, M. D., 1986).

<i>Nombre químico:</i>	Bifenilos policlorados
<i>Sinónimos, comercial:</i> <i>nombre</i>	Bifenilos clorados, clorobifenilos, PCB, askareles, clofen, tricolorodifenil, Arocloro, Fencloro, Kanecloro, Monta, Nonflamol,
<i>Nombre químico (alemán):</i>	Polychlorierte Biphenyle
<i>Nombre químico (francés):</i>	Polychlorure de biphényle
<i>Nombre químico (inglés):</i>	Polychlorinated biphenyls, PCB
<i>Aspecto general:</i>	Los monoclorobifenilos y diclorobifenilos puros son compuestos cristalinos incoloros; los PCB con más de 3 átomos de cloro son líquidos incoloros, de viscosidad entre moderada y alta. Todas las mezclas industriales son líquidas.
<i>Fórmula empírica:</i>	$C_{12}H_{10-n}Cl_n$ n = 1-10, principalmente 2-7
<i>Masa molecular relativa:</i>	189-499 g
<i>Densidad:</i>	1,2 - 1,6 g/cm <sup>3</sup>
<i>Punto de ebullición:</i>	320-420° C
<i>Presión de vapor:</i>	0,2-133 x 10 <sup>-3</sup> P
<i>Solvólisis:</i>	Sólo ligeramente solubles en agua; son liposolubles y se disuelven en la mayoría de los solventes orgánicos.

**Tabla 3.- Características de PCBs**

### ***Propiedades***

Los congéneres individuales son incoloros y cristalinos, pero las mezclas convencionales presentan un color que oscila entre transparente y marrón oscuro, pasando por tonalidades ligeramente amarillas; además, a bajas temperaturas no cristalizan, sino que forman resinas sólidas y

presentan densidades elevadas producidas por la presencia de cloro en sus moléculas.

Son liposolubles y se acumulan en el tejido adiposo de los animales. Son compuestos extremadamente estables y que, en condiciones ambientales, no se oxidan, se reducen o sufren transformación química. Son resistentes al fuego, con puntos de ebullición altos. Los más clorados no son combustibles, actuando como retardantes del fuego en otros materiales. En algunas aplicaciones industriales al ser utilizados en elevadas temperaturas, conducen a la formación de productos de degradación, tales como dibenzofuranos clorados (PCDFs).

Forman vapores más densos que el aire y no producen mezclas explosivas con éste. Las presiones de vapor decrecen generalmente con la masa molecular relativa, y se incrementa con el grado de sustitución en posición *orto*.

Son muy reactivos cuando se exponen a la luz ultravioleta. Las reacciones de deshalogenación fotoreductora han sido examinadas en solventes orgánicos, fases sólidas y depósitos superficiales en sílica (Keith, L. H., 1997).

Poseen una conductividad eléctrica muy baja. Estas propiedades físicas son las responsables de su uso en sistemas de refrigeración, intercambiadores de calor y en equipos eléctricos.

Son insolubles en agua y fácilmente disueltos en hidrocarburos, grasas y otros compuestos orgánicos. La solubilidad disminuye a medida que aumenta el contenido en cloro. Los estudios sobre la solubilidad de los PCBs en agua son complicados, ya que estos compuestos se adsorben fuertemente a varias superficies como madera quemada, plásticos, cristal y sedimentos (Hutzinger, O., *et. al.*, 1974). La solubilidad acuosa es un parámetro fundamental para la evaluación de la extensión y rango de la disolución de estos PCBs y su persistencia en el ambiente acuático.

Las especies menos cloradas son más solubles, menos absorbidas y más volátiles.

Son enormemente estables a las reacciones químicas en condiciones normales; no son oxidables, son inertes, termoplásticos, permanentes, no corrosivos con los metales, resistentes a los álcalis, ácidos y sustancias corrosivas (Angulo R., *et. al.*, 1999).

### ***Transformación, acumulación y metabolización***

Los PCBs son compuestos muy estables que no se degradan fácilmente, sin embargo, bajo determinadas condiciones, pueden ser destruidos mediante procesos químicos, térmicos y bioquímicos. Esto puede realizarse de manera intencionada, no intencionada y metabólicamente. Debido a su alta estabilidad termodinámica, todos los mecanismos de degradación son difíciles. La degradación intencionada requiere altas temperaturas o catálisis (Erickson, M. D., 1986).

Los PCBs pueden sufrir en los ecosistemas procesos de fotodescomposición, siendo más sensibles a la descomposición por la acción de la luz cuando se encuentran en disolución.

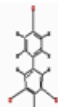


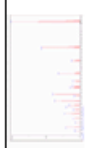
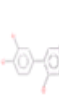

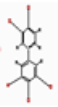

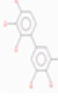



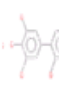



IUPAC	# CAS	FORMULA	PM	COP	Librería # NIST	Estructura	Iones más abundantes	Espectro masas
<b>PCB 81</b>	70362-50-4	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>4</sub>	290.00	3,4',4'',5-Tetraclorobifenilo	.....		292, 220, 222, 290, 110, 150	
<b>PCB 105</b>	32598-14-4	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>5</sub>	324.00	2, 3, 3',4,4''-Pentaclorobifenilo	53299		326, 254, 324, 328, 184, 256	
<b>PCB 118</b>	31508-00-6	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>5</sub>	324.00	2, 3', 4,4''-Pentaclorobifenilo	53278		326, 254, 328, 256, 128, 284	
<b>PCB 126</b>	57465-28-8	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>5</sub>	358.00	3, 3', 4,4''-Pentaclorobifenilo	.....		326, 254, 328, 256, 128, 218	
<b>PCB 147</b>	69782-90-7	C <sub>14</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>	358.00	2, 3, 3',4, 4', 5'-Hexaclorobifenilo	53287		360, 362, 290, 288, 109, 144	
<b>PCB 167</b>	52663-72-6	C <sub>14</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>	358.00	2, 3',4,4',5',5''-Heptaclorobifenilo	53285		360, 362, 290, 288, 145, 180	
<b>PCB 189</b>	39635-31-9	C <sub>14</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub>	382.00	2, 3, 3',4,4',5',5''-Heptaclorobifenilo	53302		394, 324, 396, 326, 162, 252	
<b>p,p'-DDE</b>	72-55-9	C <sub>14</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>4</sub>	316.00	p, p'(diclorofenil) diclorodieno	229518		246, 318, 248, 316, 320, 176	

Tabla 4.- Propiedades de PCBs (Docena Sucia)

En condiciones de pirólisis pueden descomponerse, volatilizarse o transformarse en dibenzofuranos policlorados, dependiendo de la temperatura que se alcance en el proceso. La destrucción térmica se produce a temperaturas superiores a los 1000 °C.

Las bacterias y los mohos, en sistemas aerobios, pueden descomponer los PCBs, disminuyendo su acción conforme se incrementa el grado de cloración y según la localización de los sustituyentes. En anaerobiosis, por el contrario, los compuestos más clorados son degradados en mayor medida. De este modo, el empleo consecutivo de ambos tratamientos podría asegurar la destrucción de mayor número de PCBs (Angulo R., *et. al.*, 1999).

Tras su descubrimiento, los PCBs han sido identificados en casi todos los componentes del ecosistema, como aire, agua, sedimentos, peces y tejidos humanos (Andersson, P. L., *et al.*, 2001; Zaranko, T. D., *et. al.*, 1997). En todos los casos, se presentaron como mezclas complejas de isómeros y congéneres. Muchos estudios han demostrado, que la composición de PCBs de muchos extractos medioambientales, no se asemeja a la composición de los productos comerciales, puesto que los PCBs individuales, muestran distintas propiedades fisicoquímicas que influyen en sus rangos de partición y retención en matrices medioambientales y en sus rangos de degradación por diferentes vías (Safe, S. H., 1994).

En todos los niveles biológicos, los congéneres más clorados presentan prevalencias superiores a las del resto, acumulándose en mayor medida los bifenilos más clorados, puesto que los de menor cloración son fácilmente excretados por procesos metabólicos y, por tanto, sus niveles se van incrementando en las sucesivas etapas de la cadena alimentaria.

Por ser lipofílicos, son almacenados, generalmente, en el tejido adiposo y en menores cantidades en suero sanguíneo, órganos, tejidos y leche humana. Las concentraciones de PCBs en los órganos dependen de su contenido en materia grasa, con excepción del cerebro, donde los niveles son inferiores a lo que cabría esperar.

Para que los PCBs sean excretados, es necesaria su transformación en moléculas hidrosolubles. La biotransformación de los PCBs se realiza por una hidroxilación, mediante oxidasas localizadas en el hígado, posteriormente sufren una decloración y conjugación antes de ser excretados. La tasa de biotransformación y de persistencia depende del grado de cloración y de la posición de los átomos de cloro. Las formas menos cloradas pueden ser metabolizadas y excretadas, pero las más cloradas son acumuladas en los tejidos. La presencia de dos carbonos no halogenados adyacentes facilita el metabolismo.

La excreción de los PCBs se produce a través de la grasa de la leche, bilis y heces, en dos fases, una primera, corta de excreción rápida, seguida de una fase mucho más larga de excreción lenta. La vida media de los PCBs en



la primera fase es de 7 días y de 68 días en la segunda (Angulo R., *et. al.*, 1999).

### ***Toxicología***

La evaluación toxicológica de los PCBs es complicada, debido a su presentación en forma de mezclas de numerosos congéneres, así como la disposición de datos toxicológicos, basados en ensayos realizados con dichas mezclas (Angulo R., *et. al.*, 1999).

Existen tres vías principales de exposición a estos compuestos:

- Trabajadores implicados en la producción de PCBs o que utilizan productos que los contengan.
- Exposiciones accidentales.
- Exposiciones medioambientales de las poblaciones a través de comida, aire y agua contaminados.

Los efectos producidos en trabajadores expuestos son variables y han sido ampliamente estudiados, algunos de ellos incluyen: cloroacné y lesiones dérmicas relacionadas, efectos hepáticos diversos, los cuales incluyen aumento de los niveles séricos de enzimas hepáticas y lípidos, inducción de enzimas hepáticas metabolizadoras de fármacos, hepatomegalia; recién nacidos con bajo peso corporal, disminución de la función pulmonar e irritación ocular.

A pesar de que sus efectos carcinogénicos en animales de laboratorio han sido ampliamente demostrados, su carcinogenicidad en humanos no puede ser establecida. Los resultados de numerosos estudios no son determinantes para establecer una correlación entre el aumento de la mortalidad, asociada al cáncer, con la exposición ocupacional a los PCBs. Sin embargo, en varios estudios, se comprueba un aumento en la incidencia de determinados cánceres, incluyendo melanomas, cáncer de vesícula, tracto biliar y tracto gastrointestinal y neoplasias hematológicas (Safe, S. H., 1994).

En las exposiciones no profesionales, se han producido dos episodios de intoxicación aguda por PCBs. El primero tuvo lugar en Japón, en 1968 y el segundo en Taiwán, casi once años después. Fueron denominados

enfermedad de Yusho y Yu- Cheng, respectivamente. Ambos se produjeron por consumo de aceite de arroz, contaminado por la fuga accidental de fluido industrial, que contenía PCBs del sistema de intercambiador de calor, utilizado para la desodorización del aceite.

La sintomatología de las víctimas consistió en cloroacné severo y persistente, pigmentación marrón oscura en las uñas, folículos pilosos diferenciales, delgadez en la piel, problemas oculares, entumecimiento de las extremidades y molestias subjetivas asociadas a problemas neurológicos. Los niños, nacidos de mujeres con enfermedad Yu-Cheng, eran pequeños y presentaban déficit en el aprendizaje, así como los mismos síntomas tóxicos (Safe, S. H., 1994). Tras comparar los efectos causados por el aceite contaminado y los producidos por PCBs industriales en trabajadores expuestos, se concluyó que los síntomas aparecidos, no se debieron exclusivamente a la acción de los PCBs, sino también a la de otros contaminantes, principalmente dibenzofuranos policlorados, los cuales son más potentes (Safe, S. H., 1994).

### ***Distribución Ambiental***

**Aire:** Como vapores o aerosoles, líquidos o sólidos, que vuelven al suelo con la lluvia y nieve. La vida media en el aire es de 10 d (muy variable con el tipo de PCB). Pueden recorrer grandes distancias. Reaccionan con radicales OH (formados por la luz solar) y su vida media aumenta con el número de cloros. La fotólisis también es posible.

**Agua:** La mayoría, en forma sólida, van al sedimento (se adsorben fuertemente durante varios años) y hay un mínimo disuelto. Los PCB volátiles en agua se evaporan, vuelven a la atmósfera y retornan al suelo como lluvia/nieve. En el agua se acumulan en la cadena alimentaria en peces y mamíferos marinos (dependiendo del tipo de PCB) hasta 200.000 veces. Degradación por fotólisis y biodegradación en el sedimento: los PCBs con número mayor de 6 cloros, resisten la degradación aerobia.

**Suelo:** Se adsorben fuertemente. Los volátiles pueden evaporarse y pasar a la atmósfera. No suelen pasar como lixiviados a las capas inferiores, excepto en zonas de residuos, donde pasan en pequeñas cantidades. Se acumula en la cadena trófica terrestre (hojas/suelo – lombriz – aves, hojas – orugas – aves). El ciclo aire-agua-suelo se repite durante décadas.

**Alimentos:** Como son compuestos lipofílicos, se ha encontrado que el pescado es uno de los principales fuentes de exposición humana a los PCBs a través de la dieta, especialmente los de alto contenido de grasa. (Lázaro, R., *et. al.*, 2002).

### ***Metodología analítica***

La metodología tradicional de análisis de estos compuestos ha sido la cromatografía de gases con detector de captura de electrones. La inespecificidad, de este tipo de detector, hace recomendable la utilización de un espectrómetro de masas como sistema de confirmación. Esto es viable cuando los compuestos puedan encontrarse a nivel de traza, pero si el análisis se quiere realizar sobre los residuos que puedan aparecer en un alimento donde los niveles son de ultratrazas (ng/kg), el uso de un cromatógrafo de gases conectado con un espectrómetro de masas de alta resolución o a un detector masas-masas se hace imprescindible (Antón A., Lizaso, J., 2001).

El procedimiento general de análisis de los PCBs incluye las siguientes etapas: muestreo, extracción de los analitos de interés, purificación, determinación, la cual incluye identificación y cuantificación de los analitos y confirmación.

### ***Extracción***

Debido su carácter lipofílico, estos compuestos se encuentran depositados en la parte grasa de las muestras y sus concentraciones se ajustan frecuentemente a las variaciones en el contenido lipídico de las mismas. La extracción de los PCBs de las matrices se realiza, habitualmente, mediante métodos de extracción con disolventes orgánicos, entre los más utilizados se encuentran el hexano, acetonitrilo, diclorometano, acetato de etilo, éter de petróleo, tolueno, etc.

Para muestras líquidas se ha empleado en numerosas ocasiones la extracción líquido-líquido (Mondon, J. A., *et. al.*, 2001), mediante agitación de la muestra acuosa con un disolvente orgánico, esto con el fin de transferir el analito a la fase orgánica. Otra técnica también muy utilizada es la extracción en fase sólida (Pitarch, E., *et. al.*, 2003), eligiendo un adsorbente y un disolvente de elución apropiados.

La extracción con Soxhlet es un procedimiento estándar de extracción de estos residuos en productos grasos, la cual ha sido empleada

por numerosos autores (Montone, R. C., *et. al.*, 2001; Binelli, A., Provini, A., 2003; Reyes, G. G., *et. al.*, 2003). Sin embargo, esta técnica requiere mucho tiempo y grandes volúmenes de disolventes, que deben ser, posteriormente, eliminados.

Frente a las técnicas de extracción con solventes convencionales se emplean otras alternativas, que utilizan pequeñas cantidades de disolventes y reducen el tiempo de extracción, además de proporcionar un extracto más limpio, evitando en algunos casos, la fase de purificación. Son, por ejemplo, la extracción asistida con microondas, extracción mediante ultrasonidos, extracción con solventes acelerados y la extracción con fluidos supercríticos (Berg, B. E., *et. al.*, 1999; Mannila, M., *et. al.*, 2002; Nilsson, T., *et. al.*, 2003).

Actualmente muchos investigadores emplean la microextracción en fase sólida (SPME) con fibras de polidimetilsiloxano, la cual es una técnica de adsorción/desorción simple y efectiva, que elimina la necesidad de usar solventes y aparatos para la concentración de los compuestos.

### ***Purificación***

Generalmente las técnicas de análisis de matrices complejas, alimentos, grasa o tejidos son prolongadas y conllevan la coextracción de otras sustancias al mismo tiempo que los residuos de interés, los cuales pueden interferir en posterior determinación.

Entre los procedimientos más empleados para eliminar las sustancias coextraídas de los residuos a analizar, destacan la partición líquido-líquido, la cromatografía de adsorción y la purificación en fase sólida con columnas apropiadas, los tratamientos con ácidos o álcalis, la volatilización forzada o destilación por arrastre y la cromatografía de permeación sobre gel.

### ***Fraccionamiento***

El fraccionamiento de las tres familias, PCBs coplanares, PCBs y PCDD/Fs, se puede realizar por SPE. Con este método se obtienen buenas recuperaciones, variabilidades bajas y blancos correctos. Los extractos se concentran en viales y se adiciona, para el análisis instrumental, un patrón

de inyección, ya sea GC- $\mu$ ECD en el caso de los PCBs orto sustituidos, HRMS/EI-SIM para la determinación de las PCDD/Fs y los PCBs no-orto sustituidos.

### ***Determinación***

La cromatografía de gases con detector de captura de electrones, con fuente de Níquel Ni<sup>63</sup>, aún es, probablemente, la técnica analítica más empleada para el estudio de muestras medioambientales, debido a su gran sensibilidad y especificidad para los PCBs.

Las columnas utilizadas por la cromatografía de gases, en la investigación de residuos organoclorados, pueden ser tanto columnas empaquetadas como capilares. Actualmente las más empleadas son las capilares, debido a las numerosas ventajas que éstas presentan. La fase estacionaria, elegida por la mayoría de los autores, para la identificación y cuantificación de los PCBs es de 5% fenil 95% metil polisiloxano y en segundo lugar se encuentra la de 100% metil polisiloxano.

### ***Confirmación***

Una vez separados, detectados y cuantificados los analitos, es necesaria su confirmación, ésta se puede realizar mediante espectrometría de masas o mediante análisis cromatográficos adicionales.

La espectrometría de masa es, desde un punto de vista analítico, la técnica preferida de confirmación e incluso de determinación, la cual comienza a reemplazar a la cromatografía de gases con detector de captura de electrones. En algunos casos se emplean espectrómetros de masas de alta resolución, especialmente en la determinación de los PCBs coplanares (77, 126, 169), analizados a bajas concentraciones.

La ionización de la muestra puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos, siendo el de impacto electrónico el más utilizado.

## **DIOXINAS Y FURANOS**

### ***Recuerdo histórico***

El termino "dioxina" abarca un grupo de 75 policlorobenzenos-p-dioxinas (PCDD) y 135 policlorodibenzofuranos (PCDF). De estos, 17 entrañan

riesgos toxicológicos, siendo el congénere más tóxico el 2,3,4,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxinas (TCDD).

Las policlorodibenzodioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF) forman dos grupos de compuestos químicos que son, al igual que los PCBs, altamente persistentes en el medioambiente. A diferencia de otros compuestos organoclorados, que se han convertido en contaminantes habituales, como PCBs y pesticidas, son compuestos que no se han fabricado ni comercializado nunca a escala industrial (excepto para investigación), ya que no se les conoce ninguna aplicación práctica.

Hasta hace poco, se creía que no se podían producir de forma natural y que su presencia era debida a factores exclusivamente antropogénicos, sin embargo, su formación es posible en toda combustión de sustancias orgánicas (no necesariamente cloradas), si se encuentran presentes pequeñas trazas de un donador de cloro.

Entre las principales particularidades, que caracterizan a estas sustancias, cabe destacar las propiedades altamente tóxicas de algunas de ellas, así como que éstas son generadas en una gran variedad de procesos industriales y de combustión, como por ejemplo, en procesos de incineración de residuos; se han convertido en contaminantes persistentes del medioambiente, en el cual se encuentran ampliamente distribuidas en concentraciones muy pequeñas. También es necesario añadir el hecho que, a lo largo de los últimos años, se han visto involucradas en distintos incidentes de contaminación ambiental. (MOPTMA, 1996).

### ***Definición y estructura química***

Su estructura básica la constituyen dos anillos aromáticos, unidos por uno o dos átomos de oxígeno (furanos y dioxinas respectivamente), con distintos grados de sustitución de átomos de cloro.

El grado de cloración de los anillos y de la posición de estos átomos de cloro, es lo que confiere la toxicidad a cada molécula. Así, de los 210 isómeros que constituyen la familia de dioxinas y furanos, solo 17 presentan una configuración con carácter tóxico (Antón A., Lizaso, J., 2001).

Las dioxinas y los furanos no se sintetizan deliberadamente, excepto en pequeñas cantidades para trabajos de investigación.

Se producen de forma involuntaria, básicamente de dos maneras:

- En el proceso de fabricación de algunos pesticidas, conservantes, desinfectantes o componentes del papel.
- Cuando se queman materiales a bajas temperaturas, como algunos productos químicos, gasolina con plomo, plástico, papel o madera. (Echarri Prim, L., 1998).

### ***Propiedades***

Dada la similitud estructural entre PCDFs y PCDDs, ambos presentan propiedades fisicoquímicas análogas; son sólidos cristalinos de color blanco, con puntos de fusión y ebullición relativamente elevados. Son muy estables térmicamente y sólo se descomponen a temperaturas bastante elevadas. Debido a dicha estabilidad térmica, son difícilmente destruidos en los procesos de combustión y su formación se ve favorecida, termodinámicamente, en procesos térmicos, en los que intervienen compuestos clorados.

Se les considera inertes químicamente, aunque se sabe que, en condiciones forzadas, pueden experimentar reacciones de sustitución.

Se ha comprobado que son relativamente sensibles a la radiación ultravioleta y a la luz solar, así como que, en condiciones apropiadas, experimentan reacciones fotoquímicas de degradación.

Una característica fundamental de estos compuestos es la lipofilia, la cual contribuye a su acumulación en los tejidos ricos en lípidos del organismo de los seres vivos, lo que los hace solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos (MOPTMA, 1996).

### ***Toxicología***

Las personas se ven expuestas a estos compuestos principalmente a través de los alimentos (más del 90%), siendo los de origen animal los que contribuyen mayoritariamente.

Una vez en el organismo, las dioxinas son acumuladas en hígado y tejido adiposo, siendo la metabolización y la excreción muy lenta, lo cual permite su bioacumulación.

De todos los posibles congéneres, el compuesto más tóxico es el 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-para-dioxin o 2,3,7,8-TCDD, considerado por la International Agency for Research on Cancer (IARC), como sustancia carcinogénica Clase 1, es decir, de toxicidad demostrada para el hombre.

Está identificada como el compuesto más tóxico de los generados por el hombre, siendo la dosis letal (DL<sub>50</sub>), en ratas, de tan solo 0.25 mg/kg. (Antón A., Lizaso, J., 2001).

Los primeros incidentes de intoxicación, atribuibles a la acción de las dioxinas, tuvieron lugar en la década de los 40s y 50s, en plantas industriales dedicadas a la producción de clorofenoles, herbicidas fenoxiácidos y compuestos relacionados, debido a que estos son contaminantes habituales, formados durante el proceso de fabricación de dichos productos.

En 1963, se produjo, en EEUU, una intoxicación masiva de pollos, debido a su alimentación basada en grasa comestible contaminada con pentaclorofenol, el cual, a su vez, estaba impurificado con PCDDs.

En la Guerra de Vietnam (1962-1970), los norteamericanos lanzaron sobre las selvas de Vietnam del Sur el denominado “agente naranja”, un producto defoliante que contenía como impureza 2378-TCDD. En las zonas contaminadas, se produjo un incremento en la incidencia de abortos espontáneos y malformaciones fetales. Algunos estudios, muestran un incremento en la incidencia de cáncer de hígado y tumores benignos en el tejido adiposo.

En 1968 tuvo lugar el accidente de Yusho, en Japón, anteriormente citado. Sin embargo de todos los accidentes el de mayor repercusión pública ha sido el de Seveso, el cual puede considerarse como ejemplo único de exposición humana aguda a la 2378-TCDD. Tuvo lugar en 1976 en la planta química de Seveso, debido a una explosión accidental en un reactor. Los efectos inmediatos fueron la muerte de un gran número de animales, así como la aparición, en alrededor de 200 personas, de cloroacné.

Poco después de este accidente, en 1977, se identificaron PCDFs y PCDDs en cenizas y emisiones de varias incineradoras de residuos sólidos urbanos en Holanda. Desde entonces, se ha comprobado que, lo anterior sucede en todas las incineradoras.

Además, la pirolisis o combustión incontrolada de PCBs, puede dar lugar a cantidades altas de PCDFs (MOPTMA, 1996).

Debido a la diferente toxicidad de los distintos isómeros, se ha definido el concepto de Factor de Equivalencia Tóxica (TEQ), que consiste en asignar, para cada isómero, una toxicidad relativa, en términos de la cantidad equivalente de la dioxina 2,3,7,8-TCDD.

El Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH), aprobó, el 30 de mayo de 2001, un dictamen en el que se fija una ingesta semanal tolerable para las dioxinas y PCBs similares a dioxinas, equivalente a 14 pg, de equivalente tóxico (EQT-OMS), por kg de peso corporal. Esta cifra está



en concordancia con la ingesta mensual tolerable, de 70 pg por kg de peso corporal, establecida por el Comité de expertos conjunto FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud).

El CCAH concluyó que la ingesta humana media de dioxinas y PCBs similares a dioxinas, en los países europeos, se estima en 1.2 a 3 pg/kg de peso corporal/día, lo que significa que, una parte considerable de la población europea, sobrepasa lo que se considera tolerable, desde el punto de vista toxicológico.

### ***Metodología analítica***

Hasta ahora, la técnica de referencia utilizada para la determinación de estos compuestos, tanto en el campo medioambiental como en el análisis de alimentos, ha sido la cromatografía de gases/espectrometría de masas de alta resolución (GC/HRMS), ya que ésta presenta gran sensibilidad y selectividad.

Debido a la complejidad de la técnica GC/HRMS y a su elevado costo, tanto por la elevada inversión en instrumentación, como en personal especializado, sólo se puede llevar a cabo en Centros de Investigación de cierta envergadura. Por ello, existe una fuerte demanda de métodos y tecnologías alternativas más económicas, que permitan la determinación de dioxinas en laboratorios de control de calidad de forma rutinaria.

Entre estas alternativas, se encuentra la cromatografía de gases/espectrometría de masas-masas (CG/MS/MS). Otra alternativa es planteada mediante la aplicación de métodos, donde son utilizadas técnicas de tipo biológico, en general de menor costo y mayor rapidez que las técnicas químicas. Los ensayos bioanalíticos se pueden agrupar en inmunoensayos y bioensayos. La principal ventaja de estas técnicas es que se ven acompañados de métodos de extracción rápida y purificaciones sencillas (Antón A., Lizaso, J., 2001).

### ***Estudios de detección de COPs en Alimentos***

Recientes estudios han comprobado que, pese a que la mayor parte de las dioxinas en alimentación suelen llegar al ser humano a través de la leche, huevos y carne, en España, la dieta Mediterránea, de vegetales y cereales, contribuye significativamente a los altos niveles de ingesta de dioxinas y

furanos (PCDD/Fs) (Schuhmacher, M., *et al.*, 1997; Domingo, J., *et al.*, 1999). Por ejemplo, mientras que el Equivalente de Toxicidad (TEQ) procedente de carne, huevos, grasas, aceites, leche y productos lácteos era de 117 pg TEQ día<sup>-1</sup>, cuando se le sumaban verduras, legumbres, cereales y frutas, ésta alcanzaba 210 pg TEQ día<sup>-1</sup>.

Un muestreo de los niveles de contaminantes, realizado en aceites de pescado, comercializados en Europa (Jacobs, M. N., *et al.*, 1997; 1998), dio como resultado contaminación en la mayoría de las muestras. En el caso de España, los contaminantes más frecuentes eran: 16 µg l<sup>-1</sup> de HCB, 93 µg l<sup>-1</sup> de HCH, 69 µg l<sup>-1</sup> de DDT y 261 µg l<sup>-1</sup> de PCB

Un estudio realizado en los ríos catalanes, detectó niveles de contaminantes muy altos (López Martín, *et al.*, 1995), especialmente en el cauce bajo de los ríos Ter y Ebro (181 ppb en PCB; 81 ppb de DDT; 21 ppb de HCH), y se encontró que los niveles de heptacloro excedían los límites admisibles. En los análisis sobre peces de acuicultura en León, se comprobó que todas las muestras tenían contaminación por organoclorados (Sahagún, A., *et al.*, 1997), incluso la presencia de contaminantes fue evidente en lagos remotos de los Pirineos (Sánchez, J., *et al.*, 1993), donde la única fuente de contaminación es por vía atmosférica. Existe poca información sobre los restos de contaminantes, como el hexaclorobenceno (HCB), en carne. Dentro de los datos analizados en España, se encontraron niveles muy altos, especialmente en pollos, que superaban a los detectados en puntos como Australia, Vietnam, Tailandia o la India. En leche se han detectado niveles de contaminación por HCB de 19 µg kg<sup>-1</sup> en grasa. Otros contaminantes encontrados alcanzaban 56 µg kg<sup>-1</sup> en grasa de DDT, 43 µg kg<sup>-1</sup> en grasa de HCH, 26 µg kg<sup>-1</sup> en grasa de Dieldrín (Herrera, A. Ariño, *et al.*, 1996). Un análisis realizado sobre muestras de leche de 12 granjas en España (Ramos, L., *et al.*, 1996; 1997), comprobó que el nivel de dioxinas era mayor en aquellas zonas que se encontraban cercanas a plantas incineradoras, fábricas químicas o metalúrgicas; mientras que en las más alejadas de estos centros industriales los datos de PCDD/Fs daban cifras que iban entre 1,3 y 2,47 pg TEQ g<sup>-1</sup> en grasa, en las otras se llegaban a medir 3,80 pg TEQ g<sup>-1</sup>. Un estudio sobre diferentes tipos de infusiones realizado en España (Fernández, N., *et al.*, 1993), encontró residuos de plaguicidas, con niveles de 78 µg kg<sup>-1</sup> de aldrina, 353 ug kg<sup>-1</sup> de lindano y 28 ug kg<sup>-1</sup> de gama-HCH. El informe no explicaba de donde procedían las plantas, pero apuntaba como razón de estos altos niveles de plaguicidas a su uso sobre éstas, a pesar de estar prohibidos hace años. Los mayores residuos de aldrina se encontraron en

manzanilla, mientras que los de HCH eran en tila. El té negro mostró niveles más bajos.

Se determinaron los niveles de PCBs en ciertas especies de los pescados del Mar del Norte; entre estos análisis, se encuentra el estudio de siete especies de trucha, obtenidas de una granja de pescados en Bélgica. Los resultados de dichos análisis de los congéneres de PCBs demuestran que, el PCB-153 es el congéner más abundante de casi todas las muestras, con una significativa contribución del congéner 138. Se observó una correlación entre las concentraciones del PCB y el porcentaje de grasa en pescados, indicando un riesgo de comer pescados contaminados con PCBs (Baeyens, W., *et. al.*, 2002).|

En otros estudios, fueron evaluados los niveles de los PCBs y pesticidas organoclorados en suplementos dietéticos, ricos en omega-3, de aceites de pescado y vegetal. Todas las muestras del aceite de los pescados contuvieron residuos perceptibles de contaminantes organoclorados. La mezcla de aceites de pescado y vegetales presentó niveles más bajos que las grasas naturales del pescado entero en los aceites vegetales. Los aceites de los pescados demostraron menos contaminación comparada con los datos anteriores, sugiriendo que, los progresos en el proceso, tal como desodorización y el desarrollo alimenticio del perfil en crear equilibrios esenciales de ácido graso del grado óptimo específico, están mejorando la calidad de tales suplementos para el consumidor (Jacobs, Miriam, *et. al.*, 2002).

En las Costas Suecas del Este se determinaron los niveles de PCBs, y pesticidas organoclorados, en salmones atrapados a lo largo de la costa, así como sus implicaciones en la exposición humana debido al consumo de estos peces. El estudio incluía análisis de diferencias encontradas de concentraciones geográficamente, donde se encontró un máximo de concentraciones en los sitios intermedios.

La acumulación de PCBs puede depender de la edad, tamaño o especie de los pescados, pero otros factores, particularmente migración, variaciones en la intensidad de la contaminación o la longitud de la época de la exposición, pueden también influir en los niveles de PCBs en ellos. Se observaron variaciones anuales en la costa del Este, pero éstas fueron más altas que los valores observados en la costa del Oeste.

Los peces capturados en 1992, presentaron valores más altos de PCBs, que los capturados en 1996. Este hecho estuvo asociado con un mayor contenido de grasa (23%), para los salmones en 1992, comparado con el contenido de grasa (10%), encontrado en 1996. En cuanto al PCBs *no-orto*,

los valores tóxicos de la equivalencia (TEQ) siguieron esencialmente la misma distribución del patrón que los niveles de los otros congéneres del PCB (Atuma, S. S., *et. al.*, 1998).

En México, se han realizado estudios desde 1972, en diferentes regiones del Golfo de México, Lagunas, Ríos y Océano Pacífico. Se detectaron concentraciones de COPs. en especies marinas, como ostras (Botello, A. V., *et. al.*, 1994; Sericano, J. L., *et. al.*, 1990; Sericano, J. L., *et. al.*, 1993), camarones (Reyes, G. G., *et. al.*, 1999; Reyes, G. G., *et. al.*, 1999), peces, (Botello, A. V., *et. al.*, 2000; Giam, C. S., *et. al.*, 1974; Lewis, Michael A., *et. al.*, 2002; Ordóñez, B. R., 1997), grasa de ballena e hígado de delfín (Kuehl D.W., Haebler, R., 1980), en carne, grasa y órganos de res (Waliszewski, S., *et. al.*, 1996), carne de pollo y huevos (Albert, L., S. Saval., 1976), leche y productos lácteos (Albert, Lilia A., 1990; Prado, G., *et. al.*, 1998); todas éstas, posiblemente, debidas al proceso de bioacumulación en tejidos grasos.

En el Golfo de México y mar del Caribe, además de detectar la presencia de varios compuestos, se analizó la procedencia de las muestras, encontrándose más altos niveles de concentraciones en áreas costeras que en aguas profundas (Giam, C. S., *et. al.*, 1972). Otro estudio, observó mayor concentración de estos compuestos en especies de peces grasos, aumentando la concentración de acuerdo a la edad y tamaño del pez (Giam, C. S., *et. al.*, 1974). Varias investigaciones, observaron que las concentraciones de algunos compuestos eran elevadas a pesar de estar restringidos y prohibidos (Osuna-Flores, I., Riva, M. C., 2002).

Estudios realizados en músculo de pescado, señalaron un aumento de las concentraciones en zonas costeras cerca de áreas pobladas y utilizadas para descarga de drenaje (Lewis, Michael A., *et. al.*, 2002). Se hicieron comparaciones de concentraciones de COPs en agua, biota, y sedimentos, encontrándose mayor concentración en biota (Giam, C. S., *et. al.*, 1976). Las estaciones del año, fueron otro parámetro considerado, donde se observaron mayores concentraciones en verano y otoño.

El compuesto más detectado y estudiado es el DDT y sus metabolitos (p, p'TDE, p, p'DDE), después le siguen los PCB, dieldrin, endrina, aldrin clordano, heptacloro y lindano. Diferentes concentraciones de estos compuestos, han sido detectadas en leche materna (Albert, L., 1981) y tejido adiposo humano (Albert, L., *et. al.*, 1980). Mientras que, en 1980, autoridades de salud en el laboratorio de Irapuato detectaron DDT, Dieldrin, Heptacloro y Lindano en 500 muestras de cultivos de fresa (SARH, 1980); otros estudios comprobaron la presencia de residuos de p-p' DDT y su

metabolito p-p' DDE en 90% del huevo comercializado en las ciudades de México, D.F. y Torreón, Coah. (Albert, L., S. Saval., 1976). Otro estudio, realizado por el mismo grupo, demostró la presencia de entre 2 y 8 organoclorados en 30 muestras de quesos, provenientes de 11 ciudades mexicanas, siendo el promedio de 5 organoclorados por muestra (Albert, L., R. Reyes, 1978).

En México, se encontraron residuos de DDT y sus metabolitos en huevo, leche, queso, mantequilla y crema en la región de la Comarca Lagunera (1975, 1981 y 1987), Ciudad de México (1978 y 1981) y en el Soconusco, Chiapas (1990 y 1988). Otros estudios encontraron Lindano, Clordano y HCB, así como sus metabolitos, en sangre proveniente de cordón umbilical, suero y leche humana, en Veracruz, Campeche y gran parte de la región del Golfo de México y sur del país (Waliszewski, S, *et. al.*, 1996; 1997a; 1997b). Fueron también encontrados en aves (pato silbador, buitre, paloma, cormorán doble cresta), peces (mojarra negra, róbalo, lisa, charal, mayacaste, lebrancha), crustáceos (jaiba, camarón), almejas y ostiones, en estudios realizados en Sinaloa, Mexicali, Chiapas, Coatzacoalcos y lagunas costeras de Veracruz. Así como PCB en sedimentos y organismos de los sistemas costeros en lagunas de Veracruz y Campeche (Botello, Alfonso V., *et. al.*, 1996; Martín, Michael; Gutiérrez-Galindo, Efraín, *et. al.*, 1989).

## BIBLIOGRAFÍA

Albert, L. 1981. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna y riesgo para la salud. Boletín OPS, XCI (1) p.15-29.

Albert, Lilia A. 1990. Environmental contaminants in Mexican food. Div. Estud. Contam. Ambiental, Inst. Nac. Invest. Recur. Bioticos, Xalapa, Mex. Adv. Environ. Sci. Technol, 23 (Food Contam. Environ. Sources), 541-77.

Albert, L., M. E. Cebrian, F. Mendez y A. Portales. 1980. Plaguicidas organoclorados III. Organochloride pesticides in human adipose tissue in Mexico. Arch. Environ. Health 35 (5) p.7

Albert, L. y S. Saval. 1976. Residuos de plaguicidas organoclorados en carne de pollo y en huevo. Rev. Soc. Quim. Mex 20 (3) p.6).

Albert, L. y R.Reyes. 1978. Plaguicidas organoclorados II. Contaminación de algunos quesos mexicanos por plaguicidas organoclorados. Rev.Soc. Quim. Mex, 22(2) p.65-72.

Andersson, P. L., Berg, A. H., Bjerselius, R., Norrgren, L., Ols\_en, H., Olsson, P.-E., Orn, S., & Tysklind, M. 2001. Bioaccumulation of selected PCBs in zebrafish, three-spined stickleback and Artic char three different routes of exposure. Archives of Environment Contamination and Toxicology, 40 (4), 519–530. May.

Angulo R., Martinez, P., Jodral ML. 1999. PCB congeners transferred by human milk, with an estimate of their daily intake. Food And Chemical Toxicology 37 (11): 1081-1088 Nov.

Antón, A., Lizaso, J., 2001. PCBs y Dioxinas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaría.

Arthur, C. L. Potter D.W., Buchholz K., Moltagh S. y Pawliszyn J. (1992), Solid-phase microextraction for the direct analysis of water: Theory and Practice, LC-GC, 10,656-658.

Atuma, S. S.; Aune, M.; Bergh, A.; Wicklund-Glynn, A.; Darnerud, P. O.; Larsson, L.; Olsson, M.; Sandstroem, O. 1998. National Food Administration, Polychlorinated biphenyls in salmon (*Salmo salar*) from the Swedish east coast. Organohalogen Compounds (1998), 39(Ecototoxicology, Environmental Levels, Northern Environments), 153-156.

Baeyens, W.; Leermakers, M.; De Gieter, M.; Elskens, M.; Noyen, J.; Hanot, V.; Degroodt, J.-M.; Goeyens, L. 2002.PCBs in North Sea fish: is there a health risk? Brussels, Belg. Organohalogen Compounds, 55(Dioxin 2002).

Beltrán, J. F. J. López, F. Hernández, 2000 J. Chromatogr. A 885 389.

Berdié, L., J. O. Grimalt, J. Chromatogr. A 823 (1998) 373.

Berg, B. E., Lund, H.S., Kringstad, A., Kvernheim, A.L. 1999. Routine analysis of hydrocarbons, PCB and PAH in marine sediments using supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Chemosphere* 38, 587-599.

Binelli, A., Provini, A. 2003. The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere* 53, 143-151.

Botello, A. V.; Rueda-Quintana, L.; Diaz-Gonzalez, G.; Toledo, A. 2000. Persistent organochlorine pesticides (POPs) in coastal lagoons of the subtropical Mexican Pacific. Institute for Marine and Limnological Sciences, Marine Pollution Laboratory, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mex. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* , 64(3), 390-397.

Botello, Alfonso V., José L. Rojas, Jorge A. Benitez, David Z. Lomelí. 1996. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias Universidad Autónoma de Campeche, EPOMEX.

Botello, A. V.; Diaz, G.; Rueda, L.; Villanueva, S. F. 1994. Organochlorine compounds in oysters and sediments from coastal lagoons of the Gulf of Mexico. *Inst. Mar. Limnological Sci., Natl. Autonomous Univ. Mexico, Mexico City, Mex. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53(2), 238-45.

Boyd-Boland A. A., Magdic S. y Pawliszyn J. B. 1996. "Simultaneous Determination of 60 pesticides in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry" *Analyst*, Vol. 121, 929-938.

Bush, B.; J. Snow, R. Koblitz, *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 13 (1984) 517.

Camel, V.; *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229.

Domingo, J., Schuhmacher, M., Granero, S. and Liobet, J. 1999. PCDDs and PCDFs in food samples from Catalonia, Spain. An assessment of dietary intake. *Chemosphere* 38(15): 3517-3528

Echarri Prim, L. 1998. *Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente*.

Erickson, M.D. 1986. *Analytical Chemistry of PCBs*. Ed. Butterworth Publishers. United States of America.

FEDNA. 2004. *Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal*.

Fernández, N., Sierra, M., García, J., Diez, M. and Terán, M. 1993. Organochlorine pesticide residues in black tea, camomile and linden. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50: 479-485

Fidalgo N., Giuseppe Centineo, Elisa Blanco-González, Alfredo Sanz-Medel. 2003. Solid-phase microextraction as a clean-up and preconcentration procedure for organochlorine pesticides determination in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection, *J. Chromatogr. A* 1017, 35-44

Giam, C. S.; Chan, H. S.; Neff, G. S. 1976 Concentrations and fluxes of phthalates, DDTs and PCBs to the Gulf of Mexico. *Dep. Chem., Texas A and M Univ., College Station, Tex., USA*. Editor(s): Windom, H. L.; Duce, Robert A. *Mar. Pollution Transfer*, 375-86. Publisher: Lexington Books, D. C. Heath Co., Lexington, Mass.

Giam, C. S.; Hanks, A. R.; Richardson, R. L.; Sackett, W. M.; Wong, M. K. 1972. DDT, DDE, and polychlorinated biphenyls in biota from the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. 1971. *Dep. Chem., Texas A and M Univ., College Station, Tex., USA*. *Pestic. Monit. J.* 6(3), 139-43.

Giam, C. S.; Richardson, R. L.; Taylor, D.; Wong, M. K. 1974. DDT, DDE, and PCB [polychlorinated biphenyls] in the tissues of reef dwelling groupers (Serranidae) in the Gulf of Mexico and the Grand Bahamas. *Texas A and M Univ., College Station, Tex., USA*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* ( ), 11(2), 189-92.

Grimalt, J. O. 2002. Los compuestos orgánicos persistentes en la biosfera: El enemigo global e invisible. *Métode* 34, 66-70.

Herrera, A., Ariño, A., Conchello, P., Lázaro, R., Bayarri, S., Pérez-Arquillué, C., Garrido, M., Jodral, M. and Pozo, R. 1996. Estimates of mean daily intakes of persistent organochlorine pesticides from Spanish fatty foodstuffs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 173-177

Hutzinger, O., Safe, S., Ziktko, V. 1974. *The Chemistry of PCBs*. Ed. CRC Press, Ohio. United States.

Jacobs, M., Johnston, P., Wyatt, C., Santillo, D. and French, M. 1997. Organochlorine pesticide and PCB residues in pharmaceutical, industrial and food grade fish oils. *Int. J. Environment and Pollution* 8(1-2): 74-93

Jacobs, M. N., Santillo, D., Johnston, P.A., Wyatt, C.L. and French, M.C. 1998. Organochlorine residues in fish oil dietary supplements: Comparison with industrial grade oils. *Chemosphere* 37(9-12): 1709-1721

Jacobs, Miriam; Covaci, Adrian; Gheorghe, Adriana; Schepens, Paul, 2002. Investigation of selected PCBs, PBDEs and organochlorine pesticides in omega-3 fatty acid rich dietary fish oil and vegetable oil supplements. *Organohalogen Compounds (2002)*, 57 Dioxin , 225-228.

Kataoka, H.; H. L. Lord, J. Pawliszyn, 2000 *J. Chromatogr. A* 880 35.

Keith, L. H. 1997. *Environmental Endocrine Disruptors. A Handbook of Property Data*. Ed. Wiley-Interscience. New York. United States.



Kuehl, D. W., Haebler, R. 1980. Organochlorine, organobromine, metal, and selenium residues in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) collected during an unusual mortality event in the Gulf of Mexico. Environ. Res. Lab.-Duluth, U.S. Environ. Res. Lab., Duluth, MN, USA. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28(4), 494-9.

Kuclik, J. R.; J.E. Baker, 1998. Environ. Sci. Technol. 32 1192.

Lázaro, R.; Bayarri, S.; Herrera, A.; Conchello, P.; Arino, A.; Yague, A.; Perez, C. 2002. Estimated dietary intake of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides from Aragonese (NE Spain) diet. Organohalogen Compounds, 55(Dioxin 2002), 323-326.

Lewis, Michael A.; Scott, Geoff I.; Bearden, Dan W.; Quarles, Robert L.; Moore, James; Strozier, Erich D.; Sivertsen, Scott K.; Dias, Aaron R.; Sanders, Marion. (2002), Fish tissue quality in near-coastal areas of the Gulf of Mexico receiving point source discharges. United States Environmental Protection Agency, Nheerl, Ord, Gulf Breeze, FL, USA. Science of the Total Environment 284 (1-3), 249-261.

Liem A. K. D., Baumann Ra, Dejong Apjm, Vandervelde Eg, Vanzoonen P, 1992 Analysis of Organic Micropollutants In The Lipid Fraction Of Foodstuffs. Journal Of Chromatography 624 (1-2): 317-339 Oct 30.

López-Martín, J. M., Ruizolmo, J. and Borrell, A. 1995. Levels Of Organochlorine Compounds In Fresh-Water Fish From Catalonia, New Spain. Chemosphere 31(6): 3523-3535

Lord, H.; Pawliszyn, J., 2000. Microextraction of drugs. Journal of Chromatography A 902 (1): 17-63 DEC 1.

Mannila, M., Koistinen, J., Vartiainen, T. 2002. Comparison of SFE with Soxhlet in the analyses of PCDD/PCDFs and PCBs in sediment. J. Environ. Monit. 4, 1047-1053.

Martin, Michael; Gutierrez-Galindo, Efrain. 1989. Pesticides and PCBs in oysters from Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Mar. Pollut. Stud. Lab., California Dep. Fish Game, Monterey, CA, USA. Mar. Pollut. Bull., 20(9), 469-72.

Meadows J., D. Tillit, J. Huckins, D. Schroeder, Chemosphere 11 (1993) 1993-2006.

Mondon, J. A., Nowak, B. F., Sodergren, A. 2001. Persistent Organic Pollutants in Oysters *Crassostrea gigas* and Sand Flathead *Platycephalus bassensis* from Tasmanian Estuarine and Coastal Waters. Mar. Pollut. Bull. 42, 157-161.

Montone, R. C., Taniguchi, S., Sericano, J., Weber, R.R., Lara, W.H. 2001. Determination of polychlorinated biphenyls in Antarctic macroalgae *Desmarestia* sp. The Sci. Total Environ. 277, 181-186.

MOPTMA. Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente. 1996. Dioxinas y Furanos. Problemática ambiental y metodología analítica. Ed. Centro de Publicaciones. Secretaría General Técnica. Madrid. España.

Mukherjee, I.; M. Gopal, J. *Chromatogr. A* 754 (1996) 33.

Nilsson, T., Sparring, S., Björklund E. 2003. Selective supercritical fluid extraction to estimate the fraction of PCB that is bioavailable to a benthic organism in a naturally contaminated sediment. *Chemosphere* 53, 1049-1052.

Olea, Nicolás 2004. Informe agricultura y Salud.

Ordóñez, B R. 1997. Specific working paper on pesticides, en *Memorias del simposium: the use of biological specimens for the assessment of human exposure to environmental pollutants*. Luxemburgo, p.295-301. Abril .

Osuna-Flores, I.; Riva, M. C. Organochlorine pesticide residue concentrations in shrimps, sediments, and surface water from Bay of Ohuira, Topolobampo, Sinaloa, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (2002), 68(4), 532-539.

Pitarch, E., Serrano, R., López, F.J., Hernández, F. 2003. Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 189-197.

Prado, G.; Diaz, G.; Mar, C.; Leon, S. Vega Y.; Gonzalez, M.; Perez, N.; Urban, G.; Gutierrez, R.; Ramírez, A.; Pinto, M. (1998), Organochlorine pesticide residues in commercial pasteurized milk in Mexico City. Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Coyoacan, Mex. *Archivos de Medicina Veterinaria* 30(1), 55-66.

Ramos, L., Eljarrat, E., Hernández, L., Alonso, L., Rivera, J. and González, M. 1996. Levels of PCDDs and PCDFs in farm cow's milk located near potential contaminant sources in Asturias (Spain). Comparison with levels found in control points and commercial pasteurized cow's milk. *Organohalogen Compounds* 28: 304-307

Ramos, L., Eljarrat, E., Hernandez, L. M., Alonso, L., Rivera, J. and Gonzalez, M. J. 1997. Levels of PCDDs and PCDFs in farm cow's milk located near potential contaminant sources in Asturias (Spain). Comparison with levels found in control, rural farms and commercial pasteurized cow's milks. *Chemosphere* 35(10): 2167-2179

Reyes, Guillermo Galindo; Villagrana L., Cecilio; Álvarez, Guadalupe Lazcano. 1999. Environmental Conditions and Pesticide Pollution of two Coastal Ecosystems in the Gulf of California, Mexico. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Mex. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44(3), 280-286.

- Reyes, G. Galindo, Montes Verdugo, J., Cassin D., Carvajal. R. 2003. Pollution by polychlorinated biphenyls in an estuary of the Gulf of California. Their toxicity and bioaccumulation in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 959-963.
- Safe, S. H. 1994. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Impact, Biochemical and Toxic Responses, and Implications for Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 24, 87-149.
- Sahagún, A., Terán, M., Garcia, J., Sierra, M., Fernández, N. and Diez, M. (1997) Organochlorine pesticide residues in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, taken from four fish farms in León, Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 779-786
- Sánchez, J., Sole, M. and Albaiges, J. (1993) A Comparison Of Distributions Of PCB Congeners and Other Compounds In Fishes From Coastal Areas and Remote Lakes. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 50(4): 269-284
- SARH. Dirección General de Sanidad Vegetal. 1980. Gráficas sobre el número de muestras y frecuencias de residuos de diferentes plaguicidas. México, D.F.
- Schuhmacher, M., Franco, M., Granero, S., Domingo, J., Liobet, J. and Corbella, J. .1997. Dietary intake of PCDD/Fs from food in Catalonia, Spain. *Organohalogen Compounds* 33: 431-435
- Sericano, Jose L.; Wade, Terry L.; Atlas, Elliot L.; Brooks, James M. 1990. Historical perspective on the environmental bioavailability of DDT and its derivatives to Gulf of Mexico oysters. *Dep. Oceanogr., Texas A and M Univ., College Station, TX, USA. Environ. Sci. Technol.* 24(10), 1541-8.
- Sericano, Jose L.; Wade, Terry L.; Brooks, James M.; Atlas, Elliot L.; Fay, Roger R.; Wilkinson, Dan L. National 1993. Status and Trends Mussel Watch Program: chlordane-related compounds in Gulf of Mexico oysters, 1986-90. *Geochem. Environ. Res. Group, Texas A and M Univ., College Station, TX, USA. Environ. Pollut.* 82(1), 23-32.
- Stijve T. and Cardinale E., 1974. Rapid determination of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls and a number of phosphated insecticides in fatty foods. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 65,131-150.
- Tuinstra, L. G. M. Th, W.A. Traag, H.J. Keukens, J. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980) 952.
- Veningerova, M. ; V. Prachar, J. Kovacikova, J. Uhnak 1997., *J. Chromatogr. A* 774 333.
- Waliszewski, S., Pardio VTS, Chantiri JNP, Infanzon, RMR and Rivera J. Organochlorine pesticide residues in adipose tissue of Mexicans. *Sci.Tot. Environ* 181: 125-131 (1996).

Waliszewski, S., Pardio, V., Aguirre, A., Coronel, H., Infanzon, R. And Rivera J. 1997a. Persistent organochlorine pesticides in bovine meat and milk from Veracruz (México). *Organohalogen Compounds* 32: 335-339.

Waliszewski, S. M., Pardio, V. T., Waliszewski, K. N., Chantiri, J. N., Aguirre, A.A., Infanzon, R. M. and Rivera J. 1997b. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *Science of the Total Environment* 208(1-2): 127-132.

Waliszewski, Stefan M.; Pardio-Sedas, Violeta T.; Waliszewski, Krzysztof N.; Chantiri-Perez, Jorge N.; Infanzon-Ruiz, Rosa Maria; Rivera, Jaime. 1996. Organochlorine pesticide levels in bovine meat and fat in Veracruz, Mexico Instituto de Medicina Forense de la Universidad Veracruzana, Veracruz, Mex. *Rev. Int. Contam. Ambiental* 12(2), 53-59.

Wells, D.E. 1993 in: D. Barceló (Ed.), *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance*, vol. 13, Elsevier, Amsterdam, Chapter 3, pp. 80-105.

Zaranko, T. D., Griffiths, R. W., & Kaushik, N. K. 1997. Biomagnifications of polychlorinated biphenyls through a riverine food web. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1463-1471.

## **Capítulo 4**

### **Microbiology of food irradiation**

*Microbiología de la irradiación de alimentos*

**Suresh D. Pillai, Ph. D.**

National Center for Electron Beam Food Research  
Texas A&M University. 418D Kleberg Center, MS 2472  
Texas A&M University. College Station, Texas 77843-2472  
Tel (979) 845-2994, Fax (979) 845-1921  
Email: [spillai@poultry.tamu.edu](mailto:spillai@poultry.tamu.edu)

## MICROBIOLOGY OF FOOD IRRADIATION

### Abstract

The impact of food-borne illnesses in developing and underdeveloped regions of the world, if tallied, would be at near catastrophic levels. The current level of human illness and the resulting economic impacts from pathogen contaminated foods is unacceptable. Food-borne illnesses are preventable. They can be prevented by improved food production methods, improved food processing technologies, and improved food preparation and consumption methods within homes. A number of food processing technologies have been developed and employed in recent years. Food irradiation, a food processing technology with out 50 years of research is a feasible solution to prevent food-borne illness and death around the world.

### *MICROBIOLOGÍA DE LA IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS*

### Resumen

El impacto de las enfermedades transmitidas por alimentos en regiones en desarrollo o subdesarrolladas del planeta podría estar cerca de niveles catastróficos. El nivel actual de enfermedades en humanos y el impacto económico resultante de alimentos contaminados con patógenos es inaceptable. Las enfermedades transmitidas por alimentos son evitables. Se pueden prevenir mejorando los métodos de producción de alimentos, las tecnológicas de proceso y los métodos de preparación y consumo de alimentos en los hogares. Un gran número de tecnologías de procesado de alimentos se han desarrollado y empleado en los últimos años. La irradiación de alimentos, una tecnología de procesado de alimentos con 50 años de investigación, es una solución viable para prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo.

## INTRODUCTION

A number of food processing technologies have been developed and employed in recent years. There is probably no other food processing technology that has so been extensively researched as food irradiation. However, none of the technologies has had the same level of promise, and also, unfortunately, the level of criticism and man-made hurdles as food irradiation. Food irradiation involves the use of ionizing radiation to destroy pests and pathogens from food and agricultural products. The aim of this contribution is to highlight the salient features and promise of the technology, provide a brief overview of the arguments and barriers against irradiated foods, identify the current technical challenges in employing this technology, and provide research road-map for food irradiation.

### **The implications of unsafe foods**

A majority of the reservoirs of pathogens that are known to cause human food-borne illnesses are food-animals such as cattle, poultry and swine. They harbor pathogens such as *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp., and toxigenic *E.coli* strains. These pathogens are responsible for causing sporadic illnesses and chronic complications in millions of people around the world (Tauxe, 1997). Meat and poultry products normally get contaminated due to inadequate disinfection, cross contamination, environmental contamination, and improper cooking and handling practices within homes. Environmental contamination of products such as cooked sausage, cooked corned beef and luncheon meats by *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp., is a major problem facing the Ready –To-Eat (RTE) food industry (Levine et al., 2001). Additionally, contaminated irrigation water can lead to the contamination of fruits and vegetables that are consumed either raw or with minimal processing such as green onions, cantaloupes, cilantro and lettuce. Recent studies have shown that in addition to bacterial pathogens, food borne gastroenteritis caused by viral agents such as Norovirus and Hepatitis A virus (HAV) is responsible for a significant number of human infections. Recently, over 500 people were infected from a single restaurant in Pennsylvania, USA by HAV after they consumed *salsa* that was prepared using green onions that were contaminated by the virus through irrigation water (CDC, 2003). Human enteric caliciviruses (HECVs) are also recognized as the key agent responsible for outbreaks of acute non-bacterial gastroenteritis (Koopmans and Duizer, 2004). Recent studies have shown that Noroviruses, a genus of HECVs, is among the leading cause of food-

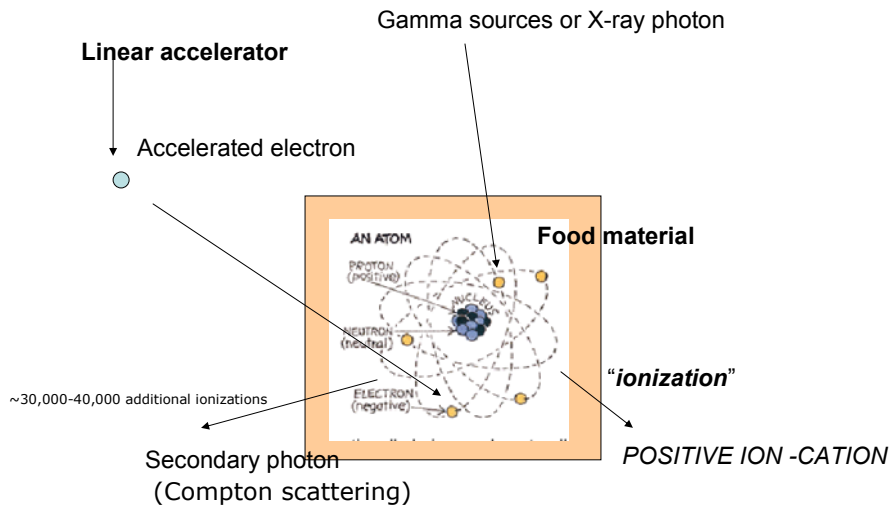
borne and waterborne gastroenteritis in the UK, US and the Netherlands (de Wit *et al.*, 2003; Hale *et al.*, 2000; Fankhauser *et al.*, 2002). The current United States estimates are that food borne illnesses cause over \$ 7 billion in economic loss each year. In the United States, over 74 million pounds of contaminated meat and meat products were recalled between 2000 and 2003 (USDA/FSIS, 2004). Foodborne contaminations are responsible for over 5,000 deaths and about 76 million cases of illnesses in the United States on an annual basis (Mead *et al.*, 1999).

### **Food Irradiation Technology**

Ionizing irradiation is one of the most extensively studied food processing technologies. The finding that ionizing radiation could destroy bacteria occurred in 1904, and the technology was evaluated as early as 1921 to destroy trichinae in pork (Josephson, 1983). Today, in 2003, we have nationally approved irradiation protocols for a variety of food products including uncooked meat and poultry products. Ionizing radiation is defined as radiation that has enough energy to remove electrons from atoms thereby leading to the formation of ions (Figure 1).

The unit for the dose of ionizing radiation (ie., the amount of energy deposited per unit mass of material) is (Gy) Gray.  $1000 \text{ Gy} = 1\text{kGy}$  ( $1 \text{ kGy} = 1 \text{ joule/gm}$ ). The sources of ionizing radiation are naturally radioactive isotopes, artificially created isotopes using nuclear reactors and linear accelerators. There are different types of ionizing radiation such as X-rays, gamma rays and beta rays depending on the source. However, all ionizing radiations function the same way, ie., strip electrons off the atoms thereby causing ionizations of the atoms in the food materials.





**Figure 1: Schematic representation of ionizing radiations**

The irradiation sources that have been internationally approved for food processing are gamma rays produced from radioisotopes cobalt-60 (1.17 and 1.33 MeV) and cesium-137 (0.662MeV), machine generated (ie., via linear accelerators) electron beams (max. energy 10 MeV) and X-rays (max energy 5MeV) (Codex, 1984). There are unique aspects to the construction and the engineering specifications of the facilities themselves depending on the type of ionizing radiation that is produced. For example, gamma facilities such as those employing cobalt-60, have specific characteristics to protect workers and the surrounding environment from the radioactive isotopes and for storing the isotope material under water when not in use. Electron (E-beam) (beta ray) and X-ray facilities on the other hand do not have the same shielding requirements as cobalt-60 facilities. Irradiation facilities *sell* irradiation doses. They do not sell or guarantee pathogen kill. It is incumbent upon the customer to independently develop, verify and validate the necessary irradiation doses that can achieve the desired levels of pathogen inactivation for their respective product.

Irrespective of the source and the facility providing the irradiation, all types of ionizing radiation destroys biological entities by essentially the same process. It causes “breaks” in the DNA or RNA double helix. It is believed that ionizing radiations disrupt normal cellular activity by damaging the nucleic acids by “direct” and/or “indirect” effects. Specifically, single or double stranded breaks occur on the DNA or RNA. (The evidence that RNA is also a target for ionizing radiations is the lethal effects observed when RNA containing viruses are subjected to these types of irradiations). Ionizing radiation does not discriminate between pathogens and non-pathogens, and so both, the indigenous normal flora and pathogens on a food product can be inactivated. The accelerated electrons during E-beam irradiation damage the nucleic acids by direct “hits”. Additionally, damage to the nucleic acids can also occur when the radiation ionizes an adjacent molecule, which in turn reacts with the genetic material. Water is very often the adjacent molecule that ends up producing a lethal product (Grecz et al., 1983). Ionizing radiation causes water molecules to lose an electron, producing  $\text{H}_2\text{O}^+$  and  $\text{e}^-$ . These products react with other water molecules to produce a number of compounds including hydrogen and hydroxyl radicals, molecular hydrogen, oxygen, and hydrogen peroxide. These products in turn react with other water molecules, with nucleic acids and other biologically sensitive molecules. The most reactive by products arising from the hydrolysis of water are the hydroxyl radicals (OH) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). These molecules are known to react with the nucleic acids and the chemical bonds that bind one nucleic acid to another in a single strand as well as with the bonds that link the adjacent base pair in an opposite strand. Since the precise location of where the ionization of water occurs and where the direct DNA hits occur, the damage sites on the DNA molecule are random. The indirect effects can also cause single and double-stranded breaks of the nucleic acids molecules. Though biological systems do have a capacity to repair both single stranded and double stranded breaks of the DNA backbone, the damage occurring from ionizing radiation is so probably so extensive, that bacterial repair of radiation damage at doses used in food irradiation is a near impossibility.

### **Response of Microbial Cells to Ionizing Radiation**

Microbial cells, depending on their physiological state and size can exhibit varying resistance to ionizing radiation. The radiation resistance of different bacterial types and microbial groups are compared by means of

their respective  $D_{10}$  values or as what is commonly referred to as the D-values. The  $D_{10}$  value or D value is defined as the ionizing radiation dose that is required to reduce the microbial load by 90%. Numerically, it is equivalent to the dose required for the “survivor curve” to traverse 1-log cycle. Mathematically, it is equal to the negative reciprocal of the survivor curve slope. The food industry attempts to achieve a 5 to 6-log reduction in pathogen levels in suspect foods. However, it must be emphasized that the basic assumption in these inactivation models is that the inactivation kinetics is linear. Bacterial cells in logarithmic growth phase have multiple copies of their genomes in one cell. This is an important point to consider, because the presence or the absence of multiple genome copies and the physiological status of the cell can dictate whether the cell can ultimately reproduce, i.e., the probability of “survivors” in a pathogen population exposed to ionizing irradiation. Similarly, the formation of bacterial endospores can enhance the radiation resistance of these organisms. Smaller the organism, the greater will be its resistance to ionizing radiation. Fungi are more sensitive to irradiation than bacterial cells which are more sensitive than viruses. The organism type depending on the cell wall characteristics can also modulate the effect of ionizing radiation. The physical and chemical make-up of the foods, presence or absence of oxygen, however, also plays very important roles in the ultimate destruction of the organisms. Organisms suspended in water are generally more susceptible to ionizing radiation than those in solid foods. Organisms present in fresh or refrigerated foods are more susceptible than those within frozen foods. Studies have shown that as the temperature is decreased from 30°C to -30°C, the  $D_{10}$  value also increases. This increased resistance is because as the product freezes, the water molecule migration decreases and thus, a greater ionizing dose is required to create the larger number of ionization events that are required to achieve the same extent of microbial kill (Thayer, 2004).

The  $D_{10}$  values of selected bacterial pathogens in meat and poultry is shown in Table 1.

It is thus clear the  $D_{10}$  values will depend on the temperature, the organism and the type of food material that is being irradiated.

### **Global Status of Food Irradiation**

Over 40 different countries have approved the use of food irradiation. The United States has the most number of approvals for the use of irradiation

on foods. However, the US Food and Drug Administration (FDA) considers irradiation as a food additive. The inappropriateness of this classification is evident when other processes such as baking, frying, boiling, etc. which also cause chemical changes in the food are not considered additives, but processes. The FDA authorizes the use of ionizing radiation for a number of food treatments including control of *Trichinella spiralis* in pork, growth and maturation inhibition of fresh foods, disinfection or arthropod pests in food, microbial disinfection of dry or dehydrated enzyme preparations and aromatic vegetable substances such as herbs, seeds, spices, vegetable seasonings, control of food borne pathogens in meat and poultry, sterilization of frozen, packaged meats used for space flight programs, control of Salmonella in fresh shell eggs and control of microbial pathogens on seeds for sprouting (Table 1). The use of food irradiation in the U.S must be in accordance with good manufacturing practices (GMPs) and that the foods not receive doses higher than the maximum as stipulated in the regulations. Importantly, the packaging materials subject to irradiation must also comply with the regulations pertaining to food irradiation, and the foods treated with ionizing radiation must be identified with the “radura” logo and the statement, “Treated with irradiation” or “Treated by irradiation”.

On an international level, foods such as apples, strawberries, bananas, mangoes, onions, potatoes, spices and seasonings, meat, poultry, fish, frog legs, and grains have been irradiated for many years. There is a worldwide standard for food irradiation. The standard was adopted by the Codex Alimentarius Commission, a joint body of the Food and Agricultural Organization (FAO) of the United Nations and the World Health Organization.

**Table I** : Selected D<sub>10</sub> values for selected pathogens on meat and poultry products (adapted from Molins, 2001)

<b>Target Organism</b>	<b>Temp (°C)</b>	<b>Product</b>	<b>D<sub>10</sub> value (kGy)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	Turkey breast meat	0.45
	30		0.16
<i>Campylobacter jejuni</i>	5	Ground turkey	0.19
	-30		0.29
<i>Salmonella Heidelberg</i>	0	Poultry (air packed)	0.24
	0	Poultry (vacuum packed)	0.39
	3	Ground beef	0.55 – 0.78
<i>Salmonella</i> spp.	5	Turkey breast meat	0.71
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	Beef	0.45
<i>E.coli</i> 0157:H7	5	Ground beef patties	0.27 – 0.38

The standard is based on the results of a Joint Expert Committee on Food Irradiation study that stated that irradiation of any food commodity up to 10 kGy presents no toxicological or nutritional hazards in foods. Canada has issued approvals for use on potatoes, onions, spices, dehydrated seasonings, wheat and flour. In Europe approval for food irradiation varied from country to country until 1999. The European Parliament has since then issued directives to establish a community list. The EU's framework directive 1999/2/EC covers general and technical aspects of the irradiation process, labeling of irradiated foods and conditions for authorizing food irradiation. It is implemented by Directive 1999/3/EC. The marketing of any product not complying with these Directives has been prohibited since March 2001. The current list contains only dried aromatic herbs, spices and vegetable seasonings. European Union member states that have a vested trade interest in promoting food irradiation are expected to influence food irradiation regulations across the EU.

## CONCLUSION

The technology to prevent food borne illnesses is available. Millions of lives can be saved if the microbiological safety of the foods is improved. However, there are regulatory roadblocks and consumer resistance (especially in the developed regions of the world) to food irradiation. With wider acceptance of this technology, international trade in irradiated foods will increase. Given the proven toxicological and nutritional safety of irradiated food products and ingredients it can be argued that regional or national barriers to irradiated foods constitute “illegal trade barriers” as defined by the WTO.

## Acknowledgements

This work was supported by Hatch funds H8708, the USDA-CSREES Special Grant establishing the National Center for Electron Beam Food Research at Texas A&M University and the USDA-IFAFS grant (# 00-52102-9637).

## REFERENCES

- CDC. 2003. Hepatitis A outbreak associated with green onions at a restaurant. Monaca, Pennsylvania, Dispatch, 52, 1-3.
- Codex Alimentarius Commission. 1984. Codex General Standards for Irradiated Foods and Recommended International Code of Practice for the Operation of Radiation Facilities Used for the Treatment of Foods. CAC, Vol XV. E-1, FAO, Rome.
- deWit, M.A.; Koopmans, M.P.; van Duynhoven, Y.T. 2003. Risk factors for norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg. Inf. Dis.* 9(12), 1563-70.
- Fankhauser, R.L.; Monroe, S.S.; Noel, J.S.; Humphrey, C.D.; Bresee, J.S.; Parashar, U.D.; Ando, T.; Glass, R.I. 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Inf. Dis.* , July 1, 186(1), 1-7.
- Grecz, N.; Rowley, D.B.; Matsuyama, A. 1983. The action of radiation on bacteria and viruses, in *Preservation of foods by ionizing radiation*. Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hale, A.; Mattick, K.; Lewis, D.; Estes, M.; Jiang, X.; Green, J.; Eglin, R.; Brown, D. 2000. Distinct epidemiological patterns of Norwalk-like virus infection. *J. Med. Virol.*, Sep., 62(1), 99-103.
- Johnson, A.M.; Reynolds, A.E.; Chen, J.; Resurreccion, A.V.A. 2004. Consumer attitudes towards irradiated food: 2003 vs 1993. *Food Protection Trends*. 23, 408-418.
- Josephson, E.S. 1983. An historical review of food irradiation. *J. Food Safety.*, 5, 161.

- Koopmans, M.; Duizer, E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Intl. J. Food Microbiol.* Jan. 1, (90), 23-41.
- Levine, P.; Rose, B.; Green, S.; Ransom, G.; Hill, W. 2001. Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990-1991. *J. Food Prot.*, 64: 1188-1193.
- Mead, P.S.; Slutsker, L.; Dietz, V.;McCaig, L.F.; Bresee, J.S.; Shapiro, C.; Griffin, P.M.; Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Inf. Dis.*, 5(5), 607-625.
- Molins, R.A. 2001. Irradiation of meats and poultry, pp 131-192. In *Food Irradiation: A source book*, E.A. Murano (ed). New York, Wiley
- Tauxe, R.V. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Inf. Dis.*, 3, 425-434.
- Thayer, D.W.2004. Irradiation of food helping to ensure food safety. *New Engl. J. Med.* , 350(18), 1811-1812.
- USDA/FSIS. 2004. FSIS Recalls. Closed Federal Cases. [http://www.fsis.usda.gov/Fsis\\_Recalls/Closed\\_Federal\\_Cases\\_2004/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Fsis_Recalls/Closed_Federal_Cases_2004/index.asp)

## **Capítulo 5**

### **Alimentos transgénicos**

*Transgenic foods*

**Dr. Víctor Pecina Quintero**

Investigador de Biotecnología. Campo Experimental Río Bravo. INIFAP.

Carr. Matamoros-Reynosa km. 61. Río Bravo, Tam. México.

Email: [pecina.victor@inifap.gob.mx](mailto:pecina.victor@inifap.gob.mx)



## ALIMENTOS TRANSGÉNICOS

### Resumen

El Banco mundial estima que durante los próximos 25 años, los países en desarrollo deberán de duplicar su producción de alimentos si quieren alimentar a su población. Sin embargo, no será suficiente el empleo de la fertilización química y la irrigación para lograr esta meta, además las condiciones ambientales y las sequías extremas pueden agravar tal situación. Por ello, es necesario explorar todas las posibilidades que puede brindar el uso de la biotecnología, para hacer frente a este gigantesco reto. Con el uso, movilización y consumo de alimentos derivados de Organismos Genéticamente Modificados (OGM) o transgénicos, surgen diferentes controversias y se explota sin argumentos válidos la ignorancia del público. El presente trabajo es una pequeña revisión bibliográfica, evidentemente existe mucha mas y tiene como objetivo informar acerca de lo que es un OGM, como se define un alimento transgénico, el valor nutricional de los mismos, en que alimentos es posible encontrar productos derivados de los OGM, las ventajas de los cultivos transgénicos, los riesgos que pudieran existir para la salud y medio ambiente y la metodología empleada para su detección.

## TRANSGENIC FOODS

### Abstract

According to the World Bank estimations, in the next 25 years developing countries should duplicate food production to feed their increasing population. However, chemical fertilization and irrigation will not be enough to achieve this goal. Furthermore, climatic conditions, especially extreme drought, aggravate this situation. There is a need to explore all possibilities that biotechnology can offer to address this gigantic challenge. The use, transportation and consumption of food products obtained from Genetically Modified Organisms (GMO), also called transgenics, have caused controversy and some people are taking advantage, without valid arguments, of the ignorance of the public on this topic. This work is a brief bibliographic research, because there is a lot of information, whose objective is to inform about: what a GMO is, what a transgenic food is, the nutritional value of transgenic food, in which food products it is possible to find GMO's, advantages of transgenic crops, human health and possible risks by environment, and the methodology used for their detection.

## INTRODUCCIÓN

Los avances de la Ingeniería genética estuvo limitada hasta hace poco tiempo, a los laboratorios de investigación y a las industrias que utilizan la fermentación en alguno de sus procesos, todo bajo ambientes controlados y aislados, donde el comportamiento de los organismos manipulados es relativamente fácil de vigilar, y donde se aplican medidas y regulaciones que han funcionado razonablemente bien. Después de más de dos décadas de su implementación, no se ha producido ningún accidente, ni se ha materializado ninguna amenaza a la seguridad de los trabajadores o al entorno ecológico. Sin embargo, conforme se han desarrollado nuevos organismos genéticamente modificados (OGM) y dejado su confinamiento, para pasar al campo primero en pequeños ensayos y ahora con la siembra en grandes superficies a escala comercial, crece el debate sobre la seguridad de utilizar estos organismos y sus posibles repercusiones ambientales y/o efectos negativos para la salud, como alergenicidad, toxicidad, etc. El Banco Mundial estima que en los próximos 25 años los países en desarrollo deberán duplicar su producción de alimentos si quieren alimentar a su población. Sin embargo, se estima que ni la fertilización química, o la irrigación, serán suficientes para lograr esta meta, además los problemas ambientales y las sequías extremas pueden agravar tal situación. Por ello es necesario explorar todas las posibilidades que brinda la Biotecnología para ayudar a hacer frente a este gigantesco reto, sin olvidar que la tecnología desarrollada deberá ser compatible con el medio ambiente, la cultura, las tradiciones y la economía. Aunque se han establecido en México normas para la movilización, importación y establecimiento de OGM, existen todavía muchas dudas al respecto, y organismos opositores a los OGM explotan sin argumentos válidos la ignorancia del público, suscitando dudas e interrogantes que en muchos casos ya han sido resueltos, por años de experimentación. Los consumidores norteamericanos han estado ingiriendo alimentos transgénicos y utilizando aditivos e ingredientes manipulados genéticamente, durante mas largo tiempo sin encontrarse al parecer ningún daño a la salud. México como socio de Estados Unidos y Canadá importa granos y en especial maíz, de los EEUU en donde no se segrega el grano transgénico del que no lo es y tampoco se identifica, ya que en ese país no hay reglamentaciones que así lo requieran.

## **¿Qué es un Organismo Genéticamente Modificado (OGM)?**

Un organismo genéticamente modificado (OGM) se obtiene al introducir un fragmento de ADN de una especie, en el ADN de otra. De esta forma se obtiene el mismo organismo principal pero con la información añadida de otra especie y se define como OGM al "organismo, con la excepción de los seres humanos, en el que el material genético ha sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural". Las técnicas de ingeniería genética permiten aislar uno o varios genes de un ser vivo (virus, bacteria, vegetal, animal e incluso humano) para introducirlo en el patrimonio genético de otro ser vivo, alterando su constitución genética. Esta alteración en el material genético se puede deber a la introducción, eliminación o modificación de sus genes. Son considerados OGM los organismos vivos capaces de reproducirse. Por ejemplo, el cultivo de soya. La soya es una leguminosa, utilizada como fuente proteica en la alimentación animal y humana, y cuya semilla puede formar nuevas plantas. Los productos derivados de los OGM, sin embargo, han sido manipulados de modo que contienen sólo material modificado genéticamente, pero no organismos vivos. El ejemplo lo tenemos en la lecitina de soya, que se obtiene a partir de sucesivos refinados del aceite contenido en las semillas de soya, utilizada principalmente como emulgente.

El auge de los OGM inicia en 1994, cuando en Estados Unidos la Food and Drug Administration (FDA, institución oficial que regula los temas de seguridad alimentaria y de los medicamentos) autoriza la comercialización del primer vegetal con un gen ajeno al natural: el tomate "Flavr-Savr" de la compañía Calgene, que retrasa el ablandamiento característico del tomate. Posteriormente otros vegetales fueron modificados como la soya transgénica para hacerla resistente a herbicidas y el maíz para resistir determinados insectos, etc.

### **Alimentos transgénicos**

Un alimento transgénico es aquel que contiene uno o más ingredientes derivados de organismos modificados mediante ingeniería genética. La Comisión Europea los denomina novel foods o bien GM foods. Por lo cual todo alimento que se comercialice en Europa está sometido a una norma específica de etiquetado (Reglamento EC 1139/98). Además el 10 de enero de 2000, se publicó el Reglamento EC 49/2000 que especifica un

umbral del 1%, por debajo del cual la presencia de material transgénico se considera contaminación accidental. De igual forma el Reglamento EC 50/2000 extiende la norma de etiquetado de los aditivos alimentarios derivados de los OGM.

### **Valor nutricional de los productos de plantas transgénicas**

El contenido nutritivo de los productos de las plantas transgénicas es de fundamental importancia para los consumidores, las autoridades y la industria de la biotecnología. Debido, a que pueden ocurrir cambios inesperados durante las primeras etapas del desarrollo de los cultivos transgénicos, por lo que se debe confirmar que dichos cambios inesperados no hayan alterado el valor nutricional del cultivo, o de los productos derivados de éste. Ha sido establecido el valor nutricional de los alimentos mediante dos tipos de estudios: análisis bioquímico y estudios de rendimiento animal.

### **Ensayos bioquímicos**

Antes de poner en el mercado un cultivo transgénico, las empresas deben demostrar que la variedad transgénica es "sustancialmente equivalente" a la variedad no transgénica comparable en términos de la cantidad y disponibilidad de nutrientes. Para normalizar internacionalmente las evaluaciones de cultivos transgénicos y de los alimentos derivados de éstos, FAO/OMS (1996) recomendaron que se apliquen evaluaciones basadas en el concepto de equivalencia sustancial para establecer la seguridad de alimentos y componentes alimentarios derivados de los organismos biotecnológicos. (La equivalencia sustancial también debe demostrarse en cuanto a las propiedades agronómicas, como la velocidad de crecimiento, el rendimiento, la susceptibilidad a las enfermedades y el tamaño del fruto). Para establecer la equivalencia sustancial, los estudios de composición deben demostrar que los componentes bioquímicos de la planta, como el contenido total de minerales, proteína y fibra, no difieran entre las variedades transgénicas y no transgénicas. Ciertos cultivos contienen naturalmente compuestos que pueden incidir en su valor nutricional y que pueden causar repercusiones fisiológicas. Por ejemplo, ciertas plantas, como la papa, contienen toxinas presentes en forma natural. Si el cultivo transgénico contiene toxinas naturales u otras sustancias con repercusiones fisiológicas, debemos confirmar que la inserción del transgén no ha

aumentado las concentraciones de estas sustancias. Por lo tanto, el término “equivalencia sustancial” quiere decir que el cultivo transgénico y su par no transgénico son iguales en términos de valor nutricional, excepto en cuanto a la mejoría pretendida que se logra mediante la introducción del transgén y de la proteína codificada por el transgén. Las investigaciones han demostrado que no hay alteraciones del contenido nutricional de variedades transgénicas (Padgett et al., 1996; Hammond et al., 1996).

### **Estudios sobre rendimiento animal**

Estos estudios están diseñados para establecer la equivalencia nutricional midiendo variables como la ingesta alimentaria, la ganancia de peso, la eficiencia alimentaria y el valor nutricional de los productos alimentarios derivados de animales, como la leche, la carne y los huevos (Hammond et al., 1996; Faust and Miller, 1997). Los estudios han indicado que no hay diferencia en rendimiento animal, en la composición de los productos derivados de animales, cuando los animales son alimentados con variedades transgénicas o no transgénicas. Sin embargo, la calidad nutricional de todos los cultivos transgénicos debe evaluarse antes de su comercialización. Hasta la fecha, todos estos estudios han demostrado que los cultivos transgénicos son equivalentes en términos nutricionales a las variedades no transgénicas de las que se derivan.

### **¿En qué alimentos podemos encontrar transgénicos?**

Los productos derivados de los OGM han sido manipulados de modo que sólo contienen material modificado genéticamente, pero no organismos vivos. Los derivados de soya y maíz transgénicos son los más utilizados. Por ejemplo de soya, tenemos, harina, proteínas, aceites y grasas, emulgentes (lecitina-E322), mono y diglicéridos (E471), etc. En maíz se tiene harina, almidón\*, aceite, sémola, glucosa, fructosa, dextrosa, maltodextrina, sorbitol (E-420), etc.

\*Almidón modificado, se refiere a una transformación físico-química sin relación con los OGM.

### **Alimentos que pueden contener derivados de maíz transgénico:**

Aceites y grasas vegetales	Cervezas
Margarinas	Pan
Alimentos para ganado	Chocolate
Mayonesa	Productos dietéticos
Bebidas azucaradas	Cremas
Papas fritas	Salsas
Bebidas alcohólicas	Helados
Postres lácteos	Sopas
Bebidas de frutas	Harinas
Productos farmacéuticos	Tortillas

### **Alimentos que pueden contener derivados de soya transgénica:**

Aceites y grasas vegetales	Alimentos líquidos
Dulces y galletas	Productos cárnicos
Alimentos de repostería	Alimentos para ganado
Lecitina	Productos dietéticos
Alimentos infantiles	Concentrados proteínicos
Pasteles	Productos farmacéuticos

### **Ventajas de los Cultivos Transgénicos**

**Resistencia a las plagas.** Los agricultores son los primeros beneficiados del uso de las plantas transgénicas resistentes a plagas específicas, lo que disminuye el uso de plaguicidas. En 1999 un análisis en Estados Unidos demostró que la siembra de algodón con resistencia a insectos, logro reducir el uso de insecticidas químicos en un millón de kilogramos, en comparación con 1998 (U.S. National Research Council 2000).

**Aumento del rendimiento.** Durante la "Revolución verde" la creación de variedades de trigo semienanas de alto rendimiento, se debió a la introducción de los genes japoneses NORIN 10 en los trigos occidentales

durante la década de 1950 (genes del enanismo insensibles a la giberelina). Estos genes le confirieron a la planta dos ventajas: a) una planta más corta y fuerte, que respondía bien a la aplicación de más fertilizante sin colapsarse; b) aumentaron el rendimiento al reducir la elongación celular de las partes vegetativas de la planta, de modo que ésta invertía más energía en las partes reproductivas comestibles. Estos genes han sido aislados en fechas recientes, y se demostró que actúan exactamente de la misma manera cuando se les utiliza para transformar otras especies de plantas agrícolas (Peng *et. al.*, 1999). Esta técnica de enanismo puede utilizarse para aumentar la productividad de cualquier planta agrícola cuyo rendimiento económico se encuentre en las partes reproductivas, en vez de en las vegetativas.

**Tolerancia al estrés biótico y abiótico.** La creación de cultivos con resistencia intrínseca al estrés biótico y abiótico, ayudará a estabilizar la producción mundial de alimentos. Actualmente se existen plantas transgénicas modificadas para combatir el virus de la mancha anular de la papaya (Souza 1999), papas resistentes al tizón (Torres *et. al.*, 1999). Además de plantas modificadas para producir un exceso de ácido cítrico en las raíces y de ese modo tolerar mejor el aluminio presente en los suelos ácidos (de la Fuente *et. al.*, 1997).

**Uso de tierras marginales.** Una inmensa extensión de la superficie terrestre del planeta, se considera marginal porque es excesivamente salina o alcalina. Ya se logró identificar, clonar y transferir a otras plantas un gen de tolerancia a la sal presente en el mangle negro (*Avicennia marina*). Se ha observado que las plantas transgénicas toleran mayores concentraciones de sal. Asimismo, el gen *gutD*, de *Escherichia coli*, ha servido para generar plantas de maíz transgénicas que toleran la sal (Liu *et. al.*, 1999). Estos genes representan una fuente potencial para el desarrollo de sistemas agrícolas que permitan el uso de las tierras marginales.

**Beneficios en cuanto a nutrición.** La deficiencia de vitamina A es causa de que medio millón de niños queden parcial o totalmente ciegos cada año (Conway y Toennissen 1999, Kishore and Shewmaker, 1999). Los métodos tradicionales de mejoramiento genético de plantas no ha logrado producir cultivos que contengan altas concentraciones de vitamina A, de modo que la mayoría de los gobiernos dependen de costosos y complejos programas de complementación para atender este problema. Los investigadores han introducido tres nuevos genes en el arroz: dos de ellos



proceden del narciso y uno de cierto microorganismo. El arroz transgénico exhibe mayor producción de beta-caroteno, el precursor de la vitamina A, y la semilla es de color amarillo (Ye *et. al.*, 2000). La anemia ha sido identificada como otro factor de riesgo en más de 20% de los casos de muerte posparto en Asia y África (Conway 1999). Mediante el uso de genes relacionados con la síntesis de una proteína fijadora de hierro y con la producción de una enzima que facilita la absorción del hierro presente en los alimentos humanos, se produjo un arroz transgénico con altas concentraciones de hierro (Goto *et. al.*, 1999; Lucca 1999). Estas plantas contienen de dos a cuatro veces más hierro que el arroz no transgénico, pero queda pendiente investigar su asimilación biológica.

**Fármacos y vacunas en plantas transgénicas.** Existen vacunas contra muchas de las enfermedades que aún provocan grandes sufrimientos e incluso la muerte a numerosas personas en los países en vías de desarrollo, pero su producción y aplicación son normalmente muy costosas. Casi todas las vacunas deben ser almacenadas en condiciones de refrigeración, y para su aplicación se depende de especialistas debidamente capacitados, lo que se suma a los gastos. En algunos países, incluso el costo de las agujas para inyectar las vacunas puede ser prohibitivo. Por consiguiente, suele suceder que las vacunas no llegan a quienes más las necesitan. Actualmente, los investigadores están estudiando el potencial de los OGM para la producción de vacunas y fármacos por medio de plantas (Richter y Kipp, 1999). Esto significaría un acceso más fácil, una producción más económica y una manera alternativa de generar ingresos. Ya se han producido vacunas contra enfermedades infecciosas del aparato digestivo en plantas como la papa y el plátano (banano) (Thanavala *et. al.*, 1995). Otro objetivo adecuado serían los cereales. Recientemente se logró expresar, en semillas de arroz y trigo, un anticuerpo contra el cáncer que reconoce células cancerosas de pulmón, mama y colon y que, por lo tanto, puede ser útil para el diagnóstico y la terapia en lo futuro (Stoger *et. al.*, 2000). Estas tecnologías se encuentran en una fase aún muy temprana de su desarrollo, y será necesario investigar las preocupaciones obvias en cuanto a la salud humana y la seguridad ambiental durante su producción, antes de que dichas plantas sean aprobadas como cultivos especiales. No obstante, la creación de plantas transgénicas para la producción de sustancias terapéuticas tiene un enorme potencial como una manera de ayudar a resolver los problemas de enfermedad en los países en vías de desarrollo.

## ¿Son seguros los alimentos transgénicos?

El principal temor hacia los OGM, es que pudieran darse la expresión inesperada de genes que han sido alterados inadvertidamente, debido a la introducción del gen de interés y que pudieran “prenderse” durante la vida del OGM o del cultivo. Entre las posibles consecuencias que preocupan a los críticos de la ingeniería genética de alimentos, no sólo se habla de la inocuidad del consumo, de la presencia de proteínas con potencial alergénico, o los posibles efectos tóxicos de los OGM, sino también sobre su impacto en el medio ambiente, en la sociedad y en la economía global. En abril del 2000, la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos publicó un informe en el que se señalaba que "El comité no tiene conocimiento de ningún indicio que sugiera que haya riesgos al consumir los alimentos disponibles en el mercado como resultado de modificaciones genéticas". Además, las autoridades reglamentarias de varios países han determinado que los cultivos transgénicos disponibles actualmente en el mercado son tan seguros como sus equivalentes convencionales, los cuales tienen una larga historia de seguridad y consumo. Éstas son las mismas entidades que exigen las rigurosas pruebas y la supervigilancia gubernamental de los cultivos biotecnológicos en los Estados Unidos y en muchos otros países.

Debido a que los cultivos transgénicos representan nuevas estructuras genéticas, se han planteado interrogantes acerca de lo siguiente:

- la seguridad en el consumo de ADN transgénico y
- la posibilidad de que el transgén salga del cultivo e ingrese al genoma del animal o de la persona que consume un cultivo transgénico o un producto alimentario derivado.

La Organización Mundial de la Salud, la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos y la Organización de la ONU para la Agricultura y la Alimentación (FAO) concluyeron que no existen riesgos inherentes en el consumo del ADN, incluido el derivado de los cultivos transgénicos (FDA EE.UU., 1992; FAO, 2004). Las bases para su conclusión son que los humanos y otros animales siempre han consumido ADN de una gran variedad de fuentes, como las plantas, los animales, las bacterias, los parásitos y los virus. Tanto el ADN transgénico como el ADN de cultivos no transgénicos están compuestos de los mismos 4 nucleótidos: adenina, guanina, timina y citosina. El ADN transgénico no agrega ninguna entidad química nueva, de manera que el sistema digestivo está bien adaptado para procesar el ADN transgénico. El ADN al ser componente

esencial de todos los organismos vivos, está presente en casi todos los alimentos que consumen las personas, aunque en cantidades relativamente pequeñas. La cantidad total de ADN en los alimentos contribuye sólo con un 0.02% de la materia total seca de los alimentos (Watson y Thompson, 1998). Los alimentos derivados de cultivos transgénicos contienen sólo una parte de 100,000 de más ADN que los alimentos tradicionales. Para ponerlo en perspectiva, una vaca lechera que come maíz transgénico consumiría 0,0068 mg/día de ADN transgénico, comparado con una ingesta diaria total de 680 mg de ADN no transgénico. Para que un transgén ingerido se integre al genoma del organismo que lo ha consumido, deben producirse al menos dos y muchas veces tres hechos. Primero, el transgén debe ser absorbido por las células como gen intacto más que como nucleótidos individuales u oligonucleótidos muy pequeños. Si bien una serie de estudios han demostrado que fragmentos de ADN plasmídico purificado y de ADN de cloroplasto de plantas han sido absorbido intestinalmente en niveles bajos en ratones y vacas (Schubbert *et. al.*, 1997; Schubbert *et. al.*, 1994; Schubbert *et. al.*, 1998; Doerfler y Schubbert, 1998; Klotz y Einspanier, 2000), no existen pruebas de que las células hayan absorbido genes completos e intactos. Hasta la fecha, no se han detectado fragmentos de ADN recombinante de cultivos transgénicos en tejidos de animales. Klotz y Einspanier (1998) y Khumnirdpetch *et. al.* (2001), demostraron que el gen responsable de la tolerancia al glifosato en la soya no era detectable en la sangre, leche, hígado, piel y la carne de los pollos, mientras que otros estudios (Espanier *et. al.*, 2001; Flachowsky *et. al.*, 2000) no pudieron detectar ningún fragmento del gen Bt en ninguna de las muestras de tejidos de vacas, novillos o pollos que fueron alimentados con grano del maíz Bt. Los dos hechos adicionales que deben producirse para que estas observaciones sean de cuidado son la integración del ADN de la planta en el genoma mamífero y la expresión del ADN de la planta. No existen pruebas de que los genes ingeridos de la planta se integren a los genomas mamíferos y se mantengan de manera estable (Hohlweg y Doerfler, 2001). Sin integración estable del ADN que permitiera una replicación de éstos, como a un cromosoma, no es posible una expresión significativa. Para determinar si el ADN que se absorbe del tracto digestivo puede ser expresado, los científicos evaluaron si alimentar ratones con ADN en forma extensiva se traducía en niveles detectables de mRNA y proteínas en varios órganos (Hohlweg y Doerfler, 2001). Los ratones fueron alimentados con 50 ug de ADN por día durante tres semanas, pero no se detectó mRNA ni proteínas

codificadas por el ADN en el hígado, el bazo, la sangre o el epitelio intestinal.

En México un estudio determinó que pequeños fragmentos de ADN transgénico menores a 250 pb (pares de bases) permanecen intactos durante el proceso de elaboración de alimentos tradicionales como la tortilla, tamal, atole, frituras y pinole, al utilizar maíz transgénico (Valdez *et. al.*, 2003).

### **Riesgos para la salud y medio ambiente de los alimentos transgénicos**

**Alergias.** La alergia a los alimentos es un problema de salud de primer orden, se estima que aproximadamente el 2 % de los adultos presentan alguna reacción alérgica, aunque en los niños y lactantes es mayor. Una alergia alimentaria es una reacción exagerada del sistema inmunológico de nuestro cuerpo, iniciada por una sustancia ajena al mismo. Alimentos como lácteos, clara de huevo, pescado, mariscos, nueces, cereales, condimentos y ciertas frutas pueden causar alergias. En la mayoría de los casos, todos los alérgenos conocidos son proteínas. Por lo tanto todos los alimentos, ya sean elaborados mediante métodos convencionales o mediante la biotecnología, son fuentes potenciales de alérgenos (Taylor, 1997). Se han encontrado en el mercado nuevos alimentos alérgicos sin relación alguna con la biotecnología. Por ejemplo, los kiwis fueron introducidos a Estados Unidos a comienzos de la década de 1980 y desencadenaron reacciones alérgicas en algunas personas. Este alimento no fue sometido a las mismas pruebas que se realizan a los alimentos biotecnológicos antes de la introducción al mercado. Ningún producto biotecnológico es aprobado para su comercialización y consumo si se identifica el menor indicio de potencial alérgico.

**Antibióticos.** Con el surgimiento de los OGM, se ha utilizado genes de resistencia a antibióticos (kanamicina, ampicilina, etc.) como marcadores selectivos del proceso de modificación genética para poder rastrear el gen que se está manipulando. Aunque el gen para antibióticos no tiene un papel en el producto final y no es un gen funcional al carecer de los promotores necesarios para funcionar en otra especie. Existe la preocupación de que tales genes pudieran aumentar la resistencia de los patógenos en humanos (Mikkelsen *et. al.*, 1996). Actualmente se cuenta con medios para eliminar esos marcadores antes de que la planta sea desarrollada para uso comercial (Palmeros *et. al.*, 2000; Zubko *et. al.*, 2000), o bien sustituir tales marcadores por otros alternativos.

**Medio ambiente.** Casi todas las preocupaciones ambientales están relacionadas con la posibilidad de un flujo genético hacia los parientes cercanos de las plantas transgénicas (Ellstrand *et. al.*, 1999). Además de los posibles efectos indeseables de los genes o caracteres foráneos (resistencia a insectos o tolerancia herbicidas), y al efecto en otros organismos. Así mismo se corre el riesgo de que las poblaciones de plagas y organismos fitopatógenos se adapten rápidamente y se vuelvan resistentes a las plantas transgénicas.

### **Metodología empleada para el análisis de alimentos transgénicos**

Un OGM puede distinguirse de su contraparte convencional por pruebas que detecten las nuevas proteínas (pruebas basadas en proteínas) o mediante la identificación del ADN introducido (pruebas basadas en el ADN).

Detección de proteínas transgénicas. EL ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas o ELISA es el más utilizado para detectar proteínas y se basa en el uso de anticuerpos específicos para capturar la proteína de interés, seguido de una reacción colorimétrica o fluorimétrica por un segundo anticuerpo que permite visualizar y medir la cantidad de la proteína. Esta técnica es capaz de discriminar entre cientos de proteínas distintas presentes en la misma muestra. Una restricción para el uso de esta prueba es que las proteínas pueden ser desnaturalizadas durante el procesamiento de los alimentos.

Detección de ADN transgénico. El método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es reconocido como el método más preciso y confiable disponible para la detección y cuantificación de OGM. Se considera que este método es 100 veces más sensible que los análisis basados en proteínas (Gachet *et. al.*, 1999). Existen tres modalidades de análisis por PCR, el análisis cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo.

Análisis cualitativo. Determina la presencia o ausencia de material transgénico en materias primas o alimentos procesados. La detección de material transgénico consiste en la búsqueda de regiones reguladoras comunes en variedades transgénicas de maíz y soya o regiones genómicas exclusivas de cada variedad transgénica (promotor P-35S, Terminador NOS, CaMV RT, etc.).

Análisis semicuantitativo. Determina la cantidad de material transgénico presente en materias primas o alimentos elaborados. El resultado se expresa mediante intervalos porcentuales (por ejemplo, mayor de 0.1 %, menor del 0.5 %, etc.) y es recomendado para el análisis de la

cantidad de P-35S en muestras que contienen sólo maíz o sólo soya (Tozzini, *et al.*, 2000).

Análisis cuantitativo. Permite determinar el porcentaje de soya y maíz transgénicos presentes en una muestra o alimento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Conway, G. 1999. The doubly green revolution: food for all in the twenty-first century. Cornell University Press.
2. Conway, G., and G. Toenniessen. 1999. Feeding the world in the twenty-first century. *Nature* 402, no. 6761 Suppl: C55-58.
3. de la Fuente JM, Ramírez, R. V., Cabrera, P. JL., and Herrera, E. L. 1997. Aluminum Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis, *Science* 276: 1566-1568.
4. Doerfler and W, Schubert R. 1998. Uptake of foreign DNA from the environment: the gastrointestinal tract and the placenta as portals of entry. *Wiener Klinische Wochenschrift* 110:40-44.
5. Einspanier R., Klotz, A., Kraft J., Aulrich K., Poser R., Schw&Scaron;gele F., Jahreis G. and Flachowsky G. 2001. The fate of forage plant DNA in farm animals: A collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *Eur. Food Res. Technol.* 212(1):2-12.
6. Ellstrand, N. C., H. C. Prentice, and J. F. Hancock. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 539-63.
7. FAO/WHO. 1996. Biotechnology and food safety. Report of a joint FAO/WHO Consultation, Rome.
8. FAO/ONU. 2004. Estado de la Alimentación y la Agricultura 2004. <http://www.consumer.es/web/es/noticias/alimentación/2004/05/24/103047.php>
9. Faust, M. and Miller, L. 1997. Study finds no Bt in milk. IC-478. Fall Special Livestock Edition. pp 6-7. Iowa State University Extension, Ames, Iowa.
10. FDA. USA. 1992. Statement of Policy: Foods Derived from New Plant Varieties: Notice, *Federal Register* 57:104; 22984-23005.
11. Flachowsky, G., Aulrich, K., B&scaron;hme, H. and Daenicke, R. 2000. GMO in animal nutrition - Results of experiments at our Institute. *Proc. 6th Int. Feed Prod. Conf.; Piacenza:291-307; 27-28 Nov.*
12. Gache, E., Martin, G.G., Vigneau, F., and Mayer, G. 1999. Detection of genetically modified organisms by PCR. *Trends in food Science & Technology* 9:380-388.
13. Goto, F., T. Yoshihara, N. Shigemoto, S. Toki, and F. Takaiwa. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* 17(3): 282-86.
14. Hammond, B., J. Vicini, G. Hartnell, M.W. Naylor, C.D. Knight, E. Robinson, R. L. Fuchs, and S.R. Padgett. 1996. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *J. Nutr.* 126: 717-727.

15. Hohlweg, U. and Doerfler, W. 2001. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol Genet Genomics* 265: 225-233.
16. Khumnirdpetch V., Udomsri Intarachote A., Treemane S., Tragoonroong S. and Thummabood S. 2001. Plant and Animal Genome IX Conf., San Diego, CA (Poster 585); 13-17 Jan.
17. Kishore, G.M., Shewmaker, C. 1999. Biotechnology: Enhancing human nutrition in developing and developed worlds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5968-5972.
18. Klotz A, Einspanier R. 2000. Detection of chloroplast and Bt maize DNA in farm animals fed transgenic plants: Methods and first results. *Genetically Modified Organisms in the Food Chain*.
19. Liu, Y., G. Wang, J. Liu, X Peng, Y. Xie, J. Dai, S. Guo, and F. Zhang. 1999. Transfer of *E. coli* gutD gene into maize and regeneration of salt-tolerant transgenic plants. *Science in China. Series C, Life Sciences* 42(1): 90-95.
20. Lucca, P. 1999. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. General Meeting of the International Program on Rice Biotechnology, Phuket, Thailand, September 20-24.
21. Mikkelsen, T.R., Andersen, B., Jorgensen, R.B. 1996. The risk of crop transgene spread. *Nature*. 380:31.
22. National Research Council (2000). *Genetically Modified Pest-Protected Plant: Science and Regulation*. Washington, DC. National Academy Press.
23. Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R., and Fuchs, R.L. 1996. The composition of glyphosate-tolerant soybean seed is equivalent to that of conventional soybeans. *Journal of Nutrition* 126(3):702-716.
24. Palmeros, B., Wild, J., Szybalski, W., Le Borgne, S., Hernández, Ch. G., Gosset, G., Valle, F. and Bolivar, F. 2000. A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* 247:255-264.
25. Peng, J., D. E. Richards, N. M. Hartley, G. P. Murphy, K. M. Devos, J. E. Flintham, J. Beales, L. J. Fish, A. J. Worland, F. Pelica, D. Sudhakar, P. Christou, J. W. Snape, M. D. Gale, and N. P. Harberd. 1999. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400(6741): 256-61.
26. Richter L. and Kipp P.B. 1999. "Transgenic plants as edible vaccines." *Curr Top Microbiol Immunol*. 240:159-76
27. Schubbert R, Hohlweg U, Renz D, Doerfler W. 1998. On the fate orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission of the fetus. *Molecular and General Genetics* 259: 569-576.
28. Schubbert R, Lettmann C, Doerfler W. 1994. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecular and General Genetics* 242: 495-504.
29. Schubbert, R, Renze D, Schmitz B, Doerfler W. 1997. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *PNAS* 94:961-66.
30. Souza, M. T., Jr. 1999. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. Cornell University.

31. Stoger, E., C. Vaquero, E. Torres, M. Sack, L. Nicholson, J. Drossard, S. Williams, D. Keen, Y. Perrin, P. Christou, and R. Fischer. 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* 42(4): 583-90.
32. Taylor, S.L. 1997. Food from genetically modified organisms and potential for food allergy. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 4:121-126.
33. Thanavala, Y., Y. F. Yang, P. Lyons, H. S. Mason, and C. Arntzen. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(8): 3358-61.
34. Torres, A. C., A. T. Ferreira, P. E. Melo, E. Romano, M. A. Campos, J. A. Peters, J. A. Buso, and D. de Castro Monte. 1999. Transgenic plants of Achat potato resistant to the mosaic virus (PVY). *BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento*, no. 7.
35. Tozzini, A.C., Martínez, M.C., Lucca, M.F., Rovere, C.V., Distéfano, A.J., del Vas, M. and Hopp, H.E. 2000. Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CamMv 35S promoter amplification. *Electronic Journal of Biotechnology*. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue2/full/6/>.
36. U.S. National Research Council. 2000. Genetically modified pest-protected plants: science and regulation. p. 33-35. Washington, D.C.: National Academy Press.
37. Valdez, M. N. F., Rodríguez, H.R., Reyes, V. M. Aguilar, G.C.N. 2003. Detección de residuos de maíz genéticamente modificado en alimentos tradicionales mexicanos. Premio Nacional en Ciencia y tecnología de Alimentos. [http://pncta.com.mx/pages/pncta\\_investigaciones\\_03a.asp](http://pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_03a.asp).
38. Watson J. C. and Thompson W.F. 1988. Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. In: *Methods for Plant Molecular Biology*. Weissbach, A. and Weissbach, H., (Eds.). Academic Press, San Diego.
39. Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., and Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.
40. Zubko E, Scutt C and Meyer P, 2000. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. *Nature Biotechnology* 18: 442-445.



## Capítulo 6

### **Producción de probióticos y bacteriocinas a partir de subproductos de la industria alimentaria**

*Production of probiotics and bacteriocins from by-products of the food industry*

**Pastrana Castro Lorenzo Miguel, Pérez Guerra Nelson, López Macías  
Cristina, Torrado Agrasar Ana**  
Departamento de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía  
Facultade de Ciencias de Ourense.  
Universidade de Vigo, As Lagoas 32004 Ourense (Spain)

# PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS Y BACTERIOCINAS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

## Resumen

En este trabajo se presenta en primer lugar el estudio de tres posibles estrategias para reducir el coste de producción de probióticos y bacteriocinas. La primera consistió en la formulación de un medio de cultivo a partir de efluentes del procesado de mejillón y el suero de leche. En este sentido, las variables que resultaron más relevantes fueron el pH y el tipo y concentración de la fuente de nitrógeno. La suplementación de los efluentes con fuentes de nitrógeno complejas como caseína y extracto de levaduras permitieron obtener crecimientos exuberantes de biomasa de *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactaci* y producciones elevadas de sus bacteriocinas comparables a las alcanzadas en medios convencionales como el MRS. La segunda estrategia consistió en el diseño de un proceso de fermentación en el que cultivos operando en régimen de fed-batch se sometían a realcalinizaciones periódicas. Mediante este procedimiento se alcanzaron incrementos de las producciones de hasta un orden de magnitud con respecto a los cultivos discontinuos. Adicionalmente el procedimiento prolongó el periodo activo e indujo un cambio del metabolismo de los microorganismos que pasó de homoláctico a heteroláctico. La última estrategia consistió en la elaboración de modelos matemáticos que, basados en los clásicos de Luedeking & Piret incorporaron la dependencia del sistema de variables como el pH o la velocidad de consumo de los nutrientes limitantes, con lo que fue posible describir de modo fiel el comportamiento cinético de los anteriores sistemas microbianos.

## **PRODUCTION OF PROBIOTICS AND BACTERIOCINS FROM BY-PRODUCTS OF THE FOOD INDUSTRY**

### **Abstract**

In this work, three strategies to reduce the production cost of probiotics and bacteriocins are presented. The first one was the formulation of a culture medium from mussel processing wastes and whey. In this sense, the pH and the type and concentration of nitrogen source were the most relevant variables. High biomass and bacteriocin productions by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactaci* were achieved when both wastes were supplemented with yeast extract or Casitone. The bacteriocin productions obtained were comparable to those achieved in conventional culture media like MRS. The second approach consisted in the design of a fermentation process based on the periodic realkalization of fed-batch cultures. Enhancement bacteriocin and biomass productions, with respect to batch cultures were obtained with this procedure. Additionally, an increase in the active period and a shift from homolactic to heterolactic metabolism was observed. The last approach was the development of mathematical models based in the Luedeking & Piret expression to describe the kinetic behaviour of above cultures. Only good fitting were obtained when variables such as pH and the consumption rate of the limiting nutrients were incorporated to the model.

# 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1: Las bacteriocinas y la conservación de los alimentos

Los procedimientos habituales para la conservación de los alimentos presentan en la actualidad problemas. El uso de preservantes químicos (e.g. nitrato o benzoato) o las radiaciones ionizantes son cuestionados por sus potenciales riesgos para la salud. Los tratamientos térmicos (e.g. esterilización o pasteurización) o la congelación se enfrentan a las nuevas preferencias de los consumidores hacia los alimentos frescos o mínimamente procesados. El envasado aséptico o las altas presiones son en la actualidad, por caras, alternativas poco empleadas en la industria alimentaria (Vermeiren et. al., 1999).

Por ello, las bacteriocinas, una familia de péptidos extracelulares de diversas especies de bacterias G<sup>+</sup>, con actividad bacteriostática o bactericida sobre otras G<sup>+</sup>, raramente G<sup>-</sup>, están cobrando un creciente interés: permiten mantener las características naturales del producto (especialmente sabor y textura), reducir tratamientos complementarios (como el térmico en alimentos poco ácidos y con alta actividad de agua) y se vinculan con los alimentos “bio” (Daeschel et. al., 1992; De Vuyst & Vandamme, 1994a). En general las bacteriocinas tienden a mantener su estabilidad a los tratamientos térmicos cuando se encuentran a pH ácido, y la pierden en la medida en que este se incrementa. Con todo, la variabilidad es grande debido tanto a los diferentes tratamientos ensayados como a la propia naturaleza de las moléculas. Así, la acidofilucina A pierde totalmente su actividad inicial cuando se calienta durante 10 minutos a 70°C (Toba et. al., 1991), mientras que las lactacinas B y F y la nisina pueden soportar un proceso de autoclavado (De Vuyst & Vandamme, 1994b). Por otro lado, la reducción de la temperatura incrementa el rango de pHs a las que son estables.

Las bacteriocinas más conocidas son sin duda las nisinas (lantibióticos de *Lactococcus lactis*), pero en estrecha relación con ellas se encuentran otros lantibióticos como subtilina, estafilococcina, gallidermina, salivaricina o algunas lactococcinas; no lantibióticos como otras lactococcinas, pediocinas, sakacinas, curvacinas, piscicolinas o carnobacteriocinas, y aun otros metabolitos sin asignar aún a un grupo concreto. Aparte de estructurales, sus diferencias atañen a su espectro de acción, su codificación por genes cromosómicos o plasmídicos y su sensibilidad frente a diferentes tipos de proteasas. Adicionalmente, cuando las bacteriocinas se encuentran a pH cercano a la neutralidad se adsorben a

las membranas celulares de las cepas productoras (Klaenhammer, 1988; Yang et. al., 1992), desorbiéndose prácticamente en su totalidad para valores por debajo de 3 (Bhunja et. al., 1991; Yang et. al., 1992).

Son numerosas las aplicaciones desarrolladas de las bacteriocinas en los alimentos incorporadas bien mediante la fermentación del producto por bacterias iniciadoras que sean, a su vez, productoras (producción *in situ*) - opción sólo viable cuando la flora láctica es la mayoritaria-, o bien añadiendo la bacteriocina directamente en el alimento (Schillinger et. al., 1996). Destacan la aplicación en productos lácteos, especialmente en quesos para la prevención de *Listeria monocytogenes* (Davies et. al., 1997); en productos fermentados como alternativa a la adición de nitritos (Taylor et. al., 1984) y en productos de la pesca como alternativa a los ácidos benzoico y ascórbico en la conservación de langostino en salmuera refrigerado (Einarsson & Lauzon, 1995).

## **1.2: La producción de probióticos y bacteriocinas**

Adicionalmente, muchos de los microorganismos productores de bacteriocinas son, a su vez, probióticos. La noción de probiosis alude, en general, al conjunto de efectos fisiológicos que, vinculados a los balances microbianos del tracto intestinal, resultan favorables para la entidad biológica hospedante. Se trata de un concepto relativamente difuso, que se ha relacionado sobre todo con la mejora de la resistencia a las enfermedades por estimulación de las defensas naturales, y que puede implicar mecanismos de naturaleza bastante heterogénea. Entre ellos se citan con frecuencia sin detalles concretos la competencia con microorganismos patógenos por nutrientes limitantes o por puntos de adherencia a las mucosas, la producción de sustancias inhibitoras de estas especies y la activación de la respuesta inmunitaria (Mishra & Lambert, 1996; Isolauri et. al., 1998).

Clásica ya en el campo de la dietética humana, donde subyace, por ejemplo, a la inducción al consumo de productos lácteos fermentados, la idea se ha extendido luego al ámbito de la producción animal. Dado que la colonización de los tractos intestinales por probiontes no es en general permanente, también aquí la estrategia se ha centrado en las formas de administración continua de las correspondientes especies microbianas; esto es, en la formulación de dietas reparadoras o configuradoras de las microfloras, que conduzcan a maximizar rendimientos alimentarios y supervivencias. Los ejemplos de probiontes más citados a este respecto son diversas especies de géneros como *Lactobacillus*, *Streptococcus*

(*Lactococcus*) y *Bifidobacillus* (Fuller, 1992; Soomro Et Al., 2002; Thomke & Elwinger, 1998).

Tanto las bacteriocinas como la propia biomasa probiótica se producen habitualmente en cultivo sumergido discontinuo, obteniéndose en ocasiones mejoras mediante procesos en continuo, alimentado o inmovilizado (Bhugaloo-Vial et. al., 1997; Parente et. al., 1997). En el caso de algunos probióticos es necesaria la presencia en el medio de azúcares específicos (prebióticos) que estimulan su crecimiento. Por su parte, las bacteriocinas se consideran cinéticamente como metabolitos primarios, aunque están referenciadas numerosas excepciones (Paik & Glatz, 1997). Las principales variables que determinan tanto los niveles de producción como su tipificación cinética son la temperatura, la aireación, el pH y la composición del medio de cultivo. Las temperaturas óptimas de producción y de crecimiento no suelen coincidir aunque ambas se sitúan entre los 30°C y 37°C. Con respecto a la aireación se acepta que, dado la naturaleza anaerobia facultativa de las especies productoras, las condiciones más favorables son en anaerobiosis con la mínima agitación necesaria para conseguir una suspensión homogénea (De Vuyst & Vandamme, 1994b). El pH es sin duda la variable más relevante en la producción de bacteriocinas, tanto por la ya discutida influencia sobre la actividad, solubilidad y adsorción a las membranas celulares de las cepas productoras, como por el propio efecto directo de los niveles inicial y final y de su evolución durante el cultivo. Para la mayoría de las bacteriocinas el pH inicial óptimo se sitúa en 5,5. Finalmente, con respecto a la composición del medio de cultivo cabe señalar que la fuente de carbono de preferencia es la glucosa, mientras la de nitrógeno son los hidrolizados de proteínas de alta calidad (caseína, triptonas, peptonas, extracto de levaduras y extracto de carne), probablemente debido al efecto inductor de algunos aminoácidos sobre la producción (De Vuyst, 1995).

Sin embargo, uno de las causas principales que ha limitado la extensión del uso de probióticos y bacteriocinas es el alto coste de producción de biomasa probionte y/o de sus péptidos activos. En efecto, los medios de cultivo normalmente empleados son caros y las conversiones del sustrato en biomasa reducidas. Además, en el caso de usos en alimentación animal, dada la naturaleza de las fuentes de nitrógeno utilizadas (esencialmente peptonas de carne), no pueden ser incorporadas junto a los probiontes a los piensos, lo que hace necesario un proceso de separación previo de la cosecha microbiana que encarece su obtención.

Tres son las posibles estrategias que podrían permitir obviar los problemas mencionados. En primer lugar la búsqueda de medios de cultivo baratos que promovieran crecimientos exuberantes de biomasa y producciones elevadas de bacteriocinas. En este sentido, a la vista de la composición, bajo costo y disponibilidad de algunos subproductos y efluentes de la industria alimentaria, su adaptación como medio de cultivo se presenta como una alternativa plausible.

En efecto, existen precedentes de la utilización de los efluentes del procesado de mejillón y el suero de leche como materias primas de procesos microbianos para la producción de metabolitos de interés. Los efluentes del procesado de mejillón (EPM) se generan en el tratamiento térmico al que se somete el mejillón destinado a congelados y conservas. Sólo en Galicia (noroeste de España) representan 75 millones de litros anuales de elevadísimo impacto contaminante tanto por su temperatura de salida (cercana a los 100°C) como por su DQO (25.000 ppm como valor medio). Los EPM son la base de un proceso biotecnológico denominado IIM que permite la obtención por vía microbiana de enzimas (Torrado et. al., 1998), ácidos orgánicos (Pintado et. al., 1994), hormonas (Pastrana et. al., 1993) y otros metabolitos de interés (Guerra & Pastrana, 2002). Por su parte, el suero de leche (SL) resultante de los procesos de fabricación del queso (con una DQO entre 60.000 y 80.000 ppm y una elevadísima producción mundial) se usa, en forma líquida o concentrada como suplemento en alimentos animales y humanos, para la recuperación de la fracción proteica y la lactosa mediante procesos de ultrafiltración y para la obtención de metabolitos microbianos por fermentación de la lactosa (Gonzalez, 1996).

La segunda de las estrategias consiste en diseñar procedimientos y operatorias de fermentación que incrementen las producciones tanto de biomasa probiótica como de bacteriocinas y que supongan una alternativa viable a los procesos discontinuos clásicos. En este sentido, se abren varias posibilidades que comprenden, la aplicación de modalidades como los cultivos alimentados o por lotes, el mantenimiento del pH en los cultivos y la generación de perfiles de pH.

Finalmente, la tercera estrategia trata de elaborar modelos matemáticos que permitan describir el comportamiento de los sistemas microbianos de producción de bacteriocinas con el fin de poderlos utilizar en la construcción de algoritmos de control eficientes. De este modo, será fácil predecir el comportamiento de los cultivos y adoptar políticas de control adecuadas, lo que reducirá las posibilidades de que la fermentación no transcurra por el camino previsto. Todo ello redundará en una reducción de

los costes producción en general y, en particular los vinculados con el personal de mantenimiento de la planta.

A continuación se recoge el trabajo realizado en nuestro laboratorio en las tres estrategias mencionadas para la producción tanto de biomasa potencialmente probiótica de *Lactococcus lactis* (Lc 1.04) y *Pediococcus acidilactici* (Pc 1.02), así como nisina y pediocina a partir de EPM y suero de leche. De este modo se presentarán los estudios llevados a cabo para la búsqueda de las concentraciones de los nutrientes adecuados con los que suplementar los efluentes y convertirlos en medios de cultivo adecuados, la aplicación de la modalidad de proceso alimentado sometido a realcalinizaciones periódicas para incrementar y prolongar las producciones y la modificación de los modelos cinéticos convencionales incluyendo las variables relevantes en estos sistemas para describir su evolución adecuadamente. Finalmente se presentan dos aplicaciones de las bacteriocinas y de la biomasa productora: el desarrollo de envases activos y la sustitución de antibióticos en piensos animales.



## **2: Acondicionamiento de los efluentes del procesado de mejillón y el suero de leche para el cultivo de *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici***

Aunque tanto los EPM como el SL conforme salen de las instalaciones pueden soportar el crecimiento microbiano, sus elevados contenidos en proteínas aconsejan un pretratamiento para su eliminación parcial. Ello se debe a varias razones: son proteínas de asimilación lenta quedando importantes remanentes en los postincubados y por tanto no constituyen buenas fuentes de nitrógeno; aisladamente pueden ser utilizadas directamente con propósitos de refuerzo de alimentos y, finalmente, precipitan a valores de pH ácido (usuales durante los cultivos de bacterias lácticas) dificultando las determinaciones de biomasa en los cultivos.

Basándose en esta última característica, ambos efluentes se sometieron a pretratamientos de desproteización y, adicionalmente, dado que las bacterias lácticas no poseen capacidad amilolítica, en el caso de los EPM, el glucógeno presente se sacarió con amilasas comerciales para convertirlo en glucosa, fuente de carbono asimilable. Por su parte, el suero lácteo (SL) fue obtenido de instalaciones industriales locales en dos formas, una como suero lácteo concentrado (SLC) y la otra como suero lácteo diluido (SLD). La primera se obtiene del líquido resultante del prensado natural del queso, y la segunda, como resultado de la mezcla de las aguas de lavado con el suero residual que aún contiene el queso una vez prensado. En ambos, el pretratamiento sólo afectó a su fracción proteica.

La composición resultante de los EPM y los SLC y SLD que se utilizaron en los cultivos después del tratamiento de acondicionamiento se muestra en la tabla 1.

## **3: Cultivos preliminares sobre SL y EPM**

Con el fin de evaluar la aptitud del SL y los EPM para la producción tanto de biomasa probiótica de *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici*, así como de sus bacteriocinas se realizaron una serie de cultivos en matraz, comparando los resultados con los que se obtuvieron de cultivos en las mismas condiciones sobre un medio convencional como el MRS.

Tabla 1. Composición media (en g/l) de los medios de cultivo obtenidos a partir de los EPM, EPM concentrado (EPMc), SLC y SLD.

	EPM	EPMc	SLC	SLD
Azúcares totales	5.33	101.33	48.11	22.54
Azúcares reductores	5.33	101.33	32.13	16.86
Proteínas	1.82	3.47	5.02	2.04
Nitrógeno total	0.65	0.54	1.05	0.45
Fósforo total	0.14	0.06	0.43	0.25

### 3.1: Cultivo en suero de leche

En las Figuras 1 y 2, se muestran los resultados correspondientes a dos series de cultivos realizados tanto sobre SL concentrado (SLC) como diluido (SLD). Las producciones de biomasa, láctico y bacteriocina fueron notablemente inferiores a los obtenidos sobre un medio convencional como el MRS, (la diferencia del Pc 1.02 es, incluso en el mejor de los casos, de un orden de magnitud). Sólo los rendimientos de la bacteriocina producida en relación con la biomasa fueron, en los sueros, comparables o superiores al medio MRS.

Como causas de los reducidos crecimientos y producciones pueden apuntarse que los sueros poseen relaciones C/N o C/P desequilibradas que carecen de algún nutriente esencial (lo que explicaría los perfiles relativamente lineales de las biomasas), que la proteína presente en los sueros tiene una composición inadecuada para ser utilizada como fuente de N o a que la lactosa, si se compara con la glucosa, no es una buena fuente de carbono para estas especies (Vignolo et. al., 1995). En este sentido, en ninguno de las series ensayadas se agotaron los nutrientes del medio de cultivo.

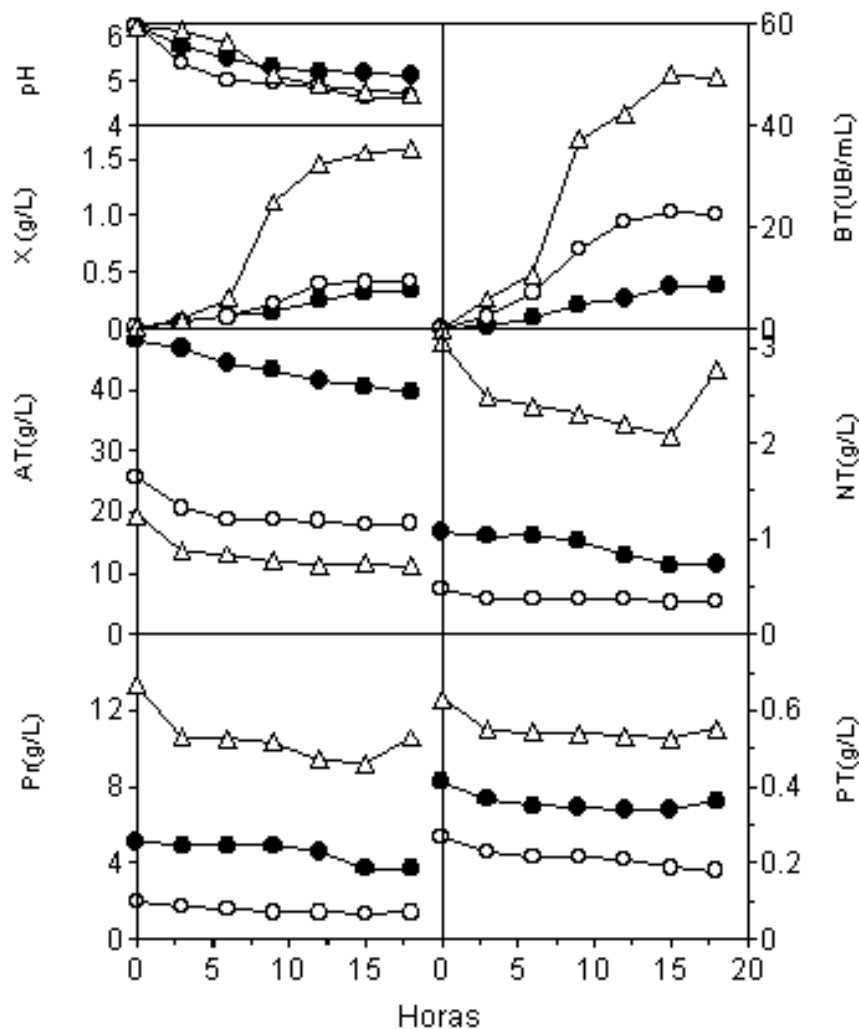


Figura 1. Cultivos de Lc 1.04 sobre MRS ( $\Delta$ ), SLD (O) y SLC ( $\bullet$ ). X: biomasa; Pr: proteína remanente; AT: Azúcares totales; BT: bacteriocina; NT: nitrógeno total; PT: fósforo total.

Aunque algunos de estos aspectos se tratarán en un capítulo posterior, es posible apuntar aquí que la relativa mejor aptitud de Lc 1.04 para crecer sobre estos medios (consumo de azúcares totales similar al medio MRS y superior producción de biomasa que Pc 1.02) puede relacionarse con la mayor habilidad para fermentar la lactosa de las especies del género *Lactococcus* (Bergey, 1986).

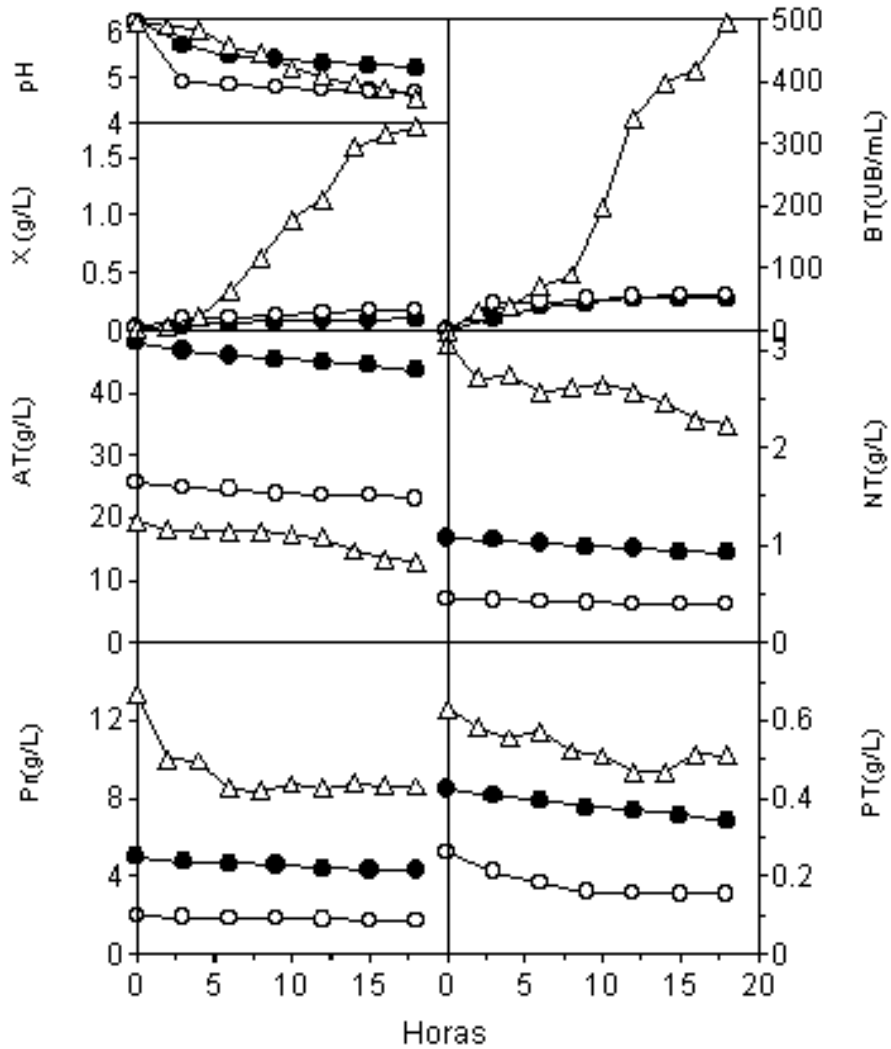


Figura 2. Cultivos de Pc 1.02 sobre MRS ( $\Delta$ ), SLD (O) y SLC ( $\bullet$ ). Las notaciones como en la figura precedente.

Por otra parte, cuando se comparan los sueros, en ambas especies los resultados obtenidos en SLC fueron sensiblemente inferiores a las obtenidas en SLD, lo que podría indicar la existencia de un fenómeno de inhibición por sustrato atribuible a la lactosa, ya que los consumos de azúcares fueron los únicos no proporcionales a los niveles iniciales suministrados.

### 3.2: Cultivos en medio EPM

En la Figura 3 se puede observar que como en el caso anterior la biomasa de Lc 1.04 fue inferior a la obtenida en medio MRS pero comparable a la alcanzada en SLD. Sin embargo, ello no guardó relación con la producción de nisina que, con algo menos de 10 UB/mL, fue notablemente menor a la que se llegó en cultivos anteriores.

Dado que no se agotó ningún nutriente puede postularse que las proteínas del medio no sean una fuente de nitrógeno adecuada bien por su composición aminoacídica (escasa en algún aminoácido esencial para la síntesis del antibiótico), bien por ser difícilmente metabolizable por el microorganismo lo que conduciría, de hecho, a una limitación nutricional.

Adicionalmente, la escasa capacidad tampón de la proteína puede tener un efecto indirecto sobre la producción al determinar un valor de pH final en el medio (inferior a los cultivos sobre los sueros lácteos y MRS) que podría resultar inadecuado.

Contrariamente, en el caso de Pc 1.02, tanto el crecimiento como la producción de bacteriocina fueron alrededor de 6 veces superiores a los obtenidos en SLD. Ello puede deberse a que, por una parte, la glucosa y/o la proteína del medio son fuentes de C y N más adecuadas para esta especie, y por otra, de nuevo, a un efecto específico del pH. En efecto, parece necesario que se genere en el cultivo un gradiente alto de pH ( $\Delta$ pH) siempre que el pH final del cultivo no se sitúe por debajo de un umbral crítico de 4. En efecto, cuando se comparan los valores de  $\Delta$ pH, pH finales y biomasa obtenidos en esta ocasión con los del medio MRS y los sueros puede observarse que, las mejores producciones se obtienen para más altos valores de biomasa y  $\Delta$ pH. Así, por ejemplo, con un nivel de biomasa de escasamente la mitad del obtenido en MRS pero con un  $\Delta$ pH 1,65 veces superior las producciones de bacteriocina en medio 0,5MH fueron sólo un 33% inferiores. Ahora bien, cuando el pH del cultivo desciende por debajo de 4, lo que sucede entre las 6 y las 9 horas de cultivo, la producción de bacteriocina se ralentiza y su velocidad llega a hacerse prácticamente nula.

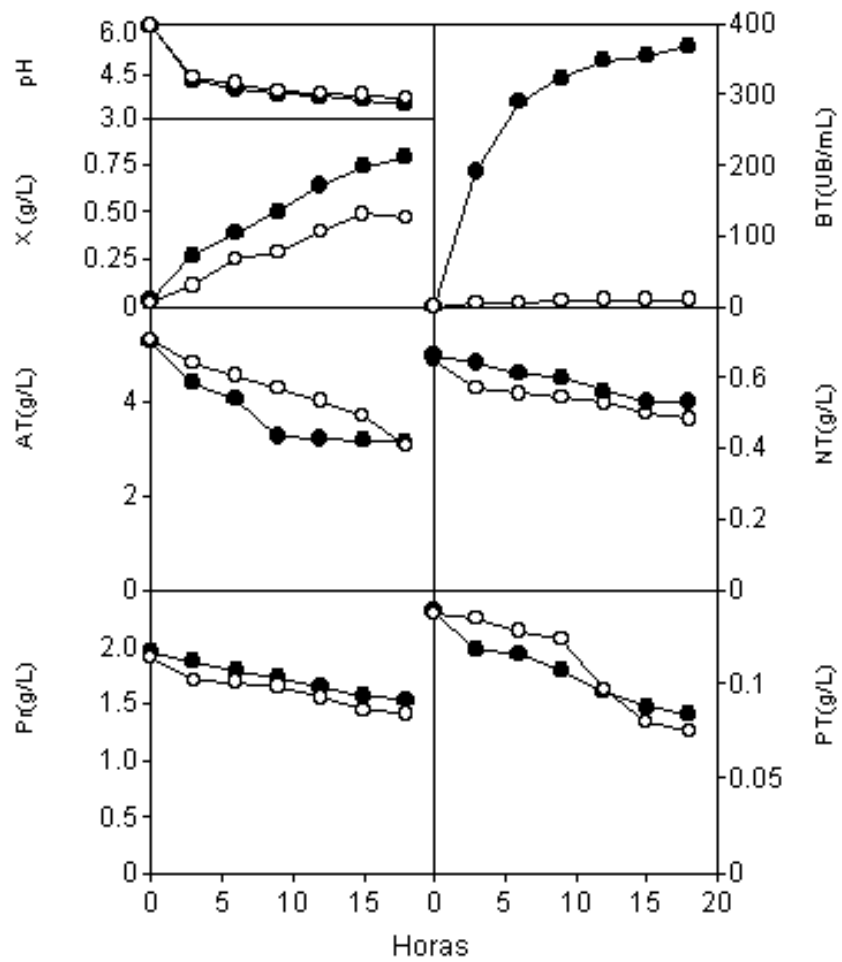


Figura 3. Cultivos de Pc 1.02 (●) y Lc 1.04 (○) sobre medio 0,5MH. Las notaciones como en la Figura 1.

#### **4: Efecto conjunto de las concentraciones de tampón, nitrógeno, fósforo y azúcares sobre la producción de bacteriocinas en medios residuales.**

A pesar de la abundante la información disponible acerca de la influencia que sobre la producción de bacteriocinas tienen el tipo, concentración y naturaleza de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, a excepción del trabajo de PARENTE & HILL (1992) los efectos de las variables nutricionales siempre se han estudiado de forma aislada y, frecuentemente, no sistemática. En consecuencia, se desconocen las posibles interacciones y el efecto conjunto de los nutrientes sobre la producción.

También de los ensayos precedentes se concluyó que la composición del medio de cultivo determina la producción de biomasa y bacteriocinas de forma tanto directa como indirecta al influir en la evolución del pH. Dado que en ningún caso se alcanzaron los niveles obtenidos sobre medio MRS y que ello no puede atribuirse a una limitación de nutrientes, parece razonable buscar las causas en: 1: las relaciones C/N y C/P de los medios; 2: la posible inhibición por sustrato en el caso de los sueros lácteos; 3: el gradiente y los valores finales de pH que se alcanzan en el cultivo y 4: La presencia de alguna molécula inductora presente en el medio MRS y no en los efluentes.

La investigación conjunta las tres primeras posibilidades se realizó mediante un diseño factorial completo tomando como variables independientes las concentraciones iniciales de azúcares totales (C), nitrógeno total (N), fósforo total (P) y tampón en el medio de cultivo (T), que se consiguieron suplementando los EPM y el SL respectivamente con glucosa o lactosa, glicina,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y tampón biftalato sódico: NaOH. Como variables dependientes se estudiaron tanto la producción de bacteriocinas como la biomasa, determinando adicionalmente el pH final alcanzado y los consumos de nutrientes esenciales.

##### **4.1: Cultivos en suero de leche diluido (SLD)**

Los resultados obtenidos de los cultivos sobre SLD que se muestran en las Figuras 4 y 5 permiten comparar el comportamiento de las variables sobre la síntesis de nisina y pediocina así como sobre los niveles de la biomasa alcanzada en los cultivos por los respectivos microorganismos productores.

Así, en el caso de la nisina (Figura 4) se puede observar que el fósforo y la variable C apenas ejercieron efecto sobre sus niveles, mientras que, por el contrario, la fuente de nitrógeno inhibió de forma notable la

producción especialmente cuando se alcanzaron las relaciones C/N del medio MRS. Comparando las producciones de nisina y biomasa se observa que la depresión que la glicina causó sobre la producción, está relacionada con su efecto inhibitor sobre la biomasa. Por el contrario, para el caso de la pediocina (Figura 5), la acción de la glicina y la variable C fue poco relevante sobre la respuesta probablemente porque la lactosa y la glicina no son buenas fuentes de carbono y nitrógeno para *Pediococcus*. Adicionalmente, en contraposición a su influencia sobre la síntesis de nisina, el incremento de la variable P ejerció también una relevante acción específica negativa sobre la producción de pediocina, lo que, por otro lado, sugiere la naturaleza secundaria del metabolito.

Con todo, la variable más relevante fue el tampón que se comportó de forma similar con ambos microorganismos. En el caso de la nisina el aumento de la variable T deprimió la respuesta, haciéndolo en mayor medida para valores bajos de N, aunque, sin embargo, apenas ejerció efecto sobre la producción de biomasa, lo que hace pensar que su influencia sobre la síntesis de nisina se deba específicamente a la magnitud del  $\Delta\text{pH}$  que genera en el cultivo. Del mismo modo, el aumento de T disminuyó la magnitud del gradiente de pH en el cultivo y, consecuentemente, condujo a un descenso en los niveles de pediocina.

Para aclarar si tiene un efecto específico sobre la producción de nisina, o éste se debe, al menos de forma parcial, a su acción sobre la biomasa, se ensayaron, en un experimento adicional con las variables C, N y P en un valor codificado de  $-1$ , cuatro series de cultivos con valores codificados de T de:  $-1$ ,  $-0,4$ ,  $1$  y  $4$ . Los resultados, recogidos en la Figura 6 indican que la acción del tampón sobre la biomasa resultó prácticamente insignificante, mientras que sobre la producción de nisina las diferencias llegaron a multiplicarse por un factor de tres. El aumento de la concentración de tampón determinó una caída exponencial de los títulos del antibiótico resonante con el descenso de la magnitud del  $\Delta\text{pH}$ .

#### **4.2: Cultivos en efluentes del procesado de mejillón (medio 0,5 MH)**

Los resultados obtenidos de los cultivos sobre EPM se muestran en las Figuras 7 y 8. También sobre este medio la glicina deprimió los niveles de biomasa de *Lactococcus lactis* sin que ello repercutiera en los títulos de nisina (Figura 7), indicando que el metabolito en esta ocasión no tiene carácter primario. Además, el aumento de la concentración de tampón



estimuló, en todos los casos, la producción de nisina probablemente porque el pH del cultivo se situó en valores manifiestamente inferiores a 4,5; valor de pH umbral por encima del cual la producción se detiene.

Para el caso de la pediocina (Figura 8), tampoco la glicina fue una buena fuente de nitrógeno. Sin embargo, en contra de lo que sucedía sobre SL, el control del fosfato observado sobre la síntesis del antibiótico, apenas logró manifestarse y el aumento del tampón determinó, en todos los casos, una inhibición de la producción, bien por la acción estimulante del incremento del gradiente de pH generado en el cultivo, bien por los valores finales de pH alcanzados en la incubación.

Así pues, también sobre medio 0,5 MH fue necesario aclarar el papel del tampón con un experimento similar al referido en el apartado anterior, confirmándose que:

1: El efecto del tampón sobre la biomasa de *Lactococcus lactis* fue pequeño y sin relación ni con el gradiente ni con pH final de los cultivos. Sin embargo, sí se observó la existencia de una concentración de tampón óptima para la producción de nisina, probablemente relacionada con los mencionados efectos del pH.

2: Para la pediocina, el aumento de la molaridad del tampón determinó un descenso exponencial de los títulos resonante con la mengua en los gradientes de pH generados sin que ello afectara al crecimiento.

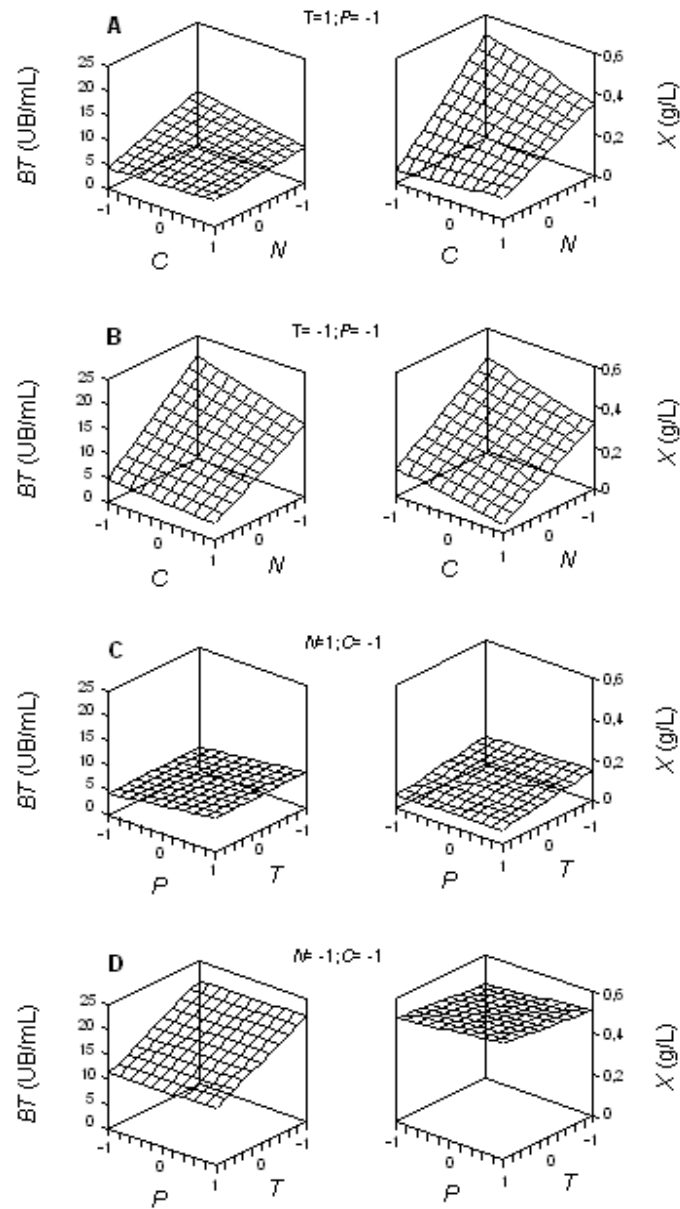


Figura 4. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de azúcares totales (C), nitrógeno total (N), fósforo total (P) y tampón en el medio de cultivo (T) sobre las producciones de nisina (BT) y biomasa (X) por Lc 1.04 en SLD.

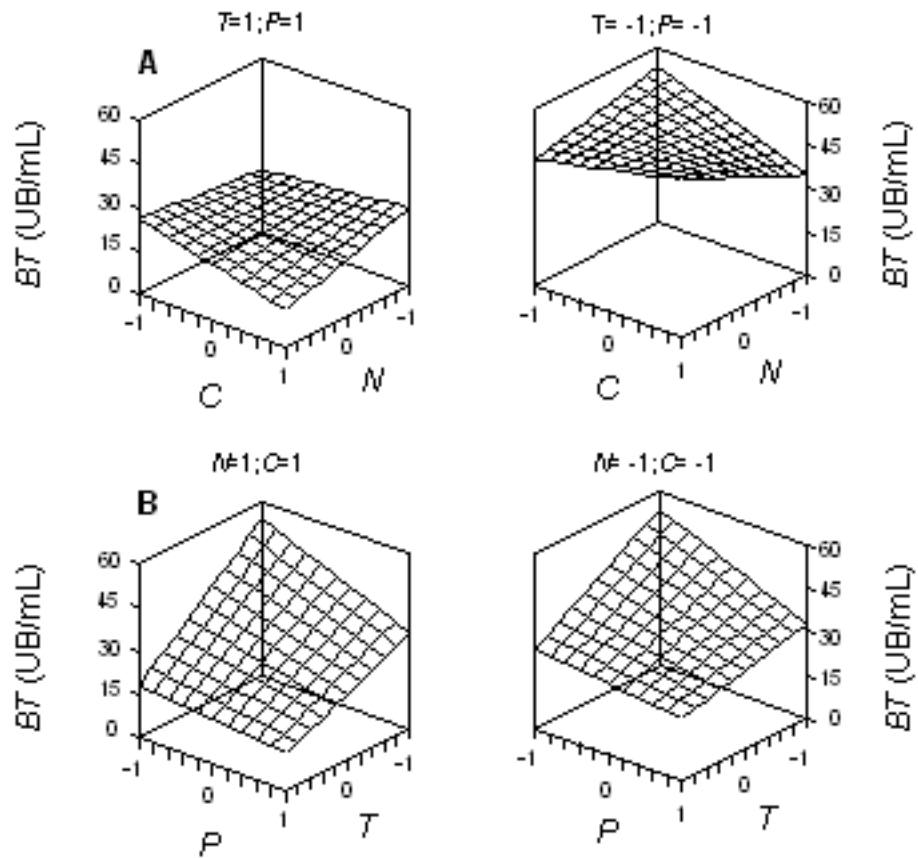


Figura 5. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de azúcares totales (C), nitrógeno total (N), fósforo total (P) y tampón en el medio de cultivo (T) sobre las producciones de pediocina (BT) y biomasa (X) por Pc 1.02 en SLD.

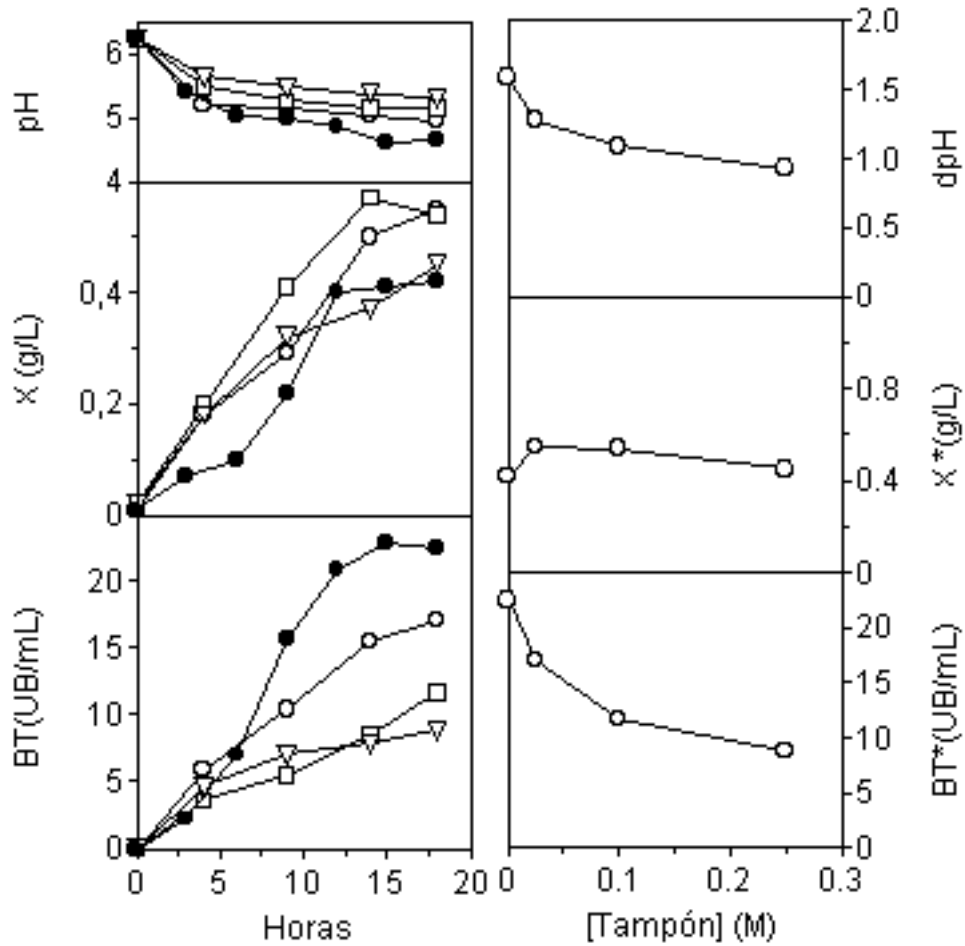


Figura 6. Resultados de los cultivos de Lc 1.04 sobre SLD sin tamponar (●), y tamponado con biftalato-sosa a concentraciones 0,03M (○), 0,1 M (◐) y 0,25 M (◑). dpH: diferencia entre pH inicial y final; X\*: biomasa final; BT\*: bacteriocina (nisina) final.

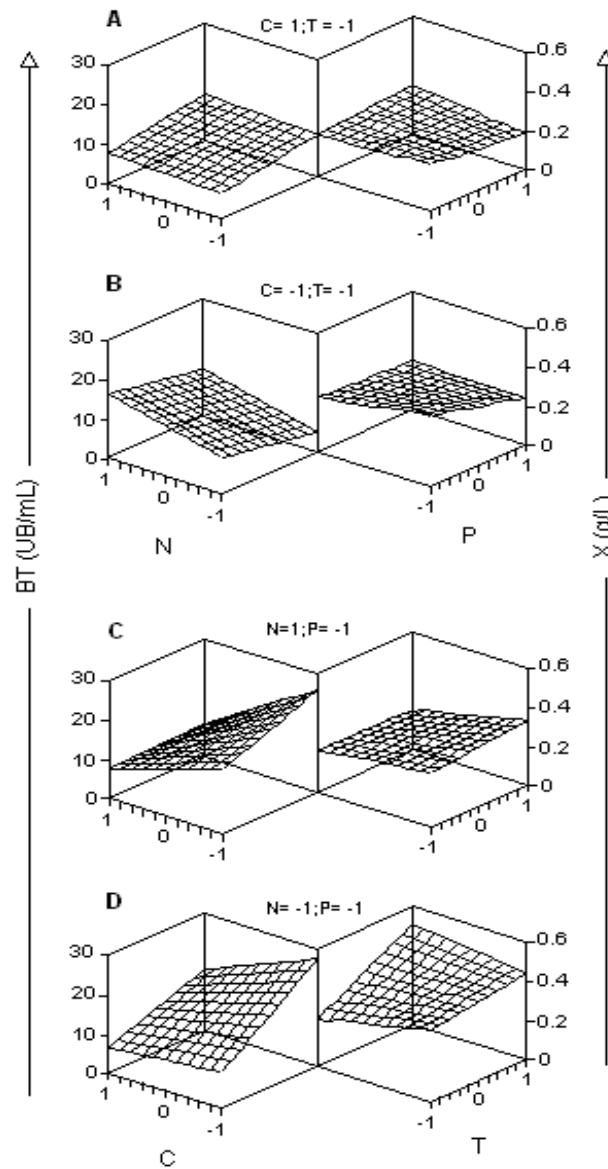


Figura 7. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de azúcares totales (C), nitrógeno total (N), fósforo total (P) y tampón en el medio de cultivo (T) sobre las producciones de nisina (BT) y biomasa (X) por Lc 1.04 en medio 0,5MH.

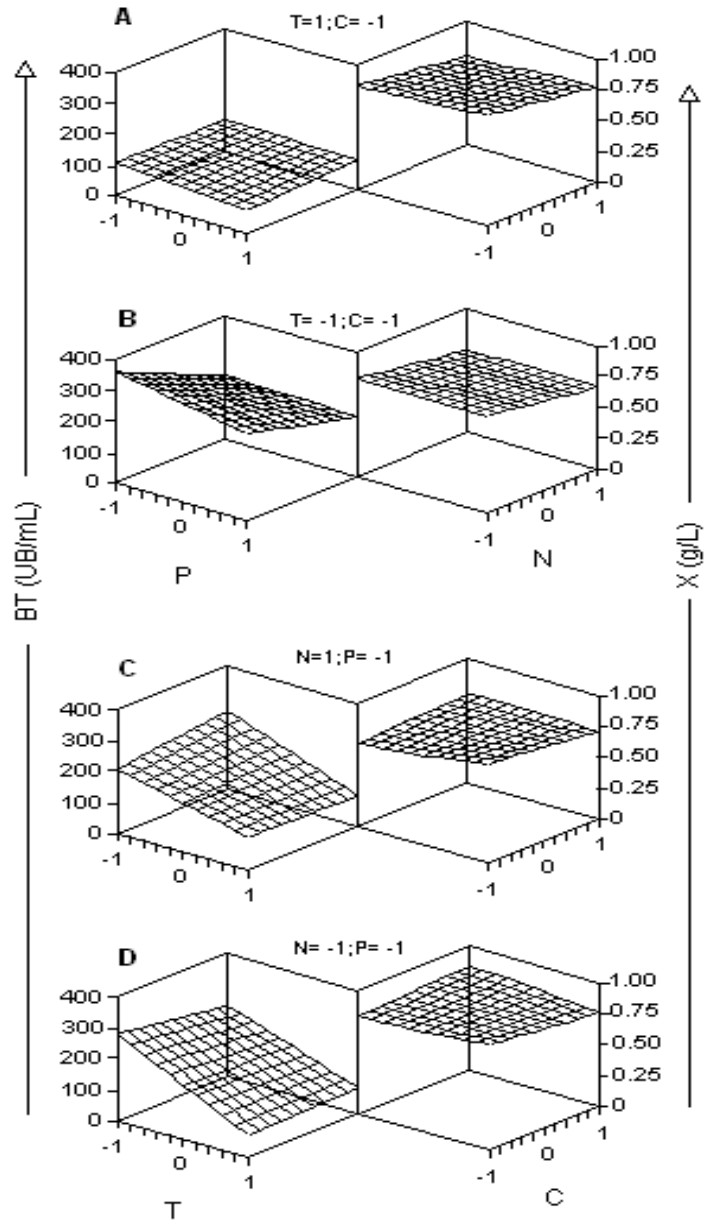


Figura 8. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de azúcares totales (C), nitrógeno total (N), fósforo total (P) y tampón en el medio de cultivo (T) sobre las producciones de pediocina (BT) y biomasa (X) por Pc 1.02 en medio 0,5MH.

## 5: Efecto del tipo de fuente de nitrógeno

Como se acaba de presentar en los apartados precedentes, tanto el SLD como el medio 0,5MH fueron adecuados para la producción de biomasa y bacteriocinas por parte de las cepas Lc 1.04 y Pc 1.02. Con todo, y pese a haber ensayado suplementos con glucosa o lactosa,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y glicina los niveles alcanzados por los antibióticos fueron siempre inferiores a los obtenidos sobre medio convencional MRS, revelando que las producciones muestran una dependencia de la composición del medio de cultivo más compleja que la simple búsqueda de relaciones C/N y C/P óptimas.

De este modo, salvo el caso de la variable Tampón, los suplementos ensayados no mostraron en general efectos cuantitativamente relevantes, y, cuando lo fueron, resultaron siempre negativos sobre los niveles alcanzados por los antibióticos. Así pues, cabe calificar los suplementos utilizados como fuentes inadecuadas de nutrientes sobre estos medios.

En consecuencia, un posible recurso para incrementar los títulos de bacteriocinas sobre SLD y 0,5MH pasaría utilizar fuentes de nutrientes de diferente naturaleza química a las ensayadas. En este sentido, sólo parecía realista ensayar otras fuentes de nitrógeno ya que, por una parte, ni los suplementos de glucosa ni de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  representaron mejoras en la producción, y ello pese a estar consideradas como las mejores fuentes de carbono y fósforo (Baranova & Egorov, 1969; De Vuyst & Vandamme, 1992, 1993); y por otra el tipo de fuente de nitrógeno parece tener, además del nutricional, un papel inductor en la síntesis de bacteriocinas (De Vuyst, 1995)

Por ello se realizó una nueva serie de cultivos en los que se ensayaron dos fuentes complejas de nitrógeno (extracto de levadura y casitona) comparando los resultados con fuentes simples (glicina, cloruro amónico y, adicionalmente para el caso de EPM, también ácido glutámico). El experimento se llevó a cabo analizando, mediante un diseño rotatable de segundo orden, conjuntamente el papel de las fuentes de N y de carbono (lactosa con SL y glucosa con EPM) lo que permitió obtener también para cada caso la relación C/N óptima.

### **5.1: Cultivos en suero de leche diluido (SLD)**

Los resultados que condujeron a las superficies de respuesta representadas en la Figuras 9 y 10 muestran en ambos casos dos tipos básicos de comportamiento de la producción de biomasa y bacteriocinas en función de la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada. Así, mientras glicina y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , provocaron una disminución de las producciones, el extracto de levadura y la casitona las incrementaron de forma notable. Adicionalmente, los modelos que se obtienen cuando se utiliza extracto de levadura o casitona incluyen un término de segundo orden que sugiere una saturación de la respuesta para valores elevados de ambas fuentes.

Dado que los gradientes de pH observados en los cultivos no explican por sí solos las mejoras obtenidas en las bacteriocinas para el caso de las fuentes complejas de N, cabe pensar en que estén relacionadas con los incrementos también observados para la biomasa y sugieren la existencia de alguna molécula inductora que favorece la producción de biomasa y la de bacteriocinas de forma dependiente o no.

Finalmente resulta interesante señalar que, tal y como se proponía al modificar la composición del medio de cultivo, tanto suplementado el suero con el extracto de levadura como la Casitona se lograron, títulos de bacteriocinas similares o superiores a los obtenidos sobre medio MRS.

### **5.2: Cultivos en efluentes del procesado de mejillón (medio 0,5 MH)**

También sobre este medio y para ambas bacteriocinas, los resultados obtenidos (Figuras 11 y 12) muestran que las fuentes de nitrógeno utilizadas afectaron las producciones de bacteriocina y biomasa siguiendo dos patrones diferentes, si bien se mantiene el hecho de que sólo las fuentes complejas favorecieron altos niveles de ambas variables dependientes. Con todo, las mejoras fueron mayores en los títulos del antibiótico que en la biomasa, lo que sugiere un efecto de algún aminoácido presente en los suplementos y no en el medio base que estimule en mayor medida la producción que el crecimiento.

El caso del ácido glutámico ensayado en esta ocasión constituyó una excepción. Así, aunque para el caso del Pc 1.02 mostró un comportamiento similar al de las otras fuentes de N simples, para los cultivos de Lc1.04 estimuló sólo y específicamente la producción de biomasa, y en mucha mayor medida de lo que lo hicieron las fuentes complejas de N. A la vista de estos resultados, los presentados en el apartado precedente, y la composición



aminoacídica de las fuentes complejas de N parece razonable pensar que los efectos positivos se deban bien a sus altos contenidos en minerales, vitaminas o los aminoácidos serina, cisterna y treonina que se encuentran en alta proporción y están referenciados como precursores específicos de la síntesis de nisina sin afectar al rendimiento celular final (De Vuyst, 1995).

Al cabo, también sobre este medio se concluye que el suplemento con extracto de levaduras permite igualar e incluso superar las producciones de bacteriocinas obtenidas en un medio convencional como el MRS, demostrando la viabilidad de la estrategia de diseño de un medio de cultivo a base de efluentes residuales que abarate los costes de producción.

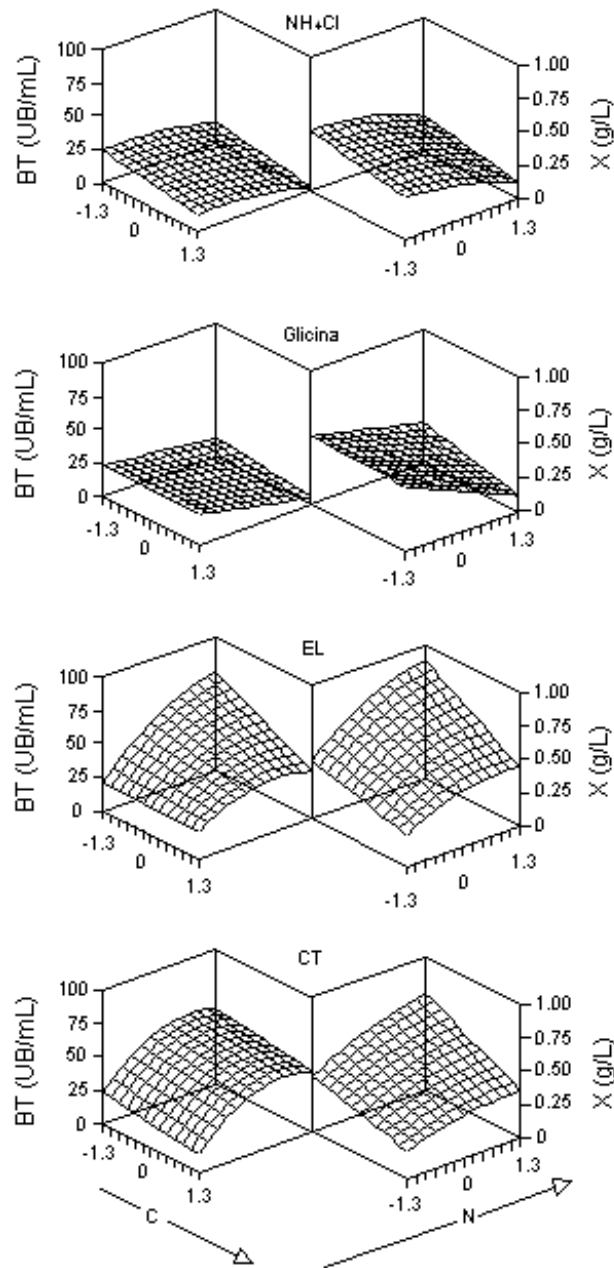


Figura 9. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de nitrógeno total (N) y de azúcares totales (C) sobre las producciones de biomasa (X) y nisina (BT) por *Lc 1.04* en SLD. Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron NH<sub>4</sub>Cl, glicina, extracto de levadura (EL) y Casitona (CT). Como fuente de carbono se utilizó lactosa.

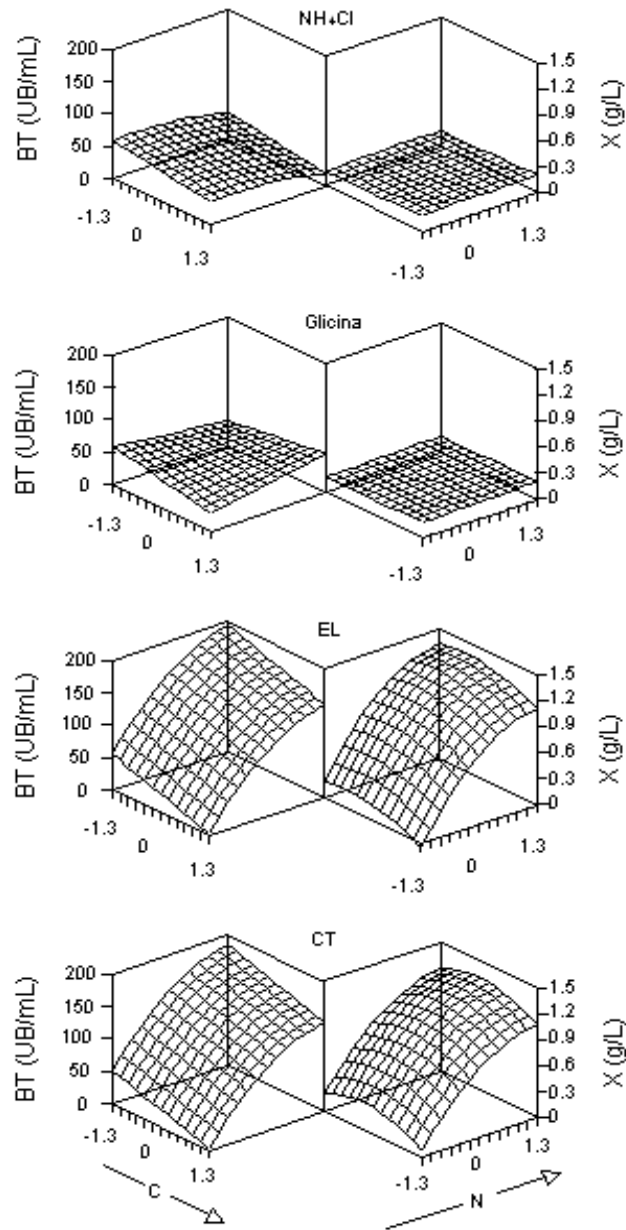


Figura 10. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de nitrógeno total (N) y de azúcares totales (C) sobre las producciones de biomasa (X) y pediocina (BT) por Pc 1.02 en SLD. Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron NH<sub>4</sub>Cl, glicina, extracto de levadura (EL) y Casitona (CT). Como fuente de carbono se utilizó lactosa.

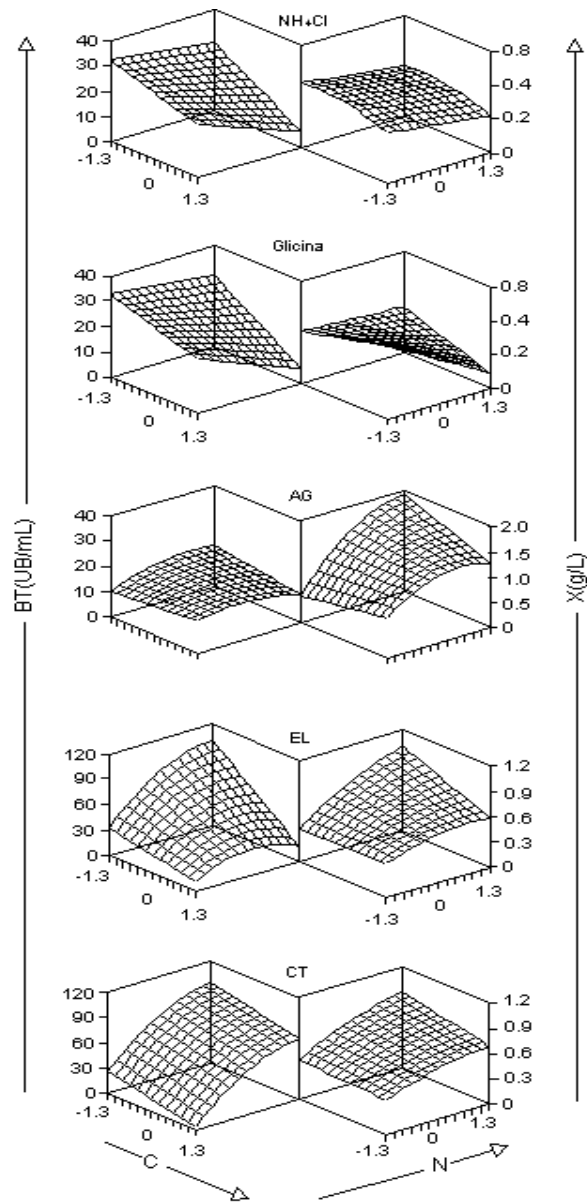


Figura 11. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de nitrógeno total (N) y de azúcares totales (C) sobre las producciones de biomasa (X) y nisina (BT) por *Lc 1.04* en medio 0,5MH. Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron NH<sub>4</sub>Cl, glicina, ácido glutámico (AG), extracto de levadura (EL) y Casitona (CT). Como fuente de carbono se utilizó glucosa.

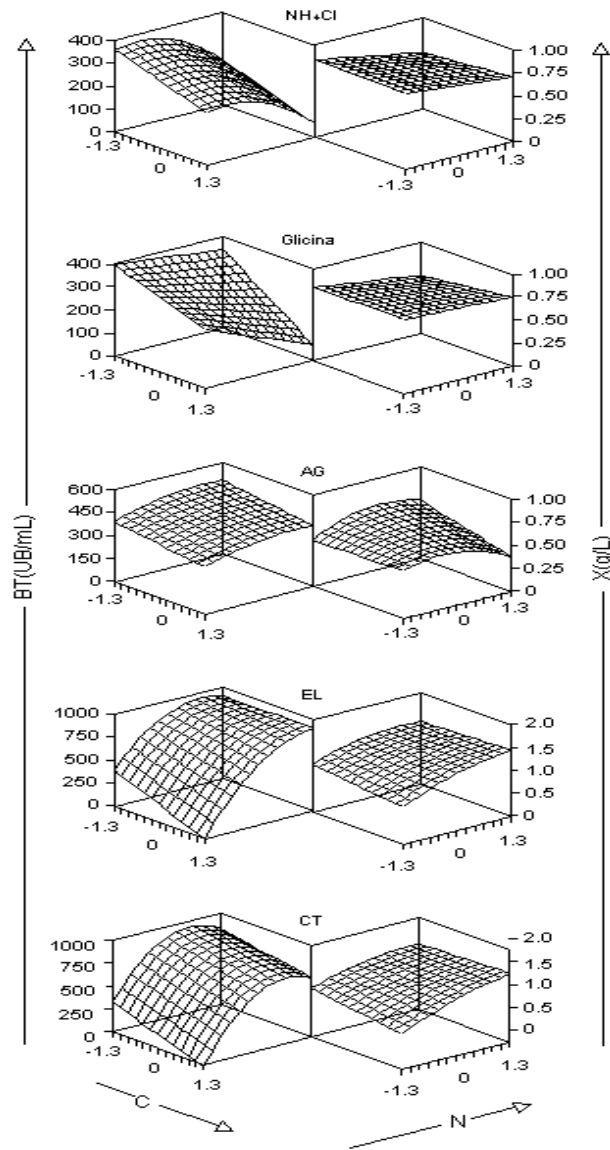


Figura 12. Superficies de respuesta mostrando el efecto de las concentraciones iniciales de nitrógeno total (N) y de azúcares totales (C) sobre las producciones de biomasa (X) y pediocina (BT) por Pc 1.02 en medio 0,5MH. Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron NH<sub>4</sub>Cl, glicina, ácido glutámico (AG), extracto de levadura (EL) y Casitona (CT). Como fuente de carbono se utilizó glucosa.

## 6: Cultivos alimentados y realcalinizados

En los apartados precedentes se demostró que tanto el crecimiento de *Lactococcus lactis* y *Pediococcus acidilactici* como la producción de sus bacteriocinas son dependientes de la concentración y naturaleza de las fuentes de nitrógeno, carbono y fósforo, así como del gradiente de pH generado en el cultivo. Además, utilizando SLD y 0,5MH suplementados con Casitona o extracto de levaduras se lograron mejoras en los títulos de bacteriocinas con respecto al MRS que pusieron de manifiesto el papel inductor de uno o más aminoácidos presentes en esas fuentes de nitrógeno.

Así pues, la opción de la utilizar fuentes de nitrógeno complejas resultó una solución operativa al problema de la producción masiva y barata de probióticos y bacteriocinas a partir de efluentes de la industria alimentaria. Con todo, comparado con la naturaleza residual del medio de cultivo base el precio de los suplementos podría llegar, eventualmente a representar un coste relevante de materia prima, por lo que parecía razonable ensayar otras alternativas que obviasen la necesidad de usar tales suplementos. En este sentido la búsqueda de una modalidad operatoria diferente al proceso discontinuo se presentaba como una posible solución a la vista de los precedentes bibliográficos.

En efecto, la producción en régimen de alimentación discontinua ya se había aplicado con éxito para la producción de metabolitos tradicionalmente clasificados como primarios, tales como el ácido cítrico (Pintado, 1995), y bacteriocinas como la propionicina (Paik & Glatz, 1997) o la propia nisina (Lopez, 1998). Este último autor además restablecía el nivel inicial de pH (saltos de pH) mediante la adición de álcali en cada ciclo de alimentación, de modo que conseguía prolongar sobre un medio convencional TGE el período activo y las producciones de biomasa y nisina con respecto a los cultivos discontinuos.

Así pues, se ensayaron como alternativa a la suplementación con fuentes de N caras la realización de cultivos *fed batch* en fermentador de 5L sometido a realcalinizaciones periódicas utilizando como medio base SLD y medio 0,5MH y diferentes composiciones en los medios de realimentación. Los cultivos se llevaron a cabo en régimen *batch* durante las primeras 8 ó 12 horas (tiempo que es necesario en el cultivo control para la estabilización de la producción de biomasa, bacteriocinas y el pH; y que a su vez coincide con el inicio de la fase estacionaria), fijándose este mismo tiempo como periodo en los sucesivos ciclos de realcalinización y alimentación. Para ésta última, y con el fin de mantener constante el volumen del reactor y asegurar la

reposición de los azúcares consumidos en cada ciclo, al comienzo de cada periodo, el volumen de alimentación con un medio de composición adecuada se igualó al volumen de muestra, de modo que, al no producirse una variación neta del volumen de alimentación, el proceso en alimentación discontinua se transforma en *cuasicontinuo*, de forma que se verificó que, para el volumen:

$$\frac{dV}{dt} = 0$$

y para cualquier otra variable de estado:

$$\frac{dY}{dt} \neq 0$$

### **6.1: Producción de nisina sobre 0,5 MH alimentado con glucosa**

Los resultados correspondientes a un cultivo alimentado con glucosa y sometido a sucesivas realcalinizaciones (Figura 13) muestran un comportamiento similar al de un crecimiento poliáuxico, de modo que es posible diferenciar en él hasta tres fases cuya sucesión vino determinada por el valor alcanzado por el pH final del cultivo antes de cada realcalinización.

#### 1: Fase I de fermentación homoláctica.

Esta fase se prolongó desde el inicio del cultivo hasta las 48 horas, momento en el que el pH final del cultivo superó el valor umbral inhibitorio de 4,5. Ello afectó negativamente a la biomasa que se estancó a partir de las 24 horas de incubación en un nivel ligeramente superior al de un cultivo *batch* convencional y, también, aunque en menor medida, a la síntesis de nisina cuya velocidad de producción descendió progresivamente durante este periodo.

Por otra parte, sólo se observó, como resultado de los procesos catabólicos, producción de ácido láctico, incrementándose de modo constante a razón de 0,2 g/L.h.

Los consumos de nitrógeno y fósforo evolucionaron de forma similar a la biomasa, con una etapa inicial de intenso ingreso seguida de una ralentización a partir de las 16 horas de cultivo.

Por el contrario la glucosa se consumió a un ritmo constante de 0,23 g/L.h, de modo que los aportes en cada periodo de alimentación consiguieron mantener en el cultivo como nivel residual la concentración inicial de azúcares.

## 2: Fase II de transición.

Comprende desde el final de la fase anterior hasta las 112 horas de incubación. Durante este período el pH final antes de cada realcalinización se situó entre 4,5 y 5, valores que, de acuerdo con las experiencias previas, resultan adecuados para Lc 1.04. En efecto, tanto el crecimiento como la bacteriocina evolucionaron de forma logística, produciéndose en esta fase aproximadamente la mitad del total de biomasa y bacteriocina.

Esta intensificación de la actividad metabólica estuvo acompañada de fuertes consumos de las fuentes de nitrógeno y fósforo, mientras que, contrariamente a lo esperado, el ingreso de glucosa se ralentizó respecto de la fase anterior. Tal comportamiento puede explicarse si durante la primera fase de fermentación homoláctica, se produjo un sobreconsumo de glucosa como consecuencia de un elevado gasto en mantenimiento metabólico necesario para compensar el estrés generado por valores inadecuados de pH en el cultivo.



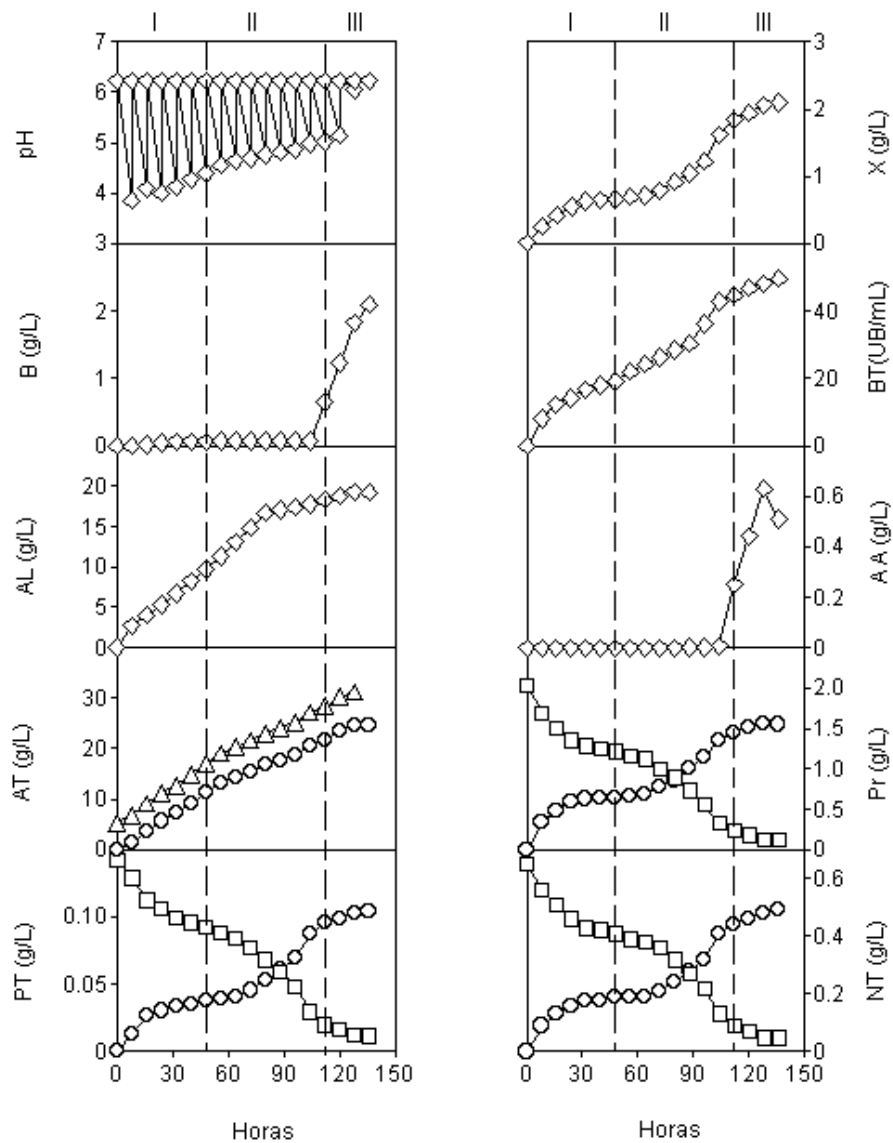


Figura 13. Cultivo de Lc 1.04 sobre medio 0,5MH con escalones de pH y realimentación con glucosa (240 g/L). AT, Pr, PT y NT: azúcares totales, proteínas, fósforo total y nitrógeno total suplementados ( $\Delta$ ), consumidos (O) y remanentes en el medio ( $\square$ ). X: biomasa, BT: nisina, B: 2,3-butanodiol, AL: ácido láctico, AA: ácido acético. I, II y III son las fases homoláctica, de transición y heteroláctica, respectivamente.

Por otra parte, dado que la concentración de glucosa se mantuvo en un nivel en torno a 5 g/L durante toda la incubación, es razonable pensar que existe una limitación del flujo de carbono a partir de la segunda mitad de la fase de transición. Ello explicaría la evolución hacia un comportamiento de fermentación ácido mixta o heteroláctica. Así, el intenso crecimiento que se produce entre las 80 y las 112 horas de cultivo (en este periodo se obtiene la máxima velocidad de crecimiento) daría cuenta mayoritariamente del flujo de carbono (intermediarios de la glucólisis incluidos) lo que conduce, a la ralentización en la velocidad de síntesis del ácido láctico.

### 3: Fase III de fermentación heteroláctica.

Comprende desde las 112 horas hasta el final del cultivo. La característica esencial de este periodo es el agotamiento de las fuentes de nitrógeno y fósforo, que tiene como consecuencia el colapso en la capacidad de recuperación del pH, la ralentización de las producciones de biomasa y nisina y una brusca aparición de butanodiol y acetato en el medio.

El hecho de que N y P se agoten de forma simultánea dificulta la atribución a uno de los dos nutrientes la responsabilidad del fenómeno.

Con el fin de clarificar si fue el nitrógeno la causa del cambio metabólico se postuló la siguiente hipótesis: si las proteínas fueran utilizadas como fuente de carbono, su agotamiento (o descenso por debajo de una concentración asimilable) reforzaría la mencionada limitación por flujo de carbono señalada en la fase anterior, y con ello la aparición de los metabolitos heterofermentativos.

Para comprobar tal hipótesis se realizaron los balances de carbono durante el cultivo partiendo de la estequiometría de los productos de la fermentación heteroláctica y considerando el gasto de glucosa implicado en el crecimiento y en el mantenimiento celular. No se incluyen otros metabolitos menores (como la propia nisina) por ser su contribución, en términos de masa, previsiblemente despreciables.

Procediendo de este modo se observa que (Figura 14), a excepción de un breve intervalo entre las 40 y las 48 horas, la glucosa suministrada no da cuenta de todo el carbono gastado durante la fermentación, por lo que cabe suponer que Lc 1.04 utiliza las proteínas también como fuente de carbono.

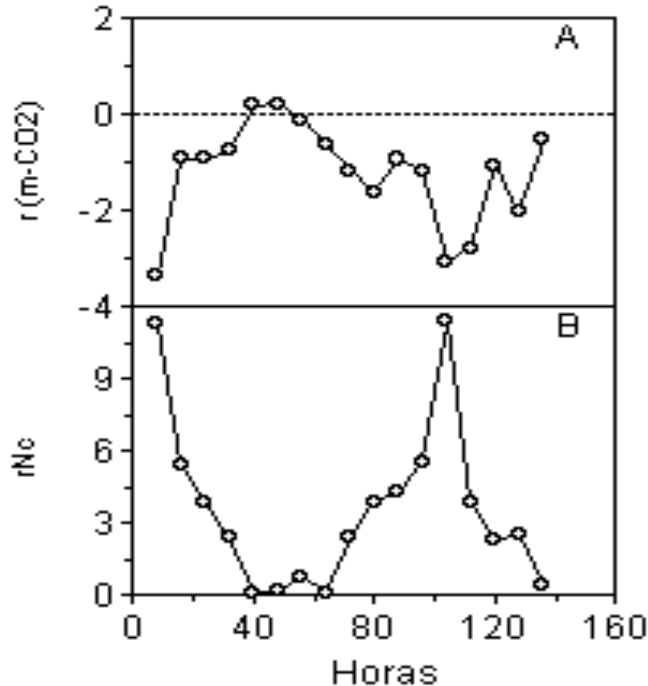


Figura 14. A: Gasto correspondiente al mantenimiento y la producción de CO<sub>2</sub> [r(m-CO<sub>2</sub>)] por Lc 1.04 en medio 0,5MH realimentado con glucosa. B: velocidad de consumo de nitrógeno (rNc en mg N·L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>).

## 6.2: Producción de nisina sobre medio 0,5 MH alimentado con medio 10 MH

De los resultados anteriores se deduce que sería posible mejorar los resultados anteriores suministrando en cada alimentación junto con la glucosa, las cantidades necesarias de las fuentes de nitrógeno y fósforo que eviten su agotamiento en el medio. Por ello, se decidió alimentar utilizando para ello un medio MH concentrado por ultrafiltración (medio 10MH).

La observación detallada del proceso (Figura 15) confirma que hasta las 136 horas de incubación se sucedieron las tres fases referidas en el cultivo anterior, siendo similares tanto la evolución del pH como los perfiles de las producciones y los consumos de nutrientes. A partir de ese momento, se alcanzó un estado estacionario en el que se estabilizaron los niveles remanentes de los macronutrientes en el medio, las producciones de biomasa

y metabolitos fueron prácticamente lineales y se mantuvo la capacidad de recuperación del pH manteniéndose en valores óptimos para la producción.

Sin embargo, a excepción del fósforo cuyo consumo fue lineal una vez iniciada la fase heterofermentativa, el resto de los nutrientes presentaron ritmos de consumos diferentes en los 2/3 finales de la incubación. Así, el consumo de nitrógeno se decelera progresivamente probablemente debido a que, por el efecto conjunto de consumo y muestreo, aumenta la contribución relativa en el medio de cultivo de la ya mencionada fracción proteica difícilmente metabolizable (Pastrana, 1991). Por su parte, el ingreso de glucosa experimenta durante la mitad de la fermentación una aceleración que se corresponde con el periodo de mayor actividad metabólica (en términos de producción de biomasa y heterometabolitos), para reducirse ligeramente hacia el final de la fermentación cuando el crecimiento pasa a ser lineal.

El presente experimento presenta, con todo, como diferencia metabólica fundamental con el anterior, la producción de etanol y la ausencia de 2,3-butanodiol en la fase heterofermentativa. Como en esta ocasión el catabolismo de la glucosa se intensificó al finalizar la etapa homofermentativa como consecuencia de la disponibilidad de N y P para la formación de biomasa (incrementándose con ello el consumo de  $\text{NAD}^+$ ), tal cambio en los flujos metabólicos parece estar relacionado con una mayor conversión del piruvato en acetil-CoA, de modo que la transformación de éste último en acético y etanol constituiría una vía más eficiente de regeneración de NADH. En este experimento, puede observarse que también en todas las ocasiones las proteínas son utilizadas, además de como fuente de nitrógeno, como fuente de carbono, dando cuenta, de este modo, de los déficits en el balance molar del carbono (Figura 16).

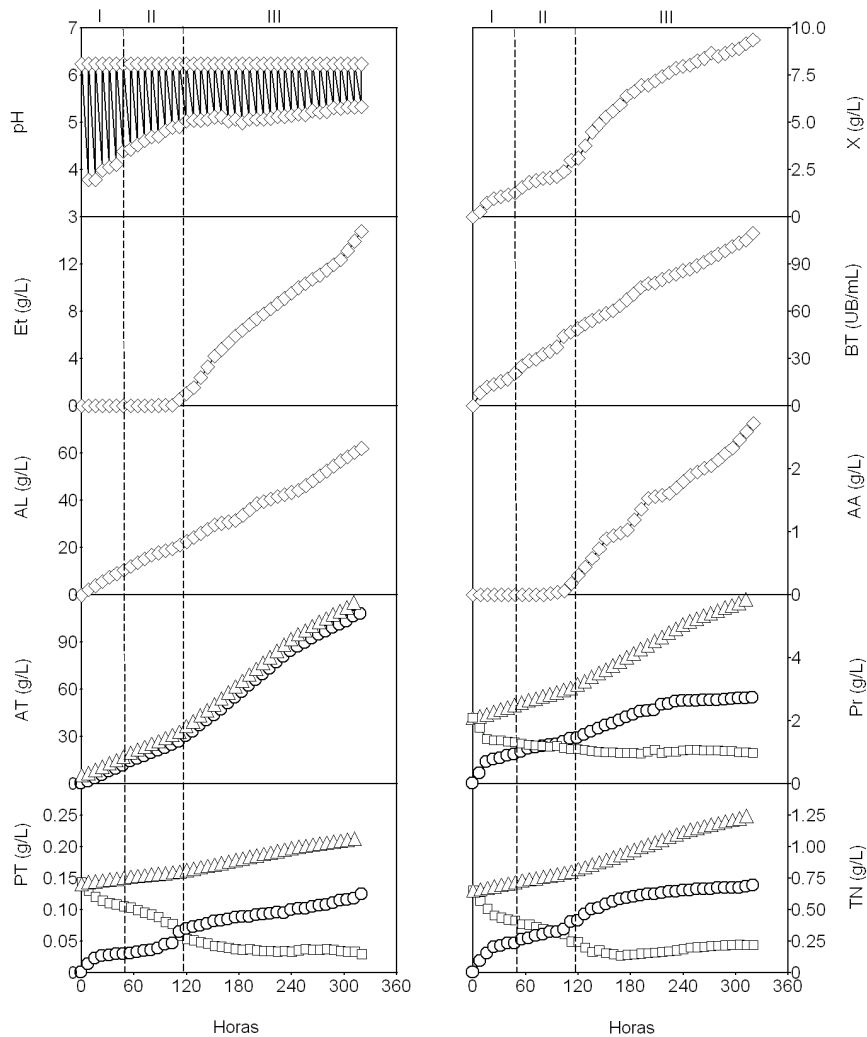


Figura 15. Cultivo de Lc 1.04 sobre medio 0,5MH con escalones de pH y realimentación con medio 10MH. AT, Pr, PT y NT: azúcares totales, proteínas, fósforo total y nitrógeno total suplementados ( $\Delta$ ), consumidos (O) y remanentes en el medio ( $\text{€}$ ). X: biomasa, BT: nisina, Et: etanol, AL: ácido láctico, AA: ácido acético. I y II son las fases homoláctica y heteroláctica, respectivamente.

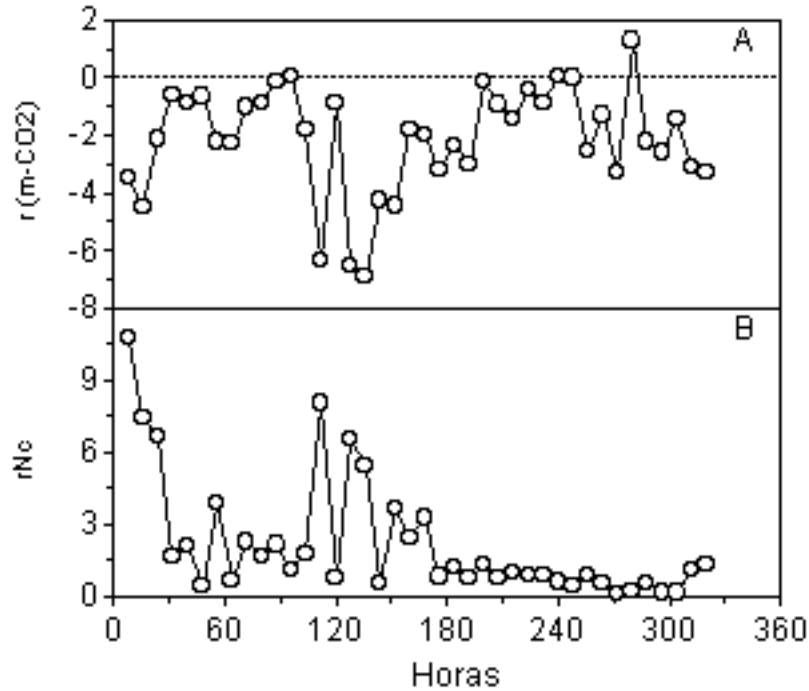


Figura 16. A: Gasto correspondiente al mantenimiento y la producción de  $CO_2$  [ $r(m-CO_2)$ ] por Lc 1.04 en medio 0,5MH realimentado con medio 10MH. B: velocidad de consumo de nitrógeno ( $rNc$  en  $mg\ N \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ).

### 6.3: Producción de pediocina sobre medio 0,5 MH alimentado con glucosa

En el caso de la producción de pediocina (Figura 17) en cultivos alimentados con glucosa se observa la misma mencionada mejora en las producciones que en los casos anteriores y los siguientes fenómenos de carácter general: ondas en las producciones de biomasa y pediocina y los consumos de nutrientes, dos fases metabólicas: una primera fase homofermentativa a la que sigue otra heterofermentativa y detención del cultivo con colapso en la capacidad de recuperación del pH cuando se agota el fósforo del medio de cultivo.

Sin embargo, también se observan diferencias en relación con el cultivo similar del *Lactococcus*. Así, el N y P ni se agotaron simultáneamente ni describieron las ondas de modo sincrónico con la

biomasa y la pediocina, y tampoco fue simultáneo el comienzo de la síntesis de los metabolitos de fase heterofermentativa.

Antes de las 88 horas la producción de pediocina y el consumo de fósforo fueron prácticamente lineales. No así el consumo de nitrógeno, lo que, sin duda, repercutió en un incremento de la biomasa ligeramente por encima de la linealidad. Con el agotamiento del fósforo se detuvo la producción de láctico y se ralentizaron las de biomasa y pediocina, al tiempo que apareció etanol como nuevo producto heteroláctico.

Estos hechos parecen confirmar la hipótesis señalada ya con *Lactococcus* de que, pese a tratarse también Pc 1.02 de un microorganismo homofermentativo, el desvío metabólico hacia rutas heterofermentativas se encuentra asociado a la existencia de limitaciones nutricionales (de flujo o nivel) en el medio.

Con todo, del balance al carbono y la estequiometría del proceso que se analizará seguidamente (Figura 18), parece claro que el nitrógeno también interviene en el sistema de un modo similar al caso descrito en Lc 1.04, provocando también una limitación que regula “secundariamente” la síntesis del antibiótico ya que las proteínas son utilizadas adicionalmente como fuente de carbono.

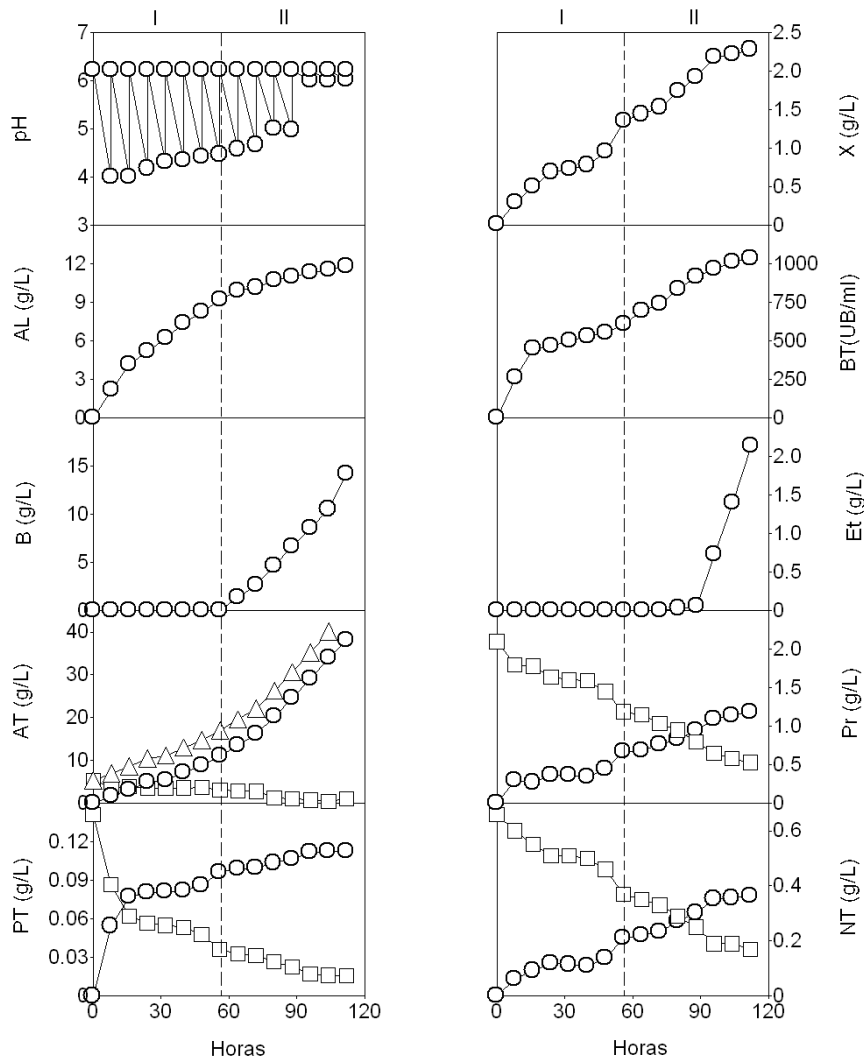


Figura 17. Cultivo de Pc 1.02 sobre medio 0,5MH con escalones de pH y realimentación con glucosa (240 g/L). AT, Pr, PT y NT: azúcares totales, proteínas, fósforo total y nitrógeno total suplementados ( $\Delta$ ), consumidos (O) y remanentes en el medio ( $\text{€}$ ). X: biomasa, BT: pediocina, B: 2,3-butanodiol, AL: ácido láctico, Et: etanol. I y II son las fases homoláctica y heteroláctica, respectivamente.



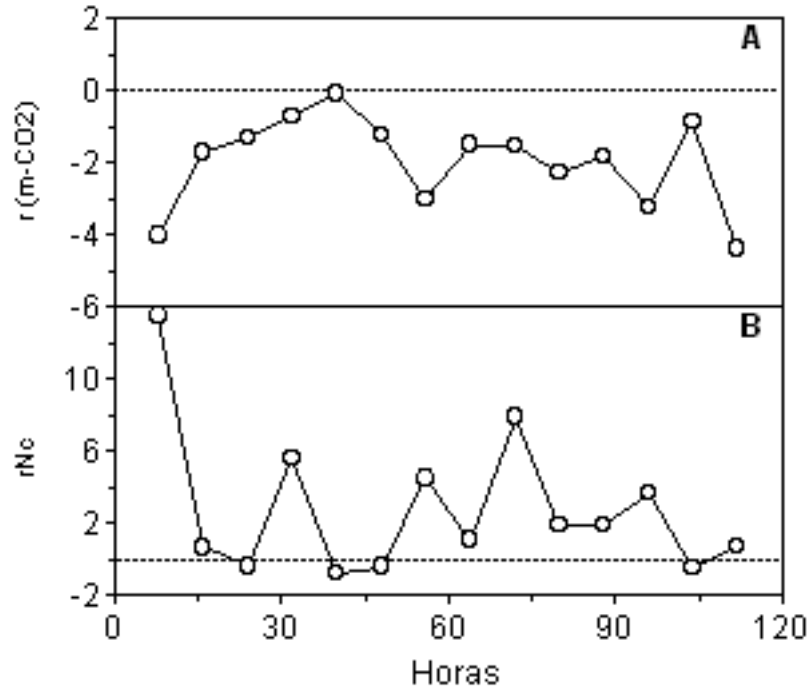


Figura 18. A: Gasto correspondiente al mantenimiento y la producción de CO<sub>2</sub> [r(m-CO<sub>2</sub>)] por Pc 1.02 en medio 0,5MH realimentado con glucosa. B: velocidad de consumo de nitrógeno (rNc en mg N·L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>).

#### 6.4: Producción de pediocina sobre medio 0,5 MH alimentado con medio 10 MH

En este caso la alimentación con medio 10 MH tuvo como finalidad prevenir el déficit de fósforo señalado anteriormente (Figura 19). Con respecto al cultivo precedente, el consumo de glucosa fue inferior, el de P fue similar, mientras que los de nitrógeno y proteínas se incrementaron. Estos nuevos regimenes de consumo fueron sincrónicos entre ellos y con las producciones de biomasa y bacteriocinas que exhibieron los característicos “perfiles ondulados” de situaciones anteriores.

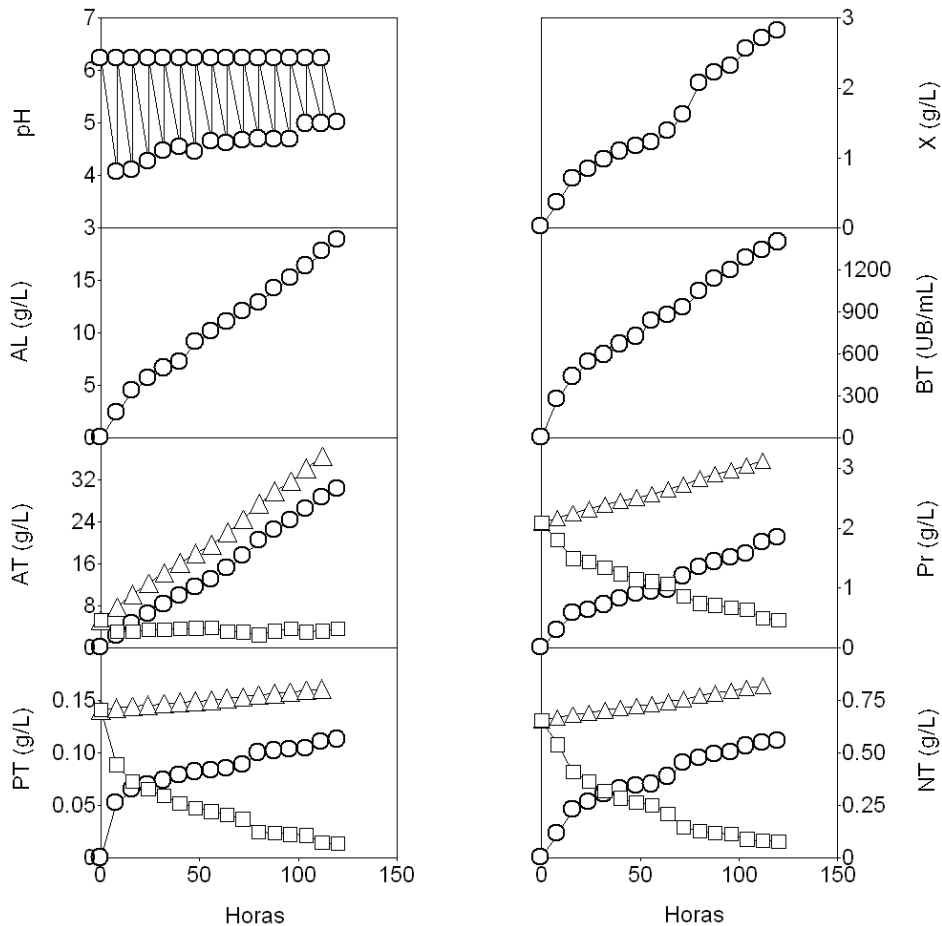


Figura 19. Cultivo de Pc 1.02 sobre medio 0,5MH con escalones de pH y realimentación con medio 10MH. AT, Pr, PT y NT: azúcares totales, proteínas, fósforo total y nitrógeno total suplementados ( $\Delta$ ), consumidos (O) y remanentes en el medio ( $\text{€}$ ). X: biomasa, BT: pediocina, AL: ácido láctico.

La diferencia sustancial de este cultivo con respecto a los precedentes, sin embargo, es que, a pesar de las variaciones en las velocidades de consumo, ello no determinó cambios en el metabolismo que fue, durante toda la incubación, homofermentativo. Ello se debe a que los consumos de N y P suaves, progresivos y probablemente balanceados impidieron la aparición de limitaciones de flujo de nutrientes.

Con todo, incluso en este último caso, la fenomenología del cultivo puede explicarse en idénticos términos metabólicos, cinéticos y de balance de materia que en el primer experimento. De hecho, aplicando el razonamiento utilizado para el balance de carbono y el consumo de nitrógeno (Figura 20), puede observarse que también en todas las ocasiones las proteínas son utilizadas, además de como fuente de nitrógeno, como fuente de carbono, dando cuenta, de este modo, de los déficits en el balance molar del carbono.

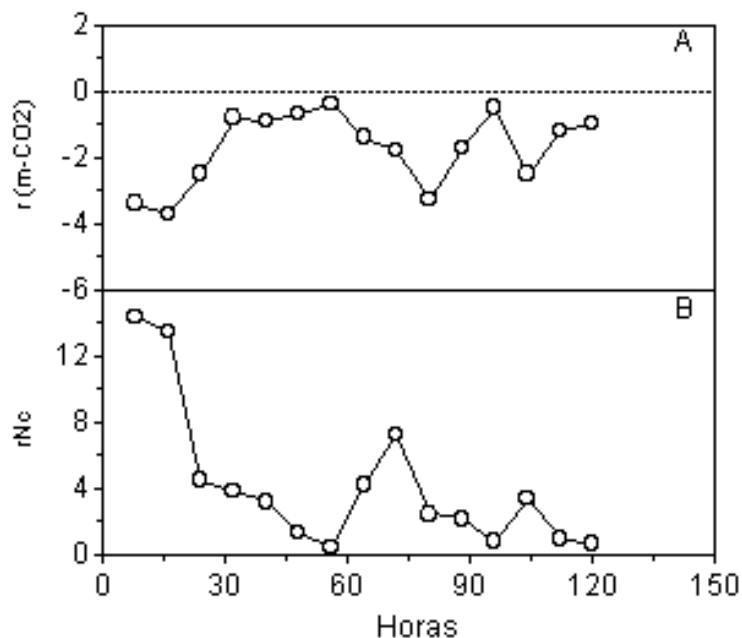


Figura 20. A: Gasto correspondiente al mantenimiento y la producción de  $\text{CO}_2$  [ $r(m\text{-CO}_2)$ ] por Pc 1.02 en medio 0,5MH realimentado con medio 10MH. B: velocidad de consumo de nitrógeno ( $rNc$  en  $\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

### 6.5: Producción de bacteriocinas sobre suero de leche

Todo lo referido en los cultivos anteriores sobre medio de mejillón puede generalizarse a los casos en que se utilizó suero de leche. También se lograron incrementos notables en los niveles de bacteriocinas y también en esta ocasión parece existir una limitación por nitrógeno que determinó la

aparición de un metabolismo heteroláctico en el caso de la nisina (Figura 21).

Con este medio la principal diferencia es que el cultivo para producir pediocina (Figura 22) presentó un comportamiento heterofermentativo con producción de acético desde el inicio del cultivo. Además, en esta ocasión salvo un breve periodo al inicio de la incubación, la fuente de nitrógeno no fue utilizada como fuente de carbono (Figuras 23 y 24), probablemente debido a su buena calidad y a su fácil metabolismo.

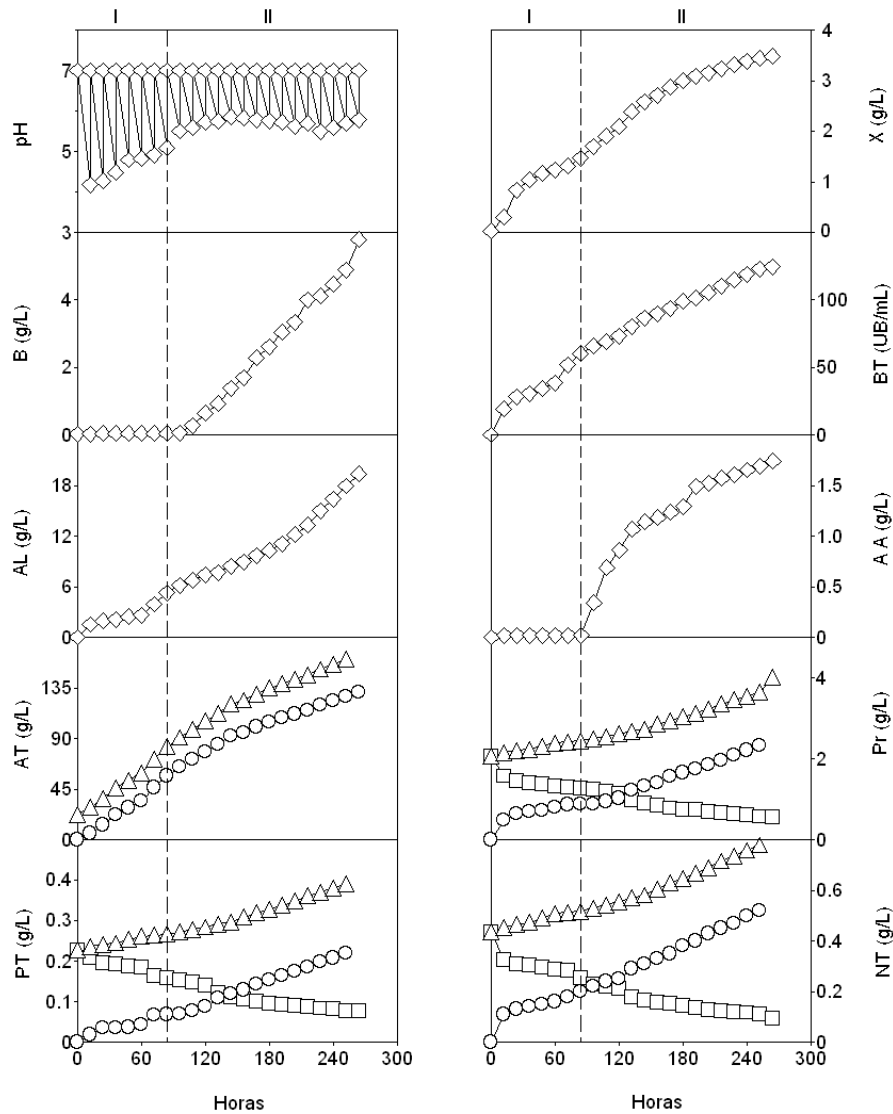


Figura 21. Cultivo de Lc 1.04 sobre SLD con escalones de pH y realimentación con SLC y lactosa (400 g/L). AT, Pr, PT y NT: azúcares totales, proteínas, fósforo total y nitrógeno total suplementados ( $\Delta$ ), consumidos (O) y remanentes en el medio ( $\ominus$ ). X: biomasa, BT: nisina, B: 2,3-butanodiol, AL: ácido láctico, AA: ácido acético. I y II son las fases homoláctica y heteroláctica, respectivamente.

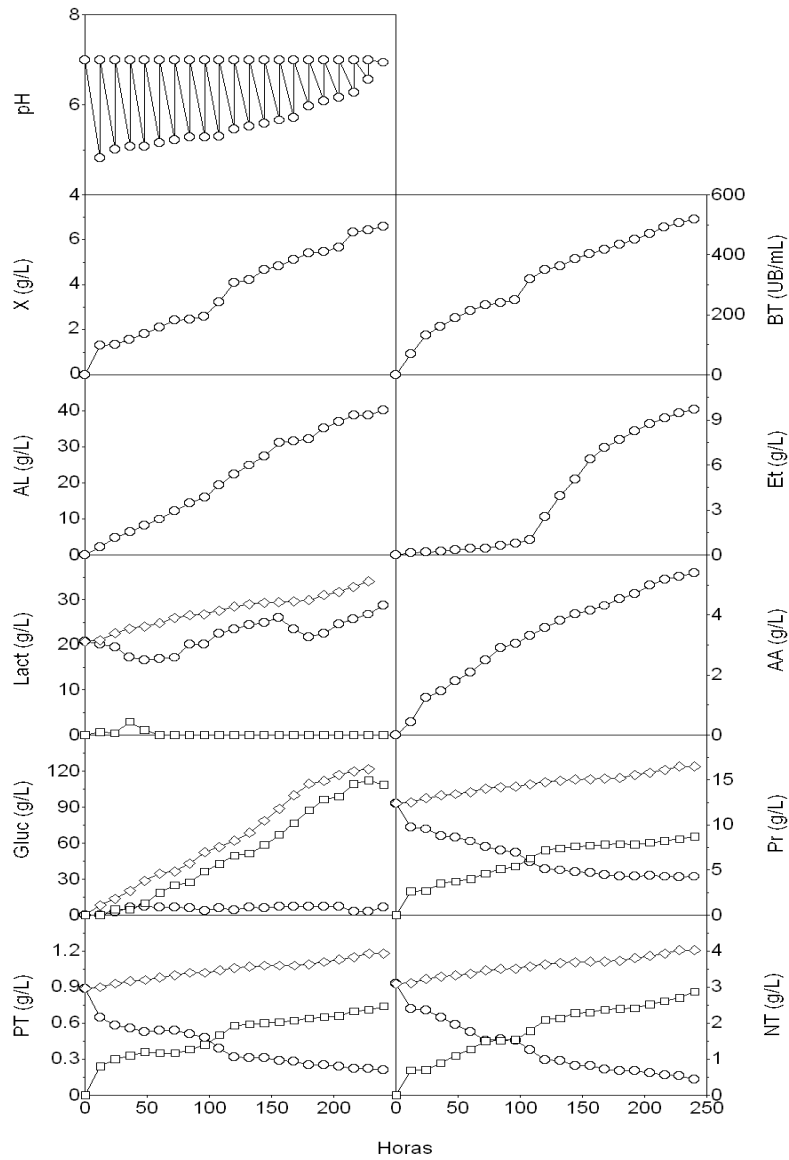


Figura 22. Cultivo de Pc 1.02 sobre SLD suplementado con un 2% de extracto de levadura, con escalones de pH y realimentación con SLC suplementado con un 2% de extracto de levadura y glucosa (400 g/L). Lact, Gluc, Pr, PT y NT: lactosa, glucosa, proteínas, fósforo total y nitrógeno total suplementados ( $\diamond$ ), consumidos ( $\ominus$ ) y remanentes ( $\circ$ ) en el medio. X: biomasa, BT: pediocina, AL: ácido láctico, AA: ácido acético, Et: etanol.

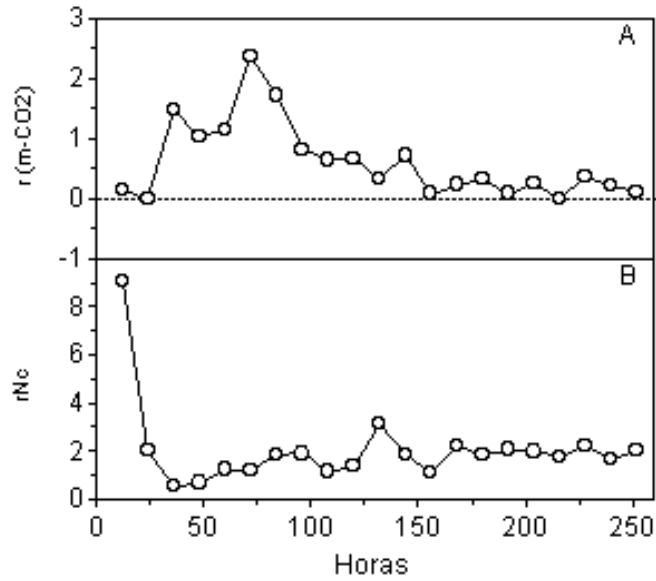


Figura 23. A: Gasto correspondiente al mantenimiento y la producción de CO<sub>2</sub> [ $r(m-CO_2)$ ] por Lc 1.04 en medio SLD realimentado con medio SLC y lactosa. B: velocidad de consumo de nitrógeno ( $rNc$  en  $mg\ N \cdot L^{-1}h^{-1}$ ).

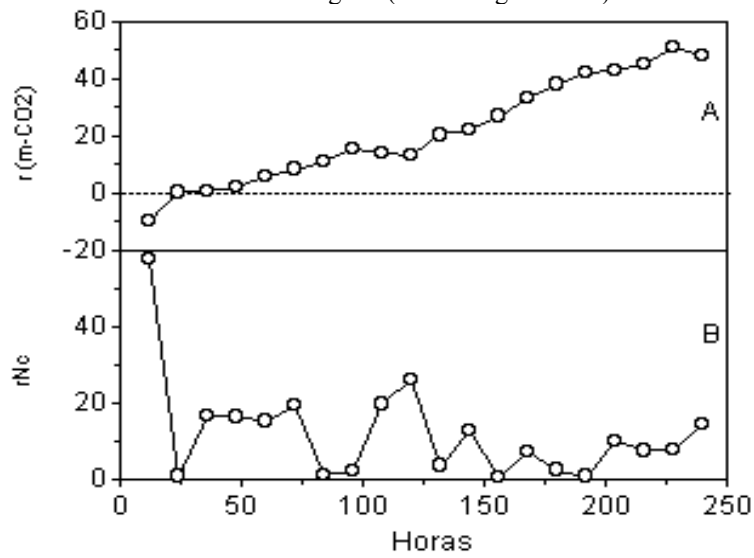


Figura 24. A: Gasto correspondiente al mantenimiento y la producción de CO<sub>2</sub> [ $r(m-CO_2)$ ] por Pc 1.02 en medio SLD+2% de extracto de levadura realimentado con medio SLC+2% de extracto de levadura y glucosa. B: velocidad de consumo de nitrógeno ( $rNc$  en  $mg\ N \cdot L^{-1}h^{-1}$ ).

## 7: Obtención de modelos para la producción de bacteriocinas

La elaboración de algoritmos de control eficientes de los procesos de fermentación exige obtener modelos matemáticos que ofrezcan un buen ajuste a los resultados experimentales permitiendo describir el comportamiento de los sistemas microbianos.

En el caso de la producción de biomasa probiótica y de bacteriocinas son escasas las aportaciones realizadas en este ámbito y ello es debido, en gran medida a la dificultad para identificar las variables relevantes del sistema de las que depende ambas producciones. De hecho, los modelos simples, del tipo logístico para el crecimiento o de Luedeking & Piret para la producción de bacteriocinas (Luedeking & Piret, 1959) resultaron insatisfactorios para describir la evolución de biomasa y nisina de los microorganismos ensayados tanto en cultivos discontinuos como aquellos sometidos a recalculización.

En este sentido, recientemente, Lopez (1998) demostró que deben ser modificados para incluir el efecto de gradiente de pH artificialmente generado en los cultivos. El modelo propuesto por la autora parte de las siguientes consideraciones:

1: El gradiente de pH ( $DpH$ ) afecta a la velocidad de crecimiento ( $r_X$ ) del siguiente modo:

$$R_X = r_X(1 + b_1 \Delta pH); \text{ siendo} \quad [7.1]$$

$R_X$ : Velocidad de crecimiento ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ) inducida por la variación del pH.

$r_X$ : Velocidad de crecimiento ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ) en cultivo a pH constante.

$b_1$ : Constante empírica de proporcionalidad.

De este modo, asumiendo un crecimiento logístico para  $r_X$ :

$$\frac{dX}{dt} = r_X = \mu X \left( \frac{K - X}{K} \right); \text{ donde:} \quad [7.2]$$



X: Biomasa ( $X_0$ : biomasa inicial) en g/L.  
 K: Biomasa máxima en g/L.  
 m: Coeficiente de velocidad específica ( $h^{-1}$ )

transformándose el modelo [7.1] en:

$$R_x = \mu X \left( \frac{K - X}{K} \right) (1 + b_1 \Delta pH) \quad [7.3]$$

e integrando esta forma diferencial:

$$X = \frac{K}{1 + \text{EXP}[c - \mu(1 + b_1 \Delta pH)t]} ; \text{ siendo } c = \ln\left(\frac{K}{X_0} - 1\right) \quad [7.4]$$

2: Integrando la anterior modificación que el gradiente de pH hace sobre la velocidad de crecimiento en el modelo de LUEDEKING & PIRET (1959), la velocidad de acumulación de nisina ( $r_p$  en  $UB \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1}$ ) será:

$$r_p = \alpha R_x + \beta X \quad [7.5]$$

siendo  $\alpha$  y  $\beta$  parámetros experimentales relacionados con el carácter primario, secundario o mixto del metabolito.

Lógicamente, calculados de este modo, los parámetros del modelo logístico inicial (asíntota y pendiente) se transforman en aparentes.

Cuando se aplicaron los modelos [7.4] y [7.5] a los resultados experimentales del capítulo 6 (Figuras 13, 15, 17, 19, 21 y 22) los ajustes obtenidos tanto para la producción de biomasa como para la de nisina fueron insatisfactorios, sugiriendo este hecho, que el modelo no recoge todas las variables relevantes del sistema.

### 7.1: Un modelo para la producción de nisina sobre medio 0.5 MH

De la observación detallada de los cultivos de Lc 1.04 sobre medio 0.5 MH (Figuras 13 y 15) se puede observar que, al margen de otros efectos señalados, dos son los principales factores que influyen en el sistema. Por una parte, la producción de biomasa depende del ingreso de nitrógeno que, en el caso de Lc 1.04 actúa como nutriente limitante. Integrando este efecto en el modelo [7.4], se obtiene:

$$X = \sum_{t=0}^{t=t} R_x = \sum_{t=0}^{t=t} r_x (1 + b_1 \Delta pH)(1 + b_2 rNc); \text{ siendo:}$$

[7.

6]

rNc: Velocidad de consumo de nitrógeno.

Por otra, la producción de nisina se encuentra afectada negativamente por valores de pH en el cultivo por debajo del intervalo 4-4,5. Introduciendo este efecto en la ecuación [7.5] se obtiene:

$$r_p = (\alpha R_x + \beta X) \left( 1 - b_3 \left| \frac{pH_t - pH_u}{pH_u} \right| \right); \text{ donde:}$$

[7.

7]

pH<sub>u</sub>: es el valor de pH umbral en el cultivo y pH<sub>t</sub>: es el valor del pH antes de cada realcalinización.

Los ajustes fueron (Figuras 25 A y B), tanto para la biomasa como para la nisina, satisfactorios. Los parámetros obtenidos del modelo pusieron de manifiesto, por una parte, que el pH umbral para la producción de nisina se sitúa en un valor ligeramente inferior a 4 y, por otra, confirmaron el carácter primario de la nisina ( $b \ll a$ ), acentuado en el caso del cultivo alimentado con medio MH.

## 7.2: Un modelo para la producción de pediocina sobre medio 0.5 MH

Del mismo modo que para la nisina, para construir un modelo para la producción de pediocina se consideró que el sistema parecía estar regulado de modo “primario” por el fósforo afectando a la velocidad de crecimiento y por valores de pH superiores a 4,5 que enlentecen su síntesis (Figuras 15 y 17). De esta forma, para describir la producción de biomasa por *Pediococcus acidilactici* en medio 0.5 MH se utilizó el siguiente modelo:

$$X = \sum_{t=0}^{t=t} R_x = \sum_{t=0}^{t=t} r_x (1 + b_1 \Delta pH)(1 + b_2 rPc); \text{ siendo:}$$

[7.

8]

rPc: Velocidad de consumo de fósforo.

Por otra parte, para describir la producción de pediocina, se utilizó el modelo [7.7].

La aplicación de ambos modelos a los resultados experimentales de biomasa y pediocina obtenidos sobre medio 0.5 MH (Figuras 15 y 19) resultó también satisfactoria (Figuras 26 A y B), poniéndose de manifiesto, el carácter primario de este antibiótico ( $b \ll a$ ) y que el pH umbral para la producción de pediocina, se sitúa, tal y como se había observado, en un nivel alrededor de 4,5.

## 7.3: Un modelo para la producción de bacteriocinas sobre suero de leche

Sobre este medio los modelos utilizados para describir la producción de biomasa y nisina por Lc 1.04 fueron similares a los anteriores (modelos [7.6] y [7.7], respectivamente). En el caso de los cultivos de Pc 1.02, el modelo de la biomasa integró la dependencia del fósforo y también del nitrógeno (modelo [7.9]) y para describir la producción de pediocina no se consideró la existencia de un pH umbral (modelo [7.5]).

$$X = \sum_{i=0}^{t=t} R_x = \sum_{i=0}^{t=t} r_x (1 + b_1 \Delta pH)(1 + b_2 rPc)(1 + b_2 rNc);$$

[7.

9]

Los resultados obtenidos (Figuras 25 C y 26 C) demostraron la adecuación de los modelos [7.6] y [7.9] para describir respectivamente, las producciones de biomasa por Lc 1.04 y Pc 1.02. De la misma forma, las producciones de nisina y pediocina fueron adecuadamente descritas con los modelos [7.7] y [7.5], respectivamente.

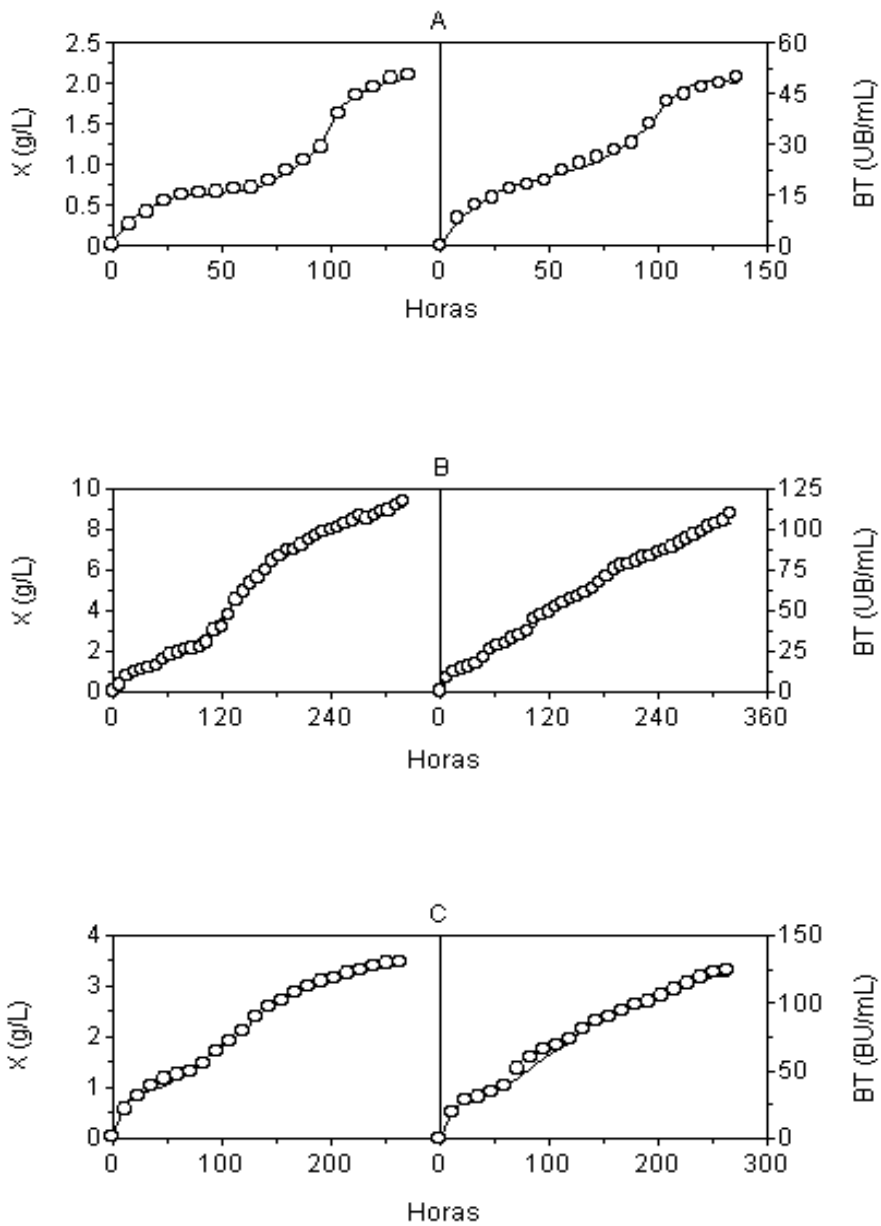


Figura 25. Valores experimentales (símbolos) y predicciones del modelo propuesto para la producción de nisina sobre medio 0,5MH con escalones de pH y realimentado con glucosa (A) y con medio 10MH (B) y sobre SLD (C) realimentado con SLC y lactosa. X: biomasa, BT: nisina.

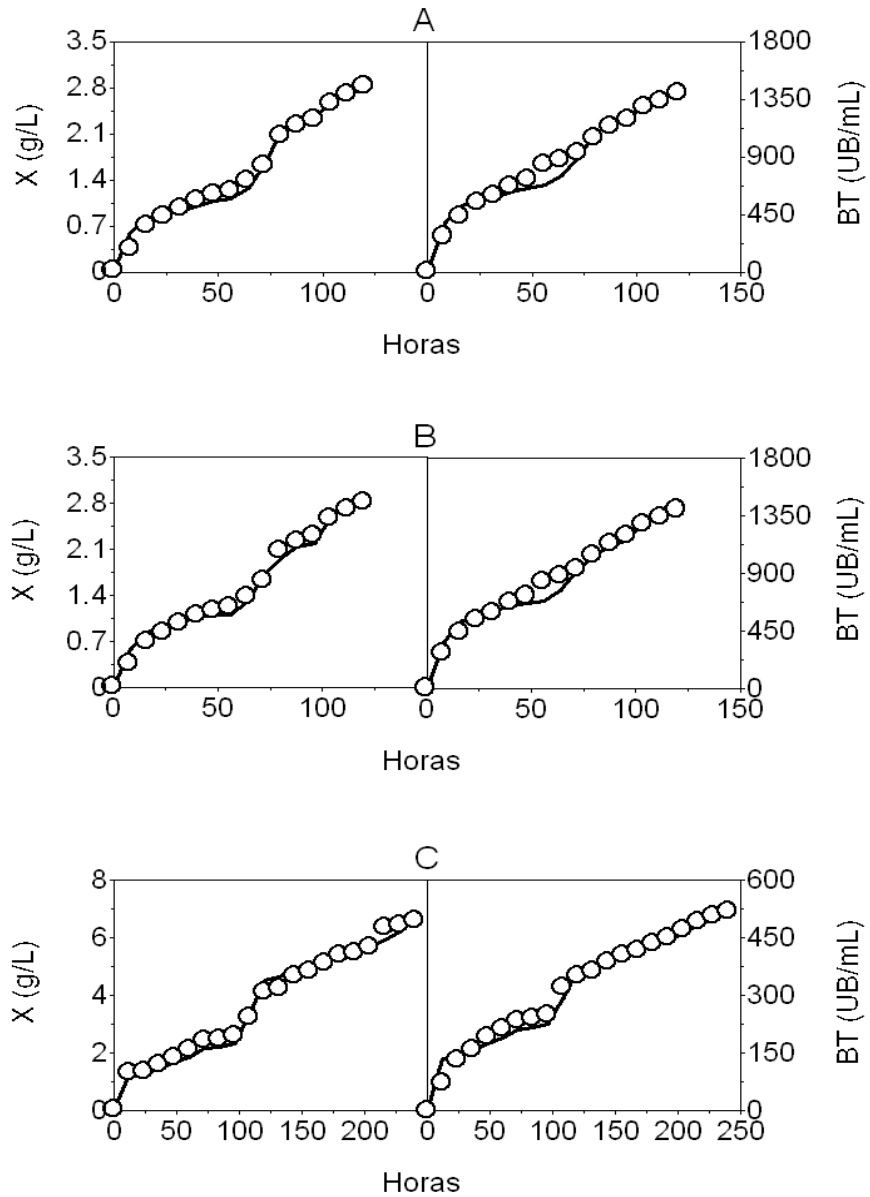


Figura 26. Valores experimentales (símbolos) y predicciones del modelo propuesto para la producción de pediocina sobre medio 0,5MH con escalones de pH y realimentado con glucosa (A) y con medio 10MH (B) y sobre SLD + 2% EL (C) realimentado con SLC + 2% EL y glucosa. X: biomasa, BT: pediocina.

## **8: Estabilidad frente al pH y la temperatura.**

Una vez estudiados los factores principales que influyen en la producción de bacteriocinas y, después de haber obtenido resultados positivos en las experiencias de producción con la utilización de saltos de pH y realimentación discontinua de glucosa (superándose las producciones de nisina y pediocina obtenidas sobre medio MRS), parece razonable estudiar el comportamiento de estos antibióticos en las diferentes condiciones de temperatura y pH de los diferentes sistemas alimentarios en los que se pretenden aplicar.

Los estudios de estabilidad se llevaron a cabo sobre soluciones de las bacteriocinas ensayando conjuntamente ambas variables mediante planes factoriales de segundo orden y a dos tiempos de tratamiento. Los resultados mostraron (Figura 27), en general, una elevada estabilidad a ambas variables, siendo interesante destacar de modo particular los siguientes hechos:

1: En general, la pediocina y la nisina producidas por Pc 1.02 y Lc 1.04 respectivamente, demostraron ser más termorresistentes que el *Nisaplin*, especialmente a  $t= 15$  minutos.

2: A niveles mínimos de pH, el incremento de la temperatura produce ligeras pérdidas en la actividad de las tres bacteriocinas ensayadas, al cabo de los primeros 5 minutos de exposición, que se incrementan cuando el tiempo de incubación aumenta hasta 15 minutos.

3: En la medida que se incrementan los niveles de pH, la termoestabilidad de estas bacteriocinas disminuye, siendo ligeramente más estable, la nisina producida por Lc 1.04 en los diferentes medios de cultivo.

Así pues, en conclusión, desde un punto de vista tecnológico, la elevada estabilidad de las bacteriocinas las hace especialmente adecuadas para incorporarlas como aditivo a muchos alimentos que, en su proceso de elaboración se ven sometidos a condiciones extremas de pH o temperatura.

## **9: Estabilidad frente a las proteasas**

Dada la naturaleza peptídico de las bacteriocinas un aspecto importante de su estabilidad hace referencia a la resistencia frente al ataque

proteolítico. En efecto, muchos alimentos contienen proteasas, bien de forma natural (endógenas), como resultado de la contaminación microbiana o bien incorporadas durante los procesos de fabricación. La presencia de estas enzimas puede reducir la efectividad de la bacteriocinas cuando se incorporan a este tipo de alimentos.

Con el fin de evaluar la pérdida de actividad como consecuencia de la proteolisis se realizaron cinéticas del proceso con cuatro enzimas diferentes comparando la estabilidad de diferentes soluciones de nisina y pediocina producidas en nuestro laboratorio con el preparado comercial Nisaplin.

Los resultados (Figuras 28 y 29) mostraron que, en todos los casos, el incremento del tiempo de incubación produjo una disminución exponencial de la actividad de las bacteriocinas (asimilable a una cinética de degradación de primer orden). En el caso de la nisina (Figura 28) destaca el hecho -de forma similar a la disolución de *Nisaplin*- los extractos de diferentes medios de cultivo fueron menos sensibilidad frente a la papaína que a las restantes enzimas.

Por su parte, la pediocina (Figura 29), producida en los diferentes medios resultó ser prácticamente inactivada por todas las enzimas proteolíticas ensayadas. Esta elevada sensibilidad a las proteasas, parece ser una característica distintiva de las pediocinas, tal como se recoge en la bibliografía.



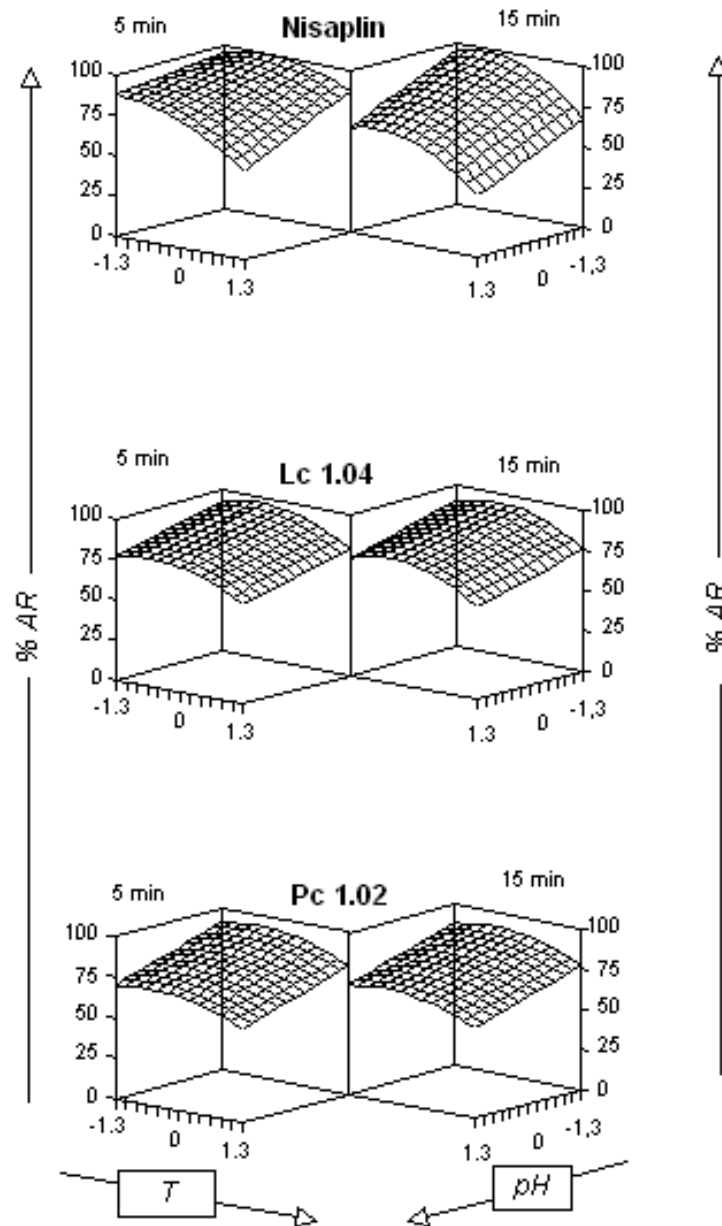


Figura 27. Superficies de respuesta mostrando el efecto de la temperatura y el pH sobre las estabildades del Nisaplin y de la nisina y pediocina producidas por Lc 1.04 y Pc 1.02 sobre medio MRS.

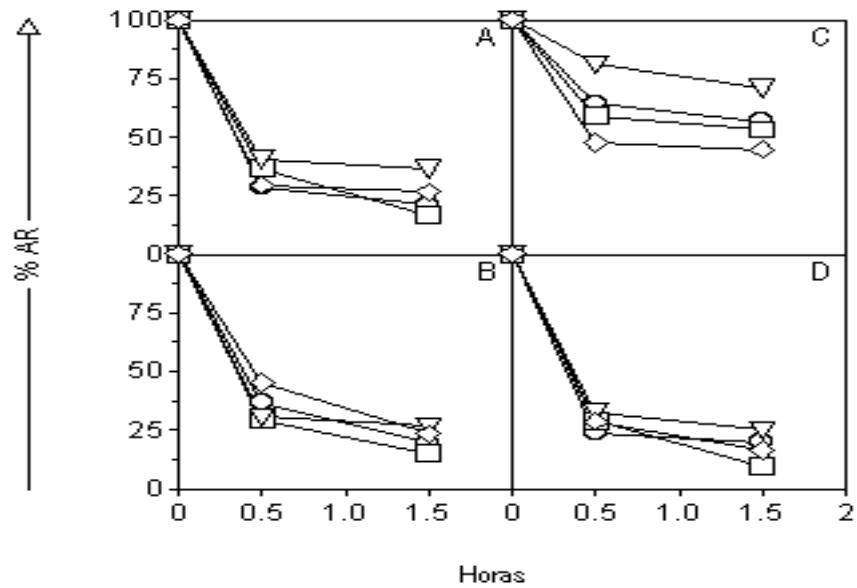


Figura 28: Estabilidad del Nisaplín (€) y de la nisina producida por *Lactococcus lactis* sobre medio MRS (O), sobre medio 0,5 MH (∇) y sobre SLD (◇) frente a las enzimas pepsina (A), subtilisina (B), papaína (C) y tripsina (D).

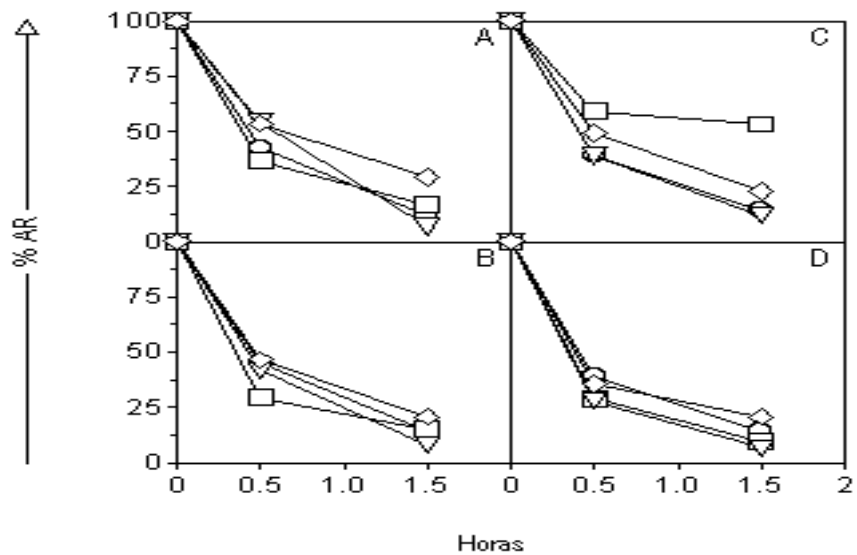


Figura 29: Estabilidad del Nisaplín (€) y de la pediocina producida por *Pediococcus acidilactici* sobre medio MRS (O), sobre medio 0,5 MH (∇) y sobre SLD (◇) frente a las enzimas pepsina (A), subtilisina (B), papaína (C) y tripsina (D).

## **10: Aplicación de las bacteriocinas en el desarrollo de envases activos**

Por diferentes motivos, tanto técnicos, legales como comerciales en ocasiones no es conveniente adicionar las bacteriocinas al alimento durante su formulación. En estos casos puede constituir un recurso adecuado para prolongar la vida útil de los alimentos adicionar la bacteriocina al material en que se envasa o con el que contacta el alimento, de forma que bien por contacto con el alimento o por cesión se reduzca o controle la carga microbiana de los alimentos.

De los diversos procedimientos existentes para fijar bacteriocinas a los materiales de envasado sin duda la adsorción, basado en la ya discutida propiedad de estas proteínas a superficies hidrofóbicas es el de más simple operatoria. Con todo, requiere conocer, para cada material las propiedades y cinéticas de adsorción y con ello la máxima capacidad de carga del material que para cada temperatura viene dado por su isoterma.

Los resultados (Figura 30) de las isotermas de la nisina para varias temperaturas y materiales muestran un diferente comportamiento. Así las correspondientes a un material muy hidrofóbico como el acero inoxidable presentan perfiles de Langmuir con una asíntota definida, mientras que sobre celofán y PET el comportamiento se asimila a un BET con una fase final de ligera desorción.

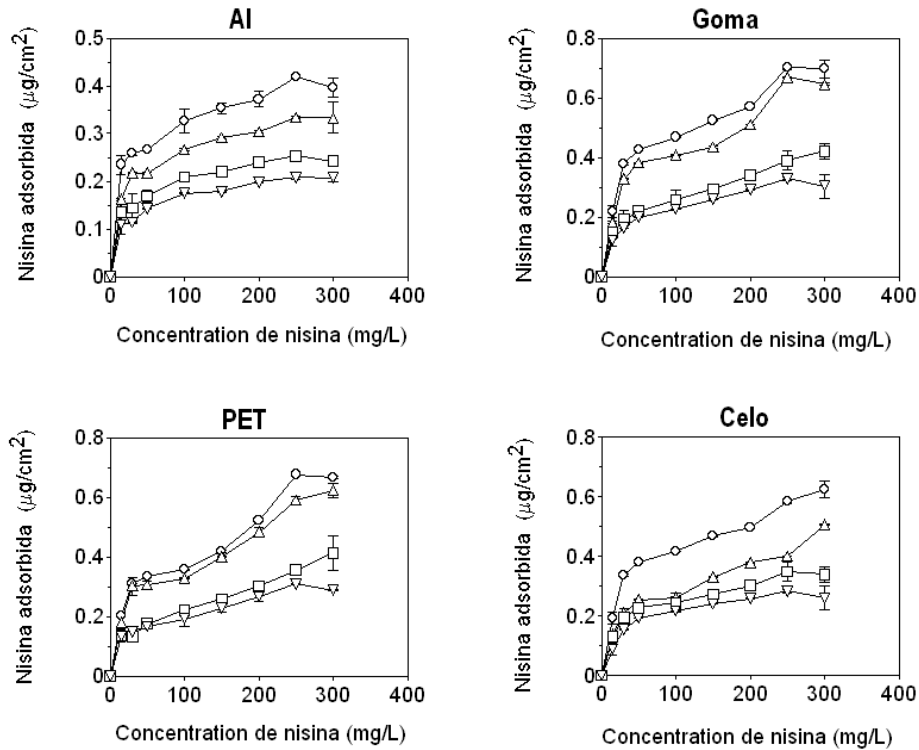


Figura 30: Isothermas de adsorción de la nisina a 8°C ( O ), 25°C ( Δ ), 40°C ( ◻ ) y 60°C ( ∇ ) en superficies comúnmente usadas en la industria alimentaria: acero inoxidable (AI), goma, polietilentereftalato (PET) y celofane (Celo). Se han representado la media de los puntos experimentales (símbolos) con sus correspondientes desviaciones estándar (barras).

La aplicación de estos materiales con nisina adsorbida al envasado de dos alimentos perecederos: carne picada y leche fresca (Figuras 31 A y B), resultó en una reducción de la microflora endógena de ambos productos, mostrando así que la alternativa es adecuada para prolongar la vida útil del producto.

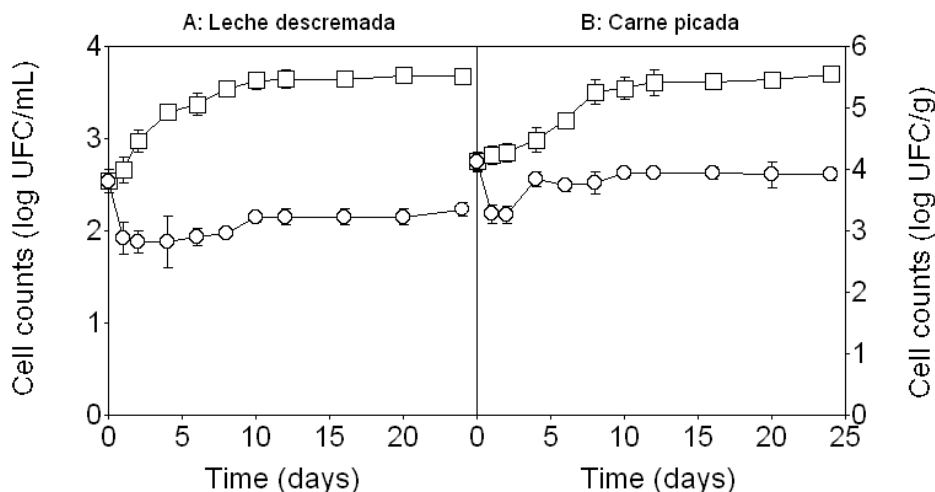


Figura 31 (A): Evolución del conteo de bacterias totales en muestras de leche descremada envasada en botellas de PET tratadas con nisina ( O ) y sin tratar (€). (B): Evolución del conteo de bacterias totales en muestras de carne picada envasada en discos de celofán tratados con nisina ( O ) y sin tratar (€). Se han representado la media de los puntos experimentales (símbolos) con sus correspondientes desviaciones estándar (barras).

## 11: Aplicación de probióticos en la alimentación de lechones

Es práctica habitual en la formulación de piensos para la alimentación animal, el uso de antibióticos, bien con fines terapéuticos y profilácticos para el tratamiento o prevención de determinadas enfermedades infecciosas o bien con fines zootécnicos para incrementar los índices productivos. Sin embargo, ligado a su uso está también la aparición y desarrollo de cepas bacterianas resistentes a este tipo de agentes antimicrobianos (Abe et. al., 1995). Es por esta razón que, en años recientes, se ha incrementado el interés por la utilización de microorganismos probióticos como alternativa al uso de antibióticos (Abe Et. Al., 1995; Esteive Et. Al., 1997; Denli Et. al., 2003). Las bacterias ácido lácticas pueden colonizar transitoriamente el intestino y sobrevivir durante el tránsito intestinal. Además, por su adhesión al epitelio, modifican la respuesta inmune local del hospedador (Schiffrin Et. Al., 1997).

El efecto de los probióticos ha sido probado *in vitro* o *in vivo* en estados patológicos como diarreas, vaginitis, infecciones del tracto urinario,

desordenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia y alergia alimentaria (Mc Farland, 2000; Mombelli B. & Gismondo, 2000).

### **11.1. Supervivencia de las especies Lc 1.04 y Pc 1.02 en los piensos.**

Una de las dificultades en el suministro de bacterias probióticas a los animales es garantizar que éstas se ingieran en un número que asegure un efecto beneficioso. Si bien el modo más simple de obviar esta dificultad consiste en dosificar dosis adecuadas de suspensiones del probiótico a cada individuo (de modo similar a como se hacen las vacunaciones), muchas de estas bacterias no se implantan en el intestino y hacen necesario repetir de forma continua la ingesta de la dosis, volviendo inviable técnicamente tal solución.

En consecuencia, resulta más razonable incorporar las bacterias probióticas a los piensos de alimentación, aún a expensas de que la composición y baja actividad de agua de la matriz resultan a priori inadecuadas para la viabilidad bacteriana. Por ello, esta alternativa operatoria implica que para conocer la ingesta de probiótico de cada animal con el pienso sea necesario evaluar previamente la supervivencia de los microorganismos en piensos durante el almacenamiento de este producto.

Así pues, los piensos elaborados con preparados de las dos especies probióticas (Lc 1.02 y Pc 1.04), fueron conservados en las condiciones habituales de almacenamiento, evaluando la viabilidad de las bacterias lácticas con una periodicidad semanal, por determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC). Como se puede observar (Figura 32), tanto Lc 1.04 como Pc 1.02 mostraron una elevada viabilidad en el tiempo, que supera en ambos casos al 75 % de la población inicial.

Con todo, con vistas a una futura aplicación industrial, sería necesario prolongar la vida útil de los piensos por un periodo superior de tiempo, con el fin de garantizar la funcionalidad del producto durante periodos prolongados de almacenamiento.

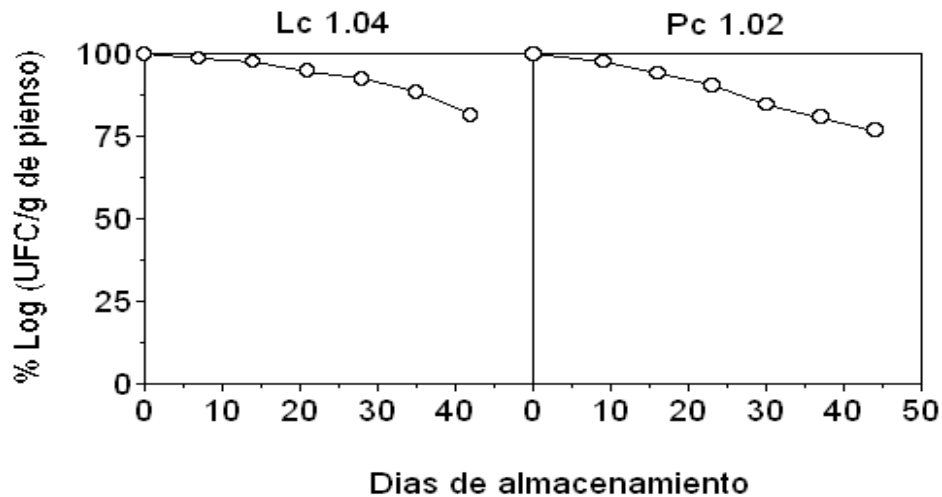


Figura 32: Datos experimentales de las viabilidades de las dos especies probióticas Lc 1.04 y Pc 1.02, en el pienso expresadas como % logaritmo de las unidades formadoras de colonias (% log(UFC)).

## 11.2. Efecto de la alimentación con probióticos sobre la flora intestinal de lechones

En principio cabe esperar que una vez ingerido el pienso probiótico, una proporción de las bacterias logre atravesar viva las barreras químicas y mecánicas de la parte superior del tracto intestinal y alcancen las zonas más distales. De acuerdo con los dos mecanismos de acción principales que se postulan para su acción probiótica, en tales zonas ejercerán exclusión competitiva desplazando a las bacterias perjudiciales allí residentes y estimularán el sistema inmune mejorando el estado de condición de los individuos y los índices productivos.

En consecuencia, la acción probiótica de las bacterias Lc1.04 y Pc 1.02 incorporadas a los piensos se evaluó comparando la evolución de la población de coliformes totales (por ser estos los microorganismos entéricos más abundantes y estar relacionados con desórdenes intestinales) en recto de lechones recién destetados alimentados con 4 tipos de piensos: suplementado con una mezcla de antibióticos, suplementado con el preparado de Lc 1.04, suplementado con el preparado de Pc 1.02 y sin suplemento adicional (control).

Los resultados (Figura 33) muestran que, en todos los casos, se produjo una disminución de la microbiota coliforme con el tiempo que puede

considerarse habitual en los lechones y que, en cualquier caso, no superó el nivel de significación.

Con todo, merece destacar el hecho de que para todos los tiempos de muestreo, la serie tratada con antibiótico fue con la que se obtuvo, una disminución más intensa de los recuentos con respecto al control y a la serie tratadas con Lc 1.04 (Figura 33, parte superior). Sin embargo, los resultados obtenidos parecen confirmar que la presencia de Pc 1.04 en los piensos induce cambios en la evolución del recuento de coliformes similares a los del antibiótico (Figura 33, parte inferior).

### **11.3. Efecto de la alimentación con probióticos sobre los índices productivos de lechones**

Como se muestra en las Figuras 34 A y B, en todos los casos se observó una tendencia al incremento en los pesos promedios de los lechones. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los pesos promedios de los diferentes grupos de lechones, puede notarse que los incrementos en peso fueron ligeramente mayores en los lechones alimentados con los piensos prebióticos (conteniendo Pc 1.02 o Lc 1.04).



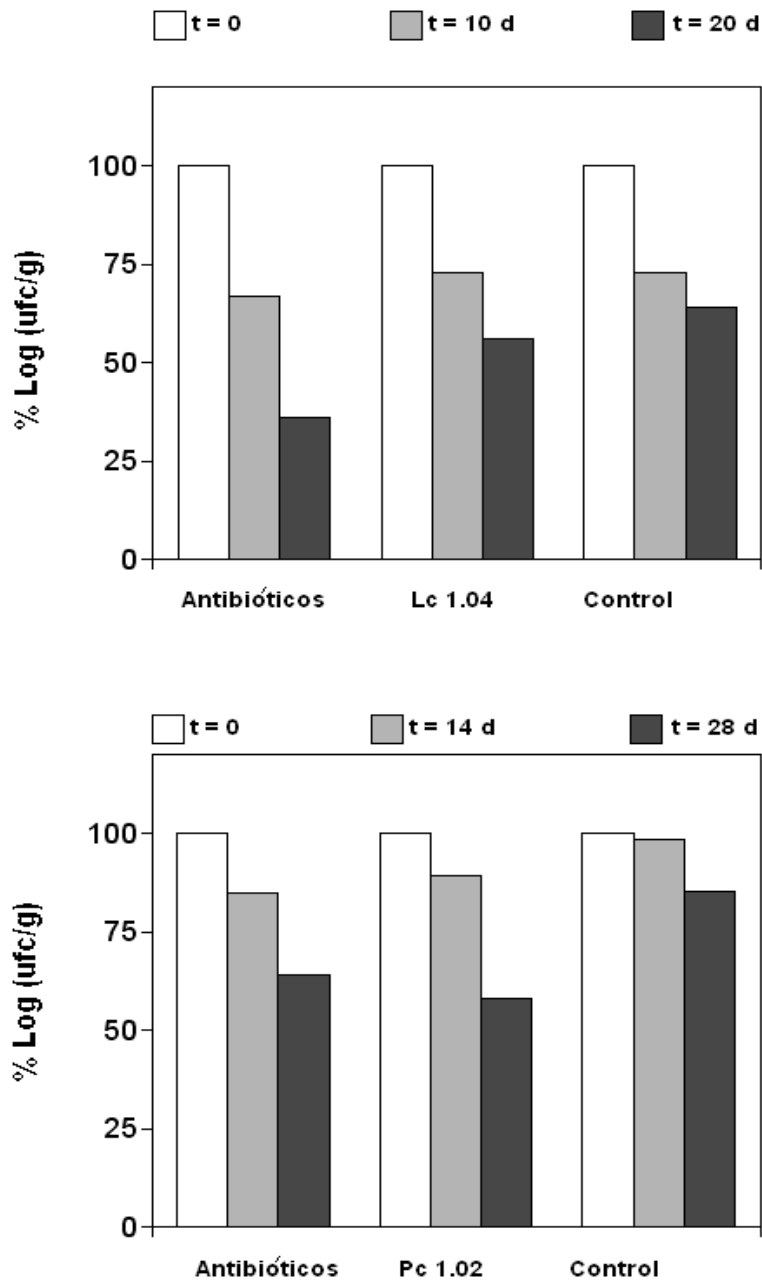


Figura 33: Reducción del contenido de coliformes totales (expresado como % de reducción del log(UFC/g de heces)) en el recto de lechones sometidos a los diferentes tratamientos.

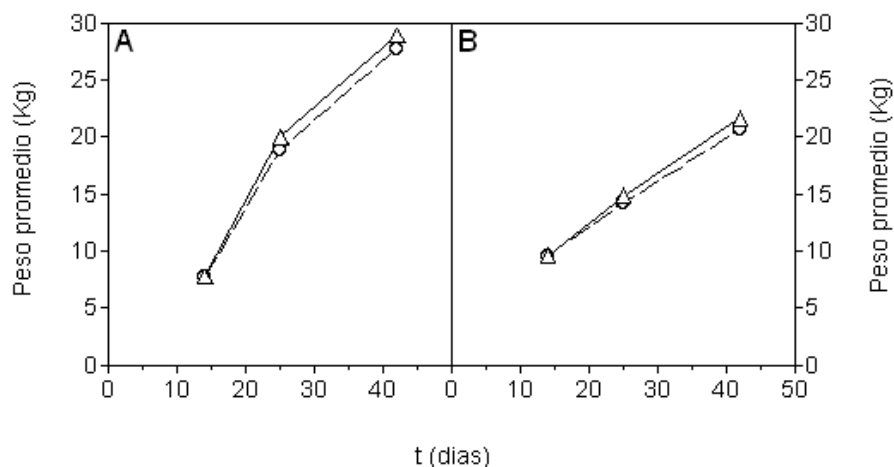


Figura 34 (A): Evolución de los pesos de los lechones alimentados con pienso suplementado con Pc 1.02 (Δ) y no suplementado (control, O ). (B): Evolución de los pesos de los lechones alimentados con pienso suplementado con Lc 1.04 (Δ) y no suplementado (control, O ).

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer las ayudas financieras prestadas por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), (proyecto CAL01-045-C2-2) y la Xunta de Galicia, (proyecto PGIDT00BIO1E). Así mismo, desean agradecer la colaboración prestada por la empresa COREN, S.C.L..

## BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F.; Ishibashi, N.; Shimamura, S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of Dairy Science* **78**, 2838-2846
- Baranova, I.P.; Egorov, N.S. 1969. Effect of the medium composition and cultivation conditions on the *Streptococcus lactis*. Growth and nisin biosynthesis. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* **5**, 175-82.
- Bergey, D.H. 1986. In P.H.A. Sneath, N. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bhugaloo-Vial, P.; Grajek, W.; Dousset, X.; Boyaval, P. 1997. Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors. *Enzyme and Microbiology Technology* **21**, 450-57.

- Bhunja, A.K.; Johnson, M.C.; Ray, B.; Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 25-33.
- Daeschel, M.A.; Mcguire, J.; Al-Makhlafi, H. 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of Food Protection* **55**, 731-735.
- Davies, E.A.; Bevis, H.E.; Delves-Broughton, J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **24**, 343-346.
- De Vuyst, L. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 28-33.
- De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology* **138**, 571-578.
- De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**, 17-22.
- De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. 1994a. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. In L. De Vuyst & E.J. Vandamme (eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London.
- De Vuyst, L.; Vandamme, E.J. 1994b. Nisin, a lanthibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications, pp. 151-221. In L. De Vuyst & E.J. Vandamme (eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London.
- Denli, M.; Okan, F.; Çelik, K. 2003. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal of Nutrition* **2**, 89-91.
- Einarsson, H.; Lauzon, H.L. 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 669-676.
- Esteive, G.E.; Brufau, J.; Perez, V.A.M.A.K. 1997. Bioefficacy of enzyme preparations containing beta-glucanase and xylanase activities in broiler diets based on barley or heat, in combination with flavomycin. *Poultry Science* **76**, 1728-1737.
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics, pp 1-8. In R. Fuller (ed.) *Probiotics, the scientific basis*. Chapman & Hall, London.
- González, M.I.G. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* **57**, 1-11.
- Guerra, N.P.; Pastrana, L. 2002. Production of bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 and *Pediococcus acidilactici* NRRLB-5627 using mussel-processing wastes. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **36**, 119-125.
- Isolauri, E.; Salminen, E.; Salminen, S. 1998. Lactic acid bacteria and immune modulation, pp 255-268. In S. Salminen & A. von Wright (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker Inc., New York.

- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-349.
- López, M. 1998. Nisina: producción y aplicación a la conservación en pescado refrigerado. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Luedeking, R.; Piret, E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical Microbiology and Technology Engineering* **1**, 393-412.
- Mc Farland, L.V. 2000. Beneficial microbes. Health or hazard?. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* **12**, 1069-1071.
- Mombelli, B.; Gismondo, M.R. 2000. The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* **16**, 531-536.
- Mishra, C.; Lambert, J. 1996. Production of antimicrobial substances by probiotics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **5**, 20-24.
- Paik, H.D.; Glatz, B.A. 1997. Enhanced bacteriocin production by *Propionibacterium thoenii* in fed-batch fermentation. *Journal of Food Protection* **60**, 1529-1533.
- Parente, E.; Brienza, C.; Ricciardi, A.; Addario, G. 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC 1146 in batch and continuous culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **18**, 62-67.
- Parente, E.; Hill C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **73**, 290-298.
- Pastrana, L.M. 1991. Producción de ácido giberélico a partir de los efluentes de la industria mejillonera en cultivo sumergido y en estado sólido. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Pastrana, L.M.; González, M.P.; Murado, M.A. 1993. Production of gibberellic acid from mussel processing wastes in submerged batch culture. *Bioresource Technology* **45**, 213-221.
- Pintado, J. 1995. Producción de ácido cítrico a partir de efluentes del procesado de mejillón. Modalidades de cultivo y criterios de optimización. Tesis Doctoral. Instituto de Investigaciones Marinas.
- Pintado, J.; Torrado, A.; Mirón, J.; Montemayor, M.I.; González, M.P.; Murado, M.A.; Sanromán, A. 1994. Citric acid production from mussel processing wastes in solid state culture. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige Universiteit Gent* **59**, 2429-2437.
- Schiffirin, E.J.; Brassart, D.; Servin, A.L.; Rochat, F.; Donnet-Hughes, A. 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition* **66**, 515S-520S.
- Schillinger, U.; Geisen, R.; Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology* **7**, 158-64.
- Soomro, A.H.; Masud, T.; Anwaar, K. 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – A review. *Pakistan Journal of Food Nutrition* **1**, 20-24.
- Taylor, S.L.; Somers, E.B.; Krueger, L.A. 1984. Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *Journal of Food Protection* **48**, 234-239.
- Thomke, S.; Elwinger, K. 1998. Growth promotants in feeding pigs and poultry. III. Alternatives to antibiotic growth promotants. *Annals of Zootechnie* **47**, 245-271.

- Toba, T.; Yoshioka, E.; Itoh T. 1991. Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Letters in Applied Microbiology* **12**, 106-08.
- Torrado, A.; González, M.P.; Murado, M.A. 1998. pH regulation in solid state culture through the initial ratio between oxidized and reduced sources of nitrogen. A model applicable to the amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology Technology* **12**, 411-415.
- Vermeiren, L.; Devlieghere, F.M.; van Beest, De Kruijf, N.; Debevere, J. 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology* **10**, 77-86.
- Vignolo, G.M.; Kairuz, M.N.; Ruiz-Holgado, A.A.P.; Oliver, G. 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 5-10.
- Yang, R.; Johnson M.C.; Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3355-3359.

## Capítulo 7

### **Materiales plásticos en contacto con alimentos: desarrollo de métodos analíticos y estudios de cinética de migración**

*Food contact plastic materials: development of analytical methods and study of migration kinetics*

**Sanches-Silva Ana Teresa; Sendón-García Raquel;  
Paseiro Losada Perfecto**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,  
Facultad de Farmacia,  
Universidad de Santiago de Compostela, España  
Email: ana.teresasilva@clix.pt

# **MATERIALES PLÁSTICOS EN CONTACTO CON ALIMENTOS: DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y ESTUDIOS DE CINÉTICA DE MIGRACIÓN**

## **Resumen**

Cada día consumimos productos alimenticios que han estado en contacto con muchos tipos distintos de materiales de envasado. Todas las sustancias que son utilizadas en la fabricación de estos materiales, pueden representar un riesgo para el consumidor, ya que pueden migrar al alimento. Dentro de este contexto la Unión Europea ha financiado el proyecto “Foodmigrosure” para así poder establecer un modelo de migración de los plásticos a los alimentos de cara a estimar la exposición del consumidor a estas sustancias químicas. Formando parte de este proyecto, el presente trabajo describe los principales pasos y dificultades analíticas del proceso de optimización del método de determinación de un migrante modelo, así como los estudios de cinética de migración que tienen por objetivo obtener los valores de migración de cada sustancia para un rango de tiempo y temperaturas de exposición. Además las sustancias seleccionadas presentan un rango bastante amplio de características fisico-químicas, lo que también va a permitir predecir el comportamiento de otras sustancias con propiedades similares.

# **FOOD CONTACT PLASTIC MATERIALS: DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS AND STUDY OF MIGRATION KINETICS**

## **Abstract**

Every day we consumed nutritional products that have been in contact with many different types of packaging materials. All the substances that are used in the manufacture of these materials can represent a risk for the consumer, since they can migrate to the food. Within this context the European Union has financed the project "Foodmigrosure" thus to be able to establish a model of migration of plastics to foods considering the exhibition of the consumer to these chemical substances. As part of this project, the present work describes the main steps and analytical difficulties of the process of optimization of the method for the determination of a model migrant as well as the kinetic studies of migration that they have by goal to obtain the values of migration of each substance in a wide rank of physical-chemical characteristics, which also is going to allow to predict the behaviour of other substances with similar properties.



## 1- INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se ha producido un profundo cambio en los estilos de vida. Actualmente el consumidor ejerce una demanda creciente y selectiva, estando preocupado por cuestiones tales como: la seguridad de los alimentos, la nutrición, los aditivos y el etiquetado del producto. La búsqueda de productos de alta calidad ha promovido un importante crecimiento en el sector del envasado alimentario.

Dentro de este contexto, el envasado de los alimentos es una técnica fundamental para conservar la calidad de los alimentos, reducir al mínimo su deterioro y limitar el uso de aditivos. Los materiales destinados a entrar en contacto con los alimentos (Food Contact Materials, FCM), como los plásticos, cumplen diversas funciones de gran importancia: contienen los alimentos, protegen del deterioro químico y físico, y proporcionan un medio práctico para informar a los consumidores sobre los productos. Asimismo, el envase preserva la forma y la textura del alimento que contiene, evita que pierda sabor o aroma, prolonga el tiempo de almacenamiento y regula el contenido de agua o humedad del alimento. En algunos casos, el material seleccionado puede llegar incluso a mejorar la calidad nutricional del producto.

Sin embargo hay una característica muy importante, y que se debe exigir a todos los envases, y es que no se produzcan interacciones con el contenido del mismo. Las modernas técnicas de envasado, con la utilización de nuevos materiales han solucionado muchos problemas de higiene pero plantean otros nuevos. Hay que asegurarse de que los materiales utilizados no sean tóxicos o susceptibles de interactuar con los alimentos que van a contener.

Cada día consumimos productos alimenticios que han estado en contacto con muchos tipos distintos de materiales de envasado. Todas las sustancias que son utilizadas en la fabricación de estos materiales, pueden representar un riesgo para el consumidor, ya que pueden migrar al alimento. Por esto, un importante aspecto relacionado con la salud pública que preocupa a la Unión Europea es la exposición del consumidor a sustancias químicas indeseables en la dieta.

Para caracterizar el fenómeno de la migración se distingue por un lado la migración global, que se refiere a la suma de todos los componentes del envase que se transfieren al alimento y por otro la migración específica, que representa la cantidad de una sustancia concreta e identificable presente en el material que se transfiere al alimento bajo ciertas condiciones.

Por este motivo en la Unión Europea, existe legislación de obligado cumplimiento, que define los límites máximos de migración global y migración

específica, para envases plásticos en contacto con alimentos (European Communities, 2003). Las investigaciones científicas relacionadas con la migración potencial y con el comportamiento de los materiales de envasado han demostrado que la difusión y la migración pueden ser fenómenos previsibles y en principio descritos matemáticamente. Sin embargo la escasa información relativa al comportamiento de muchas sustancias potencialmente migrantes y la creciente importancia que tienen los temas de seguridad alimentaria ha suscitado el interés de la Unión Europea por el tema de los materiales plásticos en contacto con alimentos. Entre los proyectos que la Unión Europea ha financiado relativos a este tema está el “Foodmigrosure”, el cual está, actualmente, siendo desarrollado en varios centros europeos de investigación. El principal objetivo de este proyecto es proporcionar una herramienta novedosa y económica para la estimación de la exposición del consumidor a sustancias migrantes que provengan de los materiales en contacto con alimentos. Esta herramienta está basada en un modelo de migración físico-química que describe matemáticamente los procesos de migración desde los plásticos a alimentos reales bajo cualquier condición de contacto previsible.

## **2- DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS Y ESTUDIO DE CINETICAS DE MIGRACIÓN**

Dentro del plan de trabajo que establece el proyecto europeo “Foodmigrosure”, existen tres secciones principales. La primera incluye la definición y selección de materiales plásticos objeto de estudio, sustancias modelo y alimentos representativos de cada grupo; la segunda es relativa al trabajo de investigación experimental que está enfocado a obtener los datos físico-químicos de los migrantes modelo seleccionados; por ultimo, la tercera, pretende hacer una evaluación multidisciplinar e interactiva así como ejecutar el trabajo. A su vez, cada sección presenta varios módulos (“workpackages”). A continuación se describe el trabajo que fue desarrollado por la USC en el ámbito de este proyecto, que hasta estos momentos está principalmente centrado en la sección 2.

### 2.1- Estudio de los parámetros físico-químicos (Módulo 3)

Incluidos en la sección 2 del plan de trabajo del proyecto existen dos módulos diferenciados. En el módulo que la USC ha trabajado se diferencian tres partes que son:

- 3a: Desarrollo de métodos analíticos y diseño experimental para 3b & 3c.
- 3b: Estudios de cinética de migración desde filmes plásticos a alimentos.
- 3c: Estudios de procesos de transporte y partición de los migrantes modelo en los alimentos.

Actualmente el módulo 3c está todavía en fase de desarrollo.

#### 2.1.1- Desarrollo de métodos analíticos y diseño experimental para 3b & 3c (Módulo 3a)

Integrada en la primera parte del módulo 3 (3a), se ha realizado una extensa revisión bibliográfica de las propiedades físicas y químicas de los migrantes seleccionados. Debido a que muchos de estos datos estaban incompletos, algunas de estas propiedades fueron evaluadas en nuestro laboratorio.

En la figura 1 se muestra un fragmento de la tabla resumen elaborada, en la que, para cada sustancia se muestran los diferentes datos y las propiedades disponibles como el número CAS, la fórmula, nombre químico, peso molecular, punto de fusión y ebullición, solubilidad en agua y en varios solventes, estructura química, aplicabilidad, coeficiente de reparto y propiedades espectrales.

Annex I. Chemical and physical information of the model migrants





No	MIGRANT	Ref. IT/ CAS IT	Formula	Chemical Name	MW	mp (°C)	bp/Bp (°C)	Water solubility mg/L	Log K <sub>ow</sub>	Solubility	Application	Structure	Special Data
1	Hexamethyl- ZML = 4 mg/kg	4320 1001-79-1	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	Hexamethyl- sial 3,5-bis(1,1- dimethyl-2-hydroxy- ethyl)- acetate	204	58-55	-073	< 0.01	13.41	g/100 mL solvent: Acetone: 19 Benzene: 17 Chloroform: 17 Cyclohexane: 10 Ethanol: 1.5 Hexane: 0.2 Methanol: 0.4 Toluene: 0 Water: < 0.01	Anticorrosion Resistant Adhesive		
2	DPBD	130-01-0	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub>	Dibenzobenzene	204	113	310-6	0.1-1.2	5.29	Very soluble in Benzene, chloroform and acetone	Fluorescent additive		UV max: 310 nm (9.8e7) Fl. Ex: 320, Em: max: 375 (4e6)
3	Chrysanthemol ZML = 4 mg/kg	41400 1081-01-4	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	2-Hydroxy-4- methyl- benzophenone	204	40-49	+400-200	< 0.01	4.94	g/100 mL solvent: Acetone: 43 Benzene: 72 Chloroform: 41 Ethanol: 1.7 Ethyl acetate: 44 Hexane: 12 Methanol: 1.7 MEK: 4.7 Methyl acetate: 47 Toluene: < 0 Water: < 0.01	UV absorber additive		UV max: 290, 343 nm (6.0e6) Fl. Ex: 360 235 (100) 214 (39), 237 (25), 257 (24), 272 (19), 287 (14), 313 (11), 370 (10), 411 (10), 437 (7)
4	Uranol OB ZML = 0.4 mg/kg	33740 7130-44-1	C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2,5-bis(5-oxo- pentyl-2- benzenesulfonyl) benzene	431	104-103	-7-110	< 0.01	0.41	g/100 mL solvent: Acetone: 0.2 Benzene: 2 DMF: 0.2 Ethanol: 0.1 Ethyl acetate: 1 Hexane: 11 Methanol: 0.05 MEK: 1 Toluene: 1 UF: 5 UF: 5 UF: 5 Water: < 0.01	UV absorber Optical brightener, Fluorescent additive		Fl. Ex max: 375, Em max: 435 nm

Figura 1: Extracto de la tabla resumen de las propiedades físico-químicas de los migrantes modelo.

A continuación, se revisó la literatura teniendo en cuenta los métodos analíticos en polímeros, simulantes y alimentos, de manera que se obtuviese una revisión con todos los métodos disponibles para cada migrante (figura 2). Los resultados del estudio permiten concluir que la literatura, con relación a este tema, es escasa y que da más énfasis al contenido total del migrante en polímeros y a la migración en simulantes que a la migración en alimentos. Además, los métodos analíticos disponibles están aun en fase de desarrollo, no habiendo por eso métodos que hayan obtenido una aprobación universal. Por ultimo, se verificó que algunos de los protocolos encontrados en la literatura no están descritos con suficiente detalle de forma que permitan su repetición en otros laboratorios. Esta es una situación común cuando una metodología analítica se encuentra en su estado embrionario de desarrollo. En conclusión, actualmente, no están disponibles, protocolos analíticos para la determinación de gran mayoría de los migrantes potenciales.

Annex II. Abstract of the revised literature on analytical methods of the model migrants

Substance	Sample preparation	Analysis conditions	References
<b>Irganox 1076</b> Antioxidant	<p><b>Migration:</b></p> <p>1- Polymer film (38.5 cm<sup>2</sup>) was put into contact with 20 mL of solvent in a migration cell.</p> <p>2- Cells were incubated under gentle shaking (55 rpm) in a water-bath of 40°C.</p> <p>Solvents used:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ethanol</li> <li>- isooctane</li> <li>- ethyl acetate</li> <li>- 2-propanol</li> <li>- cyclohexane</li> <li>- dichloromethane</li> <li>- olive oil</li> <li>- triglycidin (octanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester)</li> <li>- tributyrin (butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester)</li> </ul> <p>3-a) 40µL of sample were added to 5µL of internal standard solution (mg/mL in 2-propanol). And then analysed by <b>GC-FID</b></p> <p>b) With triglycerides (tributyrin, triglycidin and olive oil), 40µL of sample was added to 5µL of internal standard and then diluted with 160µL of acetone and analysed by <b>HPLC</b>.</p> <p><b>Analysis of aqueous simulants:</b></p> <p>Simulants (3% w/v acetic acid, 15% v/v ethanol) were analysed directly.</p> <p>Calibration solutions range from 0.5 to 20 µg/mL.</p>	<p><b>GC-FID</b></p> <p><b>Equipment:</b> Fisons GC 8000 series</p> <p><b>Column:</b> DB5-MS, 15m x 0.25mm i.d., 0.1µm thickness</p> <p><b>Retention gap:</b> 0.5m x 0.53 mm i.d. deactivated with a thin film of OV-1701-OH.</p> <p><b>Carrier gas:</b> helium</p> <p><b>Flow rate:</b> 1.8 mL/min</p> <p><b>Injection mode:</b> on column</p> <p><b>Injected volume:</b> 1µL</p> <p><b>Oven program:</b> started 1°C under the boiling point of the solvent, 15°C/min to 150°C, 10°C/min to 310°C, 1min at 310°C.</p> <p><b>Detector:</b> FID</p> <p><b>Detector temperature:</b> 315°C</p> <p><b>HPLC-F</b> (for triglycerides analysis)</p> <p><b>Equipment:</b> Waters Alliance 2690 with a Waters 474 fluorescence detector</p> <p><b>Column:</b> Xtra RP18, 150mm x 4.6 mm i.d. (particle size, 5µm)</p> <p><math>\lambda_{\text{excitation}} = 282 \text{ nm}</math>; <math>\lambda_{\text{emission}} = 308 \text{ nm}</math></p> <p><b>Volume injected:</b> 10µL</p> <p><b>Mobile phase:</b> Linear concentration gradient water/acetonitrile (2/8 v/v) to water/acetonitrile (1/19 v/v), after 5 min, 100% acetonitrile.</p> <p><b>HPLC</b></p> <p><b>Column:</b> Hypersil 5 ODS</p> <p><b>Mobile phase:</b> tetrahydrofuran/ acetonitrile (20:80)</p> <p><b>Flow rate:</b> 1.5 mL/min</p> <p><b>Detector:</b> ultraviolet</p> <p><b>Sample volume:</b> 20µL</p> <p><math>\lambda = 275 \text{ nm}</math></p> <p><b>Internal standard:</b> Irganox 1010</p>	<p>Heinroth, I.E. et al, <b>Food Additives and Contaminants</b>, 2002, 19 (2), 176-185.</p> <p>O'Brien, A.P. et al, <b>Food Additives and Contaminants</b>, 1997, 14 (6-7), 705-719.</p>

Figura 2: Extracto de la tabla resumen de los métodos para análisis de los migrantes modelo.

Se realizaron varios estudios preliminares para conocer propiedades importantes que permitiesen evaluar la mejor estrategia para resolver los problemas analíticos. Estos incluyen, por ejemplo, el estudio de las propiedades ultravioleta, fluorescentes, espectroscopia de masas y la investigación de la posibilidad de utilización de la cromatografía gaseosa. Un extracto de la tabla resumen de estas propiedades se muestra en la figura 3.

Como resultado de este trabajo, fue posible resumir en una tabla (fig. 4) las recomendaciones generales para el análisis de los modelos migrantes en los alimentos. En este primer abordaje, se dio especial atención al tipo de solvente más indicado para el proceso de extracción y a la técnica analítica más apropiada para la determinación de los migrantes en las matrices alimentarias.

No.	MODEL MIGRANT	Spectroscopic Properties				GC-FID MS/MS	Essencing fraction in organic phase after 1 extraction with equal volume of olive oil
		Fluorescence	Ultraviolet	ME-APCI	ME-APCI		
1	Ugones 1076		$\lambda_{max}(\epsilon): 204 (33400), 218 (10400), 273 (4000)$	475, 419, 147			
2	DPBD	$\lambda_{ex}: 330$ $\lambda_{em}: 375$	$\lambda_{max}(\epsilon): 204 (47000), 232 (47000), 315 (92200), 325 (107900), 344 (49400)$			Yes	0.32
3	Chrysosol 61		$\lambda_{max}(\epsilon): 204 (23700), 243 (13000), 358 (14400), 374 (11100)$	327, 439			0.18
4	Uykon OB	$\lambda_{ex}: 374$ $\lambda_{em}: 432$	$\lambda_{max}(\epsilon): 207 (41400), 243 (12100), 355 (42100), 373 (47300)$	431		Yes	0.34
5	Corroboran		$\lambda_{max}(\epsilon): 204 (5900), 224 (2200)$	114		Yes	
6	Benzophenone		$\lambda_{max}(\epsilon): 205 (27100), 251 (15900)$	103, 105		Yes	0.58
7	Diphenyl Ethylene		$\lambda_{max}(\epsilon): 204 (45000), 227 (17100)$	225, 149, 319, 177	144, 121, 148, 149		0.87
8	DEHA			129, 147, 241, 259, 113, 371		Yes	
9	Styrene	$\lambda_{ex}: 270$ $\lambda_{em}: 305$	$\lambda_{max}(\epsilon): 205 (14000), 247 (15000)$			Yes	0.53
10	Biphenyl A	$\lambda_{ex}: 280$ $\lambda_{em}: 307$	$\lambda_{max}(\epsilon): 207 (35000), 227 (32900), 278 (9000)$		227		
11	1-Octene		$\lambda_{max}(\epsilon): 205 (9500), 222 (4200), 274 (1100)$			Yes	
12	Linoleone		$\lambda_{max}(\epsilon): 204 (9700)$			Yes	

Figura 3: Extracto de la tabla resumen de los ensayos preliminares para evaluar diferentes de los migrantes.

A continuación, se han desarrollado varios métodos analíticos que permiten una determinación cuantitativa de las sustancias modelo elegidas (migrantes) en los alimentos seleccionados, métodos éstos que tienen que cumplir unos criterios mínimos de aceptación. Estos criterios son los siguientes: los límites de detección deben estar en el rango 10 a 30  $\mu\text{g}$  migrante/ Kg alimento; las curvas de calibración deben presentar buena linealidad (como mínimo  $r^2 > 0,99$ ); los datos de los métodos deben ser precisos (la variación en la repetibilidad no debe ser superior a un 20%); la recuperación debe estar en el rango 60-140% cuando los migrantes se encuentran en los alimentos a niveles inferiores de 0,1 mg/Kg y en el rango 80-120% cuando están en niveles superiores a 0,1 mg/Kg. En los ensayos a lo largo del tiempo las sustancias deben presentar una estabilidad mínima de 80%. Con base a esto, cada laboratorio optó por una estrategia analítica teniendo en cuenta sus recursos físicos y humanos.

Model migrant n°	Compounds	Type of food	Sample Preparation	Analysis procedure
1	Irganox 1076	Non fatty	Extraction with weakly or non polar solvents and concentration step. Solvent change if HPLC is used (***) Extraction/dilution with polar solvents (*)	GC-FID or MS (***) Column type DB5, with medium to high phase ratio (β), on column or splitless injection mode
		Fatty	Extraction with weakly non polar solvents followed by SEC-GPC clean up and concentration step. Solvent change if HPLC is used (***) Extraction with polar solvents not miscible with fat (*)	HPLC-UV or APCI (+) (***) Column type C8 is better than a C18. Mobile phase: acetonitrile, Detection at. λ = 205 or 218 nm by UV and 475 (m/z) by MS
2	DPDB	Non fatty	Extraction with polar to non polar solvents (**)	HPLC-UV or FL (***) Column type C18. Mobile phase: acetonitrile, Detection at. λ = 328 nm by UV and, λ <sub>exc</sub> = 330 nm, λ <sub>em</sub> = 375 nm by fluorescence
		Fatty	Extraction with polar solvents not miscible with fat (**)	
3	Chinassorb 61	Non fatty	Extraction with weakly or non polar solvents and concentration step. Solvent change if HPLC is used (***) Extraction/dilution with polar solvents (*)	HPLC-UV or APCI (+) (***) Column type C18. Mobile phase: acetonitrile/water, Detection at. λ = 288 nm by UV and 327 (m/z) by MS
		Fatty	Extraction with weakly non polar solvents followed by SEC-GPC clean up and concentration step. Solvent change if HPLC is used (***) Extraction with polar solvents not miscible with fat (*)	GC-FID or MS (*) Column type polar, with medium to high phase ratio (β), on column or splitless injection mode

Figura 4: Extracto de la tabla con las recomendaciones la determinación analítica de las sustancias migrantes.

En el laboratorio de la USC se desarrollaron los métodos analíticos para la determinación cuantitativa de triclosan, difenilbutadieno y BHT. El difenilbutadieno es un absorbedor de la luz ultravioleta, el triclosan es un agente antibacteriano y el BHT es un conocido antioxidante. En el proceso de optimización del método, el triclosan y el difenilbutadieno presentaron distinta problemática que el BHT debido a sus características físico-químicas. Los métodos elegidos para cada sustancia fueron desarrollados y validados con éxito en tres alimentos seleccionados.

Los tres alimentos seleccionados fueron elegidos por representar un amplio rango de complejidad que puede aparecer en las diferentes matrices alimentarias: zumo de naranja (alimento acuoso, ácido y con contenido moderado en carbohidratos), pechuga de pollo (alimento sólido con elevado contenido en proteínas) y queso Gouda (alimento sólido con elevado contenido en lípidos). Con ellos se evaluaron diferentes métodos de extracción y además, otros alimentos también se testaron para evaluar posibles interferencias (compota de manzana, leche UHT, ketchup, cola, margarina, leche condensada, chocolate negro, pan tostado, harina integral, arroz y miel). La figura 5 esquematiza algunos de los ensayos realizados.

Annex VI. Extraction Procedures Assays

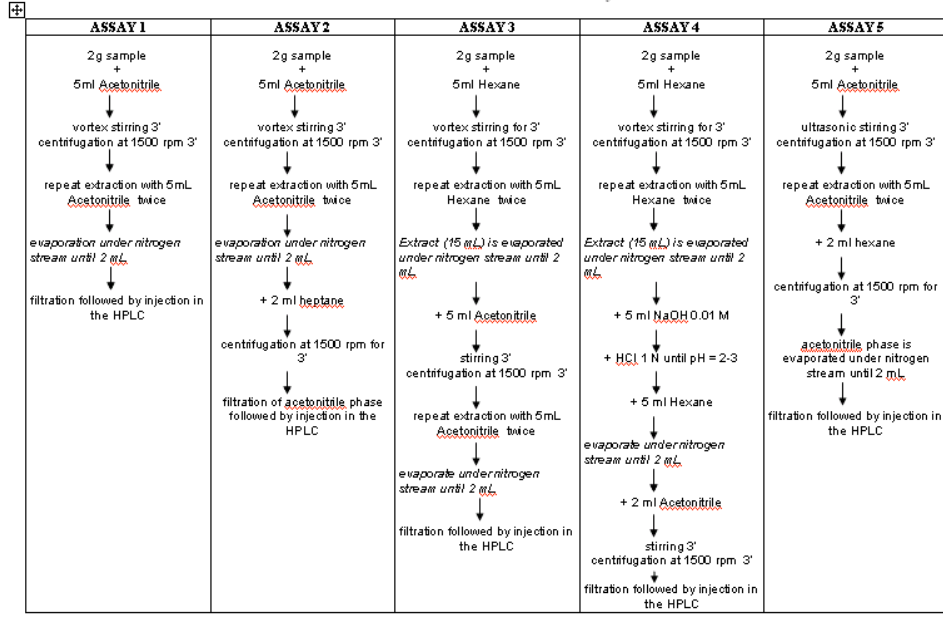


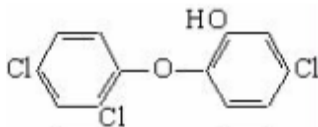
Figura 5: Algunos de los ensayos realizados para la optimización del procedimiento de extracción.

Tomando como ejemplo el triclosan, a continuación se describen los pasos requeridos hasta la obtención de su protocolo analítico y para la validación del método de determinación.

### 2.1.1- Triclosan

El triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol) (fig.6), de peso molecular 289,55, es un polvo cristalino, soluble en muchos solventes orgánicos, con baja solubilidad en agua (10 mg/L) y con elevada lipofilidad (log KoW (octanol-agua) = 4,76). Durante las ultimas tres décadas ha sido utilizado como antimicrobiano y antifúngico de largo espectro y fue incorporado en diversos productos de higiene personal (Slater-Radosti et al., 2001).





**Figura 6: Estructura química del triclosan**

Como aditivo en plásticos previene el crecimiento de microorganismos, evitando la formación de malos olores permitiendo así extender la vida útil del alimento. Por este motivo, se consideró la posibilidad de incluirlo en los materiales poliméricos en contacto con los alimentos (Cutter, 1999).

Los agentes antimicrobianos incorporados en los filmes plásticos (que incluyen, por ejemplo, ácidos orgánicos y ésteres, enzimas y bacteriocinas) no deben originar ninguna alteración en el sabor del alimento o ser desactivados por los constituyentes de los alimentos. Asimismo, deben presentar una migración controlada y una baja concentración inhibitoria mínima. Hasta la actualidad, estos aún no fueron legislados en la Unión Europea..

Dada su representatividad en cuanto a sus características fisicoquímicas, es posible extrapolar los resultados obtenidos con el triclosan a otras sustancias de características similares considerando su uso en materiales en contacto con alimentos y su comportamiento analítico.

Se llevaron a cabo varios ensayos para optimizar el procedimiento de preparación de la muestra y las condiciones cromatográficas. Dependiendo de la composición de la matriz, el proceso de extracción de la muestra varía. Los alimentos con alto contenido en lípidos, como el queso Gouda, requieren un método más extenso de preparación de la muestra.

Para optimizar el método, se testaron diferentes cantidades de muestra, tipos de homogenización y distintos solventes. El hexano fue el elegido como solvente de extracción y para mejorar la recuperación, el volumen de solvente y el número de extracciones también fueron optimizados. También se testó la agitación con vortex y ultrasonidos, pero los resultados obtenidos fueron mejores con agitación manual o agitación mediante un agitador automático.

Con relación a la optimización de las condiciones cromatográficas, se tuvo en cuenta la fase móvil, flujo y temperatura de la columna. Las condiciones óptimas para conseguir una buena resolución se obtuvieron utilizando un gradiente de fase móvil que empieza con 65%/35% acetonitrilo/agua, usando un flujo de 1 mL/min y termostatazando la columna a

30°C. Las longitudes de onda usadas para determinar el triclosan fueron seleccionadas basándose en los picos de absorción máxima.

Con relación a la validación del método, las curvas de calibración presentaron óptima linealidad en el rango de 0,1-10 µg/mL como evidencia el excelente coeficiente de correlación ( $r > 0,9999$ ).

El límite de detección (definido como tres veces la relación señal ruido) fue de 25 mg/mL. Las recuperaciones, determinadas en base a 6 determinaciones para cada muestra, fueron satisfactorias (83-112%).

En conclusión el método que se acaba de exponer es adecuado a la determinación de triclosan en alimentos en el rango 0,1-10 mg/Kg ya que satisface los requisitos mínimos exigidos por el proyecto.

### 2.1.2- Estudios de cinética de migración desde filmes plásticos a alimentos (Módulo 3b).

Esta sección tiene como objetivo establecer los parámetros físico-químicos (difusión en alimentos,  $D_f$ , partición plástico/alimento  $K_{p/f}$ ) de los ensayos de migración y de las cinéticas utilizando los materiales plásticos de referencia seleccionados en el módulo 1. Además también se intenta lograr, a partir de los resultados, un mayor entendimiento de estos mecanismos y evaluar qué propiedades físico-químicas de los alimentos influyen más en los procesos de transporte molecular de los constituyentes del envase hacia (desde el material) y en (en el interior) los alimentos.

La finalidad de la determinación de las cinéticas de migración es originar una situación en la que los coeficientes de difusión en el plástico sean mucho más elevados que en el alimento (esto significa que la difusión en el alimento sea el parámetro que limita la velocidad del mecanismo). Por lo tanto deben ser seleccionadas, al menos poliolefinas como materiales test, ya que estos son los que presentan relativamente los valores más elevados de coeficientes de difusión, representando así el peor contexto posible.

Los alimentos son analizados tras el contacto con los plásticos que contienen las sustancias de estudio. Teniendo en consideración el número de materiales y de alimentos seleccionados, y tomando la temperatura a la que se realizan los ensayos como un parámetro variable adicional, es posible obtener una curva de cinética. Los tiempos y temperaturas a los que son realizados los ensayos simulan las condiciones reales (ensayos reales) así como las peores condiciones a que pueden ser expuestos (ensayos acelerados) los alimentos durante el almacenamiento. El objetivo final es conseguir una ecuación que permita extrapolar los valores de migración de

cada sustancia para un rango de tiempos y temperaturas de exposición. Además las sustancias seleccionadas presentan asimismo, un rango bastante amplio de características físico-químicas, lo que también permite predecir el comportamiento de otras sustancias con características similares.

Para estas determinaciones se pueden usar distintos sistemas para el contacto entre el material y el alimento: como por ejemplo la inmersión total, es decir sumergiendo un trozo del material plástico en el alimento; pouch (bolsa), que consiste en fabricar una bolsa con el material objeto de estudio e introducir en ella el alimento; celda, sándwich... etc.

Como ejemplo del trabajo que se está realizando en los laboratorios de la USC se muestran las gráficas de los resultados obtenidos como consecuencia de la migración del difenilbutadieno incluido en un material plástico (Polietileno de baja densidad, LDPE) en zumo de naranja a diferentes temperaturas. El método para el análisis de esta sustancia está actualmente publicado (Sendón García et al., 2004). El dispositivo utilizado para poner en contacto el alimento con el material plástico fue la celda de migración, de manera que aproximadamente 10 g de alimento estuviesen en contacto con 0,08 dm<sup>2</sup> de material.

En la figura 7 se muestra una gráfica obtenida a 5 °C durante 40 días.

### 2.1.3- Estudios de procesos de transporte y partición de los migrantes modelo en los alimentos (Módulo 3c)

Para estos estudios, aún en fase de desarrollo, se utilizará celda, la cual será rellena con el alimento y en la que el alimento estará en contacto con una fuente de liberación de migrante.

La celda deberá permitir retirar finas capas del alimento expuesto y a continuación se cuantificará el migrante en cada capa. Las distintas capas de alimento deben dar el perfil de concentración del migrante en el alimento.

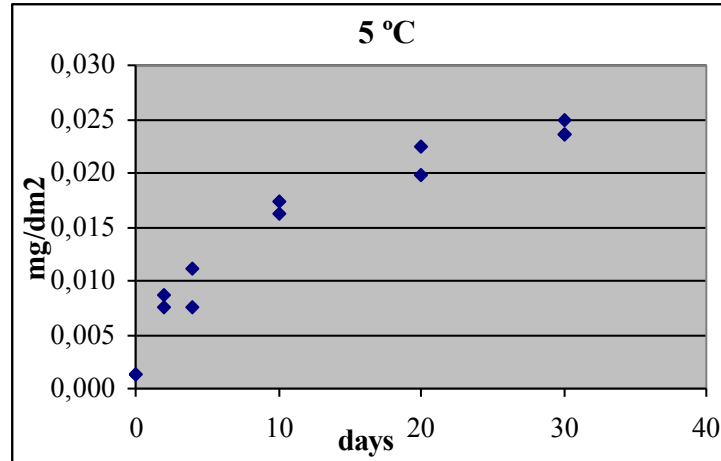


Figura 7: Migración del difenilbutadieno en zumo de naranja.

### 3- BIBLIOGRAFÍA

- Cutter, C. N.; 1999. The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. *J. of Food Prot.*, **62**, 474-479.
- European Communities, 1995-2003. Food Contact Materials - EU Legislation. [http://www.europa.eu.int/food/food/chemicalsafety/foodcontact/eu\\_legislation\\_en.htm](http://www.europa.eu.int/food/food/chemicalsafety/foodcontact/eu_legislation_en.htm).
- FOODMIGROSURE (Modeling migration from plastic into foodstuffs as a novel and cost efficient tool for estimation of consumer exposure from food contact materials). Project supported by European Commission (ref. QLK1-CT2002-02390), <http://www.foodmigrosure.com>.
- Sendón García, R.; Sanches Silva, A. T., Paseiro Losada, P.; 2004. Determination of Diphenylbutadiene by Liquid Chromatography-UV-Fluorescence In Foodstuffs. *J. Chromatogr. A*. In press.
- Slater-Radosti, C.; Aller, G. V.; Greenwood, R.; Nicholas, R.; 2001. Biochemical and genetic characterization of the action of triclosan on *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, **48**, 1-6.
- Specific Migration (Certified Reference Materials for the specific migration testing of plastics for food packaging needed by industry and enforcement laboratories). Project supported by European Commission (ref. G6RD-CT2000-00411).

## Capítulo 8

### **Impacto de la ley de bioterrorismo en la producción y procesamiento de los alimentos: historia, normativas y plan de seguridad**

*Impact of bioterrorism regulation in food production and processing: history, regulations and food security plan*

**Juan L. Silva; T. Kim; S. Roberts**

Department of Food Science, Nutrition, and Health Promotion, Mississippi State University, Box 9805, Miss. State, MS 39762, USA

Tel. 662-325-3200, Fax: 662-325-8728

E-mail: [jls@ra.msstate.edu](mailto:jls@ra.msstate.edu)

# **IMPACT OF BIOTERRORISM REGULATION IN FOOD PRODUCTION AND PROCESSING: HISTORY, REGULATIONS AND FOOD SECURITY PLAN**

## **Abstract**

The sad events of September 11, 2001 in the USA and the mad cow disease outbreak in Britain in 2001 (1996) have made us concentrate efforts on security, including agricultural and food security. The human and economic impact of a biological or chemical agent in our food supply could be devastating. Both regulatory agencies and researchers have studied the opportunities, and many recommendations have resulted. These are being studied and enacted over a period of time. In the meantime, the U.S. regulating agencies have reported on the compliance of food imports with requirements under the law. However, most data points to deficiencies in the system, including the lack of or inadequate education and food security program in the food and agricultural sectors. This paper will review some of the studies and discussions, regulatory enactment and compliance, and possible security management plans for the food and agriculture sectors.

# **IMPACTO DE LA LEY DE BIOTERRORISMO EN LA PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS ALIMENTOS: HISTORIA, NORMATIVAS Y PLAN DE SEGURIDAD**

## **Resumen**

Los eventos del 11 de Septiembre del 2001 en los Estados Unidos y los brotes de vacas locas en Inglaterra en el 2001, han hecho que concentremos nuestros esfuerzos en nuestra seguridad, incluyendo la seguridad de los alimentos. El impacto humano y económico de un agente biológico o químico en nuestra cadena de alimentos puede ser devastador. Tanto las agencias reguladoras como investigadores y otros han estudiado las oportunidades de un ataque terrorista resultando en un sinnúmero de recomendaciones. Ellas están siendo estudiadas y llevadas a la práctica en un periodo de tiempo. La agencia Federal de Medicamentos y Alimentos de los EEUU, FDA, ha sacado un reporte sobre el cumplimiento de los requerimientos para alimentos importados bajo la ley de bioterrorismo. Muchos de los reportes y estudios concluyen que hay grandes deficiencias en el sistema, incluyendo la falta de programas de educación y programas de bioseguridad de los alimentos y rubros agrícolas. En este se discutirán algunos de los estudios y discusiones, las regulaciones y el cumplimiento de estas, y algunos planes que la industria puede adoptar para asegurar la seguridad de los alimentos y rubros agrícolas.

## **Introduction**

The tragic events of September 11, 2001, the outbreak of foot and mouth disease (FMD) in Britain, and other events have led to increased concerns and political focus on personal and agriculture security. These events led to the enactment of the Bioterrorism (BT) act of 2002. The major rules under this act are:

- Registration of food facilities
- Price notice of imported food shipments
- Administration detection
- Establishment and maintenance of records

These rules affect domestic producers/ processors and importers. Along with the rulings have come studies on the readiness and preparedness of our institutions to cope with a bioterrorism act. Many scenarios have been studied with the U.S. National Academy of Sciences, National Research Council, NRC “Countering Agricultural Bioterrorism” funded by the USDA, being the most comprehensive. The USDA- APHIS –US (Agricultural Plant Health Inspection Agency- Veterinary Science) has been studying the 152 recommendations ([www.securitymanagement.com](http://www.securitymanagement.com)) given by the HRC. These were divided into seven categories.

- National surveillance system
- Laboratory systems
- Exclusion activities
- Coordinated response
- Organizational dynamics/ communication
- Information technology
- Veterinary accreditation

## **Risks + Effects**

Biological weapons of mass destruction using agricultural products have been tested and used. This category of agents includes several that can be transmitted to human through air, water, and/ or food. Many of these agents are retained in 450 repositories located in 67 countries (Gips, 2003)

The economic losses due to a bioterrorism act on agriculture in the U.S. are estimated in the billions. Losses from animal disease account for 17% of protection costs (US\$ ~ 17.5 billion) (ARS, 2002) and \$ 30 billion per year in crop diseases (Pimentel et al. 2000). Pathogens that cause diseases



such as foot and mouth disease (FMD), rinderpest, African Swine Fever (ASF), soybean rust, Philippine downy mildew of maize, potato wart, and citrus greening could be, if introduced, catastrophic for the US economy. Thus, the main effect of a new attack would likely be economic.

The world trade organization, WTO, lost very few reasons for refusing import agricultural products, but the presence of disease is one of them. These bans have had serious economic impact on exporting countries, including the USA, Mexico, and Canada. Moreover, a domino effect is experienced and the commodity producers, although not the source of the problem, are also affected.

Thus, the most important tool in fighting agricultural bioterrorism is early, rapid detection. This coupled with education, communication, containment, response, and laboratory security should be used to prevent or minimizing on agricultural bioterrorism act.

Evolution from extensive to intensive agriculture, breeding, vaccination, biotechnology, and globalization has decreased the natural defenses against a bioterrorist attack. Extensive monocultures such as corn, soybean, and other crops, intensive rearing of livestock (100,000 heads/feedlot, more than one million poultry or fish per production unit) are conducive to the rapid spread of disease, leading to a catastrophe.

## **Education**

Many farmers, processors, distributors, and others related to agricultural and food production are not prepared or have a plan to counter bioterrorism. Food producers and distributors should have knowledge of the threats, how to respond and report, whom to contact, and prepare a plan to secure vulnerable points. In addition, financial consequences, insurance, and related points should be studied and have a plan for this. In many cases, the law states requirements that many in the food chain shall follow. Amongst these requirements are record keeping, thus the need for a plan and reporting problems.

## **Prevention and Response**

There are steps that our national agencies have to take to counteract a bioterrorism act. Amongst these are development of counterterrorism

measures, greater national and international intelligence sharing, imposing severe criminal penalties, and others. It is recognized that prevention is the best solution but there could be cases where bioterrorist attacks could not be prevented. Thus, in food and agriculture, an effective response plan should be developed. The heart of the response plan should be early detection. Early detection to prevent the spread of a disease or an infection is key to avoiding major human and economic losses. This early detection has to be coupled with confirmation of a diagnosis. Thus, technology has to enable us to rapidly diagnose diseased animals or plants, or to detect tampering. These technologies include analytical tools, as well as identification tools such as books with illustrations and use of spatial technology detection. Developing a list of major bioterrorist threats, detection of these, and containment procedures is key in a bioterrorism security management plan. In some cases, vaccines for animals and containment or eradication efforts for plant crops are needed.

### **U.S. Bioterrorism (BT) Act of 2002**

The Public Health Security and Bioterrorism Preparedness and Response Act of 2002 contains five titles, of which Title 3 is the most applicable to foods, plus parts of other Titles. The BT Act of 2002 requires the following:

- Registration of Food Facilities
- Prior Notice of Imported Food Shipments
- Administrative Detention
- Establishment and Maintenance of Records

It also includes other enforcement rules to help the agencies supplement their existing authority. These include debarment of individuals from importing food, marking and/or destroying food refused for import, records access, and commission of other federal officials.

In addition to these requirements, both the USFDA and the USDA-FSIS have published guidelines for food processors and producers. These guidelines are intended for food processors to develop a Food Security Plan Management for their facilities. This plan, along with the requirements of the law can help food processors and their links prevent and/or quickly respond to a bioterrorism act. The California Department of Food and Agriculture has

also developed a food security plan for farmers. The National Food Processors Association, NFPA in conjunction with the Food Marketing Institute, FMI, have developed a Food Security Manual for processors, distributors and retailers. These plans along with tracking and traceability should allow farmers and processors to react quickly to a threat of a bioterrorism act. One has to keep in mind that water and air/environment can also be tampered with, thus sources and controls for these should be in the plans. The regulatory agencies and others have begun to utilize risk assessment (ORM) and HACCP-like approaches tools to study security of their facilities or as a whole. The FDA's risk assessment for food terrorism and other food safety concerns published October 11, 2003 ([www.cfsan.fda.gov/~dms/rabtact.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/rabtact.html)) draws upon public data to assess the vulnerability of our food supply. The US Centers for Disease Control, CDC identified and classified biological agents as Category A (*Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*) and Category B (*Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, etc.) and chemical agents (heavy metals, dioxin, lead, arsenic, etc.). They went on to characterize the hazards (magnitude of risk), assess exposure, and characterize the risks.

### **Food Security Plan Management**

Every producer, processor, distributor, retailer, exporter and importer should have a plan of contingency to protect the food supply from terrorist acts. This plan should be developed following established risk and vulnerability assessment methods. Thus, use of ORM and VACCP (vulnerability analysis and critical control points) coupled with regulatory requirements and bioterrorism knowledge should lead to the development of an effective plan. As with any food security contingency plan, emergency contacts and continuous surveillance are key. The plan should manage risk and include education and screening of employees and employers, training, security of sources and materials, monitoring, and reporting. The FDA's guidance document is summarized in Table 1. The USDA has also published Security Guidelines for food Processors ([www.fsis.usda.gov](http://www.fsis.usda.gov)). This plan recommends the establishment of a food security management team and coordinator, establishment of security plan utilizing risk management, establishment of corrective actions and a recall plan, establish contacts with law enforcement and analytical laboratories, and others similar to other plans

FDA's Food Security and Preventive Measures Guidance (March 21, 2003, <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/secguid7.html>)

This guidance is divided into five sections that relate to individual components of food importing operations and practices. The recommendations of the FDA under each of these sections are noted below.

#### 1. Management

- Preparing for the possibility of tampering or other malicious, criminal, or terrorist actions
- Supervision
- Recall strategy
- Investigation of suspicious activity
- Evaluation program

#### 2. Human element -- staff

Under Federal law, operators of food importing establishments are required to verify the employment eligibility of all new hires in accordance with the requirements of the Immigration and Nationality Act, by completing the INS Employment Eligibility Verification Form (INS Form I-9). Completion of Form I-9 for new hires is required by 8 USC 1324a and nondiscrimination provisions governing the verification process are set forth at 8 USC 1324b.

- Screening (pre-hiring, at hiring, post-hiring)
- Daily work assignments
- Identification
- Restricted access
- Personal items
- Training in food security procedures
- Unusual behavior
- Staff health

#### 3. Human element -- public

- Visitors (for example, contractors, supplier representatives, delivery drivers, customers, couriers, pest control representatives, third-party auditors, regulators, reporters, tours)

#### 4. Facility

- Physical security
- Storage and use of poisonous and toxic chemicals (for example, cleaning and sanitizing agents, pesticides)

#### 5. Operations

- Incoming products
- Storage
- Outgoing products
- Security of water and utilities
- Security of ventilation system (where applicable)
- Mail/packages
- Access to computer systems

In addition, emergency points of contact should be readily available to management and employees in order to report any suspicious activity or a security problem. These contacts are at the local, state/regional, and national levels, as well as the FDA and the USDA, and the Homeland Security contact in the USA.

The NFPA-FMI Food Security Plan for Processors, distributors and retailers of foods includes an introduction on security planning, personnel screening and training, property security assessment, protection of proprietary and sensible information, product security, processing, warehousing and storage, shipping, mail handling, emergency and law enforcement contacts, crisis management, tampering matters, information sharing, and other guidelines. In addition to these, food facility registration, security records, prior notice, administrative detention, transportation and distribution are required by law.

### **Assessment of Regulatory Compliance and Security Plans**

The US FDA has published a summary of compliance by importers on prior notice (revised August 2004). The FDA has been receiving about 160,000 notices per week. About 86% were received as additional information to that already submitted to the US Customs and Border Protection (US CBP). They also reported that only 0.5% of all importers fail to submit any prior notice. However, a small percentage of the submittals are incomplete, do not have a registration number or have wrong data. More important is the fact that some of the data turned in could be false or contain false information. The ability to inspect and verify this is one of the goals of the FDA.

### **Impact on Trade and Costs of Implementation**

The implementation of food security guidelines carries serious costs and trade consequences. The USA exported over \$ 53.7 billion in agricultural and food products, while overseas operations of US food companies accounted for over \$150 billion, in 2001. Imports are rising and were reported at \$ 39.3 billion in 2001. Thus, any act of bioterrorism could be devastating to the US and global economy. Many countries have already experienced severe losses due to animal diseases, contaminated foods, and other cases. Amongst these are Britain (mad cow disease), Guatemala (raspberries with *Cyclospora*), Mexico (melons with *Salmonella*), and many others. Thus, costs will likely rise and have to be absorbed by consumers and producers alike. Trade is and will continue to be impacted until countries develop plans, laws, and understandings to counteract food security threats, just as they are with food safety.

## REFERENCES

- FDA. 2004. Prior Notice of Import foods- Compliance summary information: prior notice. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC. Revised August 2004.
- Blandford, D. 2002. Bio-terrorism and food security- Trade dimensions. [www.aers.psu.edu](http://www.aers.psu.edu)
- Ralston, D. 2003. FDA Rules implementing the bioterrorism act. U.S. Food and Drug Administration Outreach meeting, Washington, DC. Fall 2003
- Wheelis, M., R. Casagrande, L.V. Madden. 2002. Bioterrorism attack on agriculture. *BioScience*. 52(7): 569-576.
- Gips, M.A. 2003. The first link in the food chain. *Security Management*. 40-47
- Gewin, V. 2003. Agriculture shock. *Nature*. 421: 106-108.
- Thomas, B.D. 2001. The seeds of bioterrorism. *Seed World*: 18-20.
- NFPA/FMI. 2002. Food Security Manual for Processors, Distribution and Retailers National Food Processor Association and Food Marketing Institute, Washington, DC.
- Brooks, S.W. 2002. Food security using a HACCP model. R+DA.
- USDA-FSIS. 2003. Homeland security threat condition response- Food security monitory procedure. FSIS Proactive 5420.1, 3/17/03.
- Pimentel, D, L Lach, R Zuwiga, D Morrison. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United State *BioScience* 50: 53-65.
- ARS. 2002. ARS National Programs, Animal Health (20 May 2002. <http://nps.ARS.USDA.gov/programs/programs.htm?npnumber=103>).

## Capítulo 9

### Conservación y valorización de alimentos de origen marino

*Preservation and valorization of marine food*

Ramírez de León Jose Alberto; Vázquez Vázquez Manuel

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos,  
Universidad Autónoma de Tamaulipas, U.A.M. Reynosa-Aztlán  
Área de Tecnología de los Alimentos, Depto. Química Analítica.  
Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela  
Campus de Lugo, 27002- Lugo (España)  
E-mail: vazquezm@lugo.usc.es



## CONSERVACIÓN Y VALORIZACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO

### Resumen

Los alimentos de origen marino, y en especial el pescado, son alimentos populares y conocidos, pero lamentablemente no se consume todo de ellos. Se suele decir que del cerdo se consume todo. Por desgracia, la industria de productos pesqueros está muy lejos de la eficiencia de la industria porcina. Por ejemplo, la producción de filetes de pescado solo utiliza entre 20 y un 40% del pescado inicial. El resto son las cabezas, pieles y escamas, órganos internos e intestinos, esqueletos de espinas y recortes de músculo que no llegan al tamaño comercial para ser filetes. En la primera vía de valorización de los alimentos de origen marino es evidente que se deben buscar alternativas para un mejor uso de todas las partes de esta materia prima. La producción de gelatina a partir de pieles y espinas, la producción de agentes flocculantes a partir de escamas son posibilidades interesantes que se están usando. La segunda vía de valorización es la búsqueda de alternativas que permitan usar especies infrautilizadas como puede ser el lenguado de Alaska (Arrowtooh flounder, *Atheresthes stomias*) o la fauna de acompañamiento del camarón del golfo de México. Estas especies sufren una proteólisis muy rápida con lo que su carne en los procesos culinarios se deshace siendo desagradable para el consumidor. El desarrollo de la tecnología de reestructuración utilizando la enzima transglutaminasa y otros aditivos o tecnologías (altas presiones) permite augurar interesantes posibilidades de aplicación de estas especies no comerciales

## FUTURE IN THE PRESERVATION AND VALORIZATION OF MARINE FOOD

### Abstract

Fish and shellfish are popular and known foods, but regrettably the industry is not using everything from them. It is said that everything can be used from pigs. The fish industry is very far from the efficiency of the pork producers. For example, the production of fish fillets only uses between 20 and 40% of the initial fish. Heads, skin, scales, guts, frames and trims are wastes. In a first way to give value to the seafood, it is evident that alternative to get a better and efficient use of the raw material should be found. The production of gelatin from skin and bone and the production of flocculation agents from scales are interesting alternatives in use. The second way to valorize seafood is the search of alternatives for the use of underutilized species of fish such as Arrowtooh flounder (*Atheresthes stomias*) or the fish species present in the shrimp by-catch in the Gulf de Mexico. These species present a very fast proteolysis in the flesh, consequently during cooking the flesh is disintegrated into a mass of small particles. The development of the restructuring technology using the enzyme transglutaminase and other additives or technologies (high pressure processing) permits to augur interesting possibilities of application for these non-commercial species.

## **Introducción**

Tradicionalmente la tecnología de productos pesqueros basa la conservación de estos productos en procesos de reducción de actividad de agua tales como el salado, secado, ahumado y en procesos de esterilización térmica (conservas). Es evidente la interrelación que existe entre conservación y valorización, una mejor conservación del pescado va a permitir un mejor aprovechamiento de los productos pesqueros.

Entre las tecnologías alternativas de conservación no térmicas (Campos eléctricos pulsantes, campos magnéticos oscilantes, pulsos luminosos de alta intensidad, ultrasonidos, microondas y radiofrecuencias), la alta presión destaca por ser la más viable desde el punto de vista comercial (Téllez et al., 2001).

## **Procesado por Altas Presión**

La tecnología de la alta presión, presurización o alta presión hidrostática consiste en la aplicación de una presión isostática elevada (entre 100 y 900 MPa) a alimentos líquidos o sólidos, que pueden estar empaquetados o no. La temperatura durante el proceso de presurización se puede controlar con lo que puede estar por debajo de 0°C o por encima de 100°C. El tiempo del proceso puede ser de milisegundos a más de 20 minutos, aunque la industria prefiere procesos que no pasen de los 5 minutos.

Los microorganismos y las enzimas se ven afectados por la presión, pero parece que la alta presión no afecta a los enlaces covalentes, por lo que el alimento no sufre cambios químicos. Por lo tanto, esta tecnología destaca sobre los procesos térmicos de conservación, porque a diferencia de estos, en la tecnología de alta presión hidrostática los nutrientes y el sabor del alimento no se ven alterados.

Una de las operaciones más difíciles en la conservación de los alimentos es la inactivación de las esporas bacterianas. Aunque es posible inactivar las esporas por tratamientos térmicos, no es muy deseable debido a que el calor afecta a la calidad de los alimentos destruyendo nutrientes termolábiles. A temperatura ambiente, las esporas de las levaduras y mohos se inactivan fácilmente a presiones que oscilan entre 300-400 MPa. Pero las esporas bacterianas en muchas ocasiones resisten presiones de hasta 1000 MPa. Por lo tanto la búsqueda de alternativas que permitan la eliminación de

estas esporas en los tratamientos de altas presiones es un tema de estudio muy interesante.

El desarrollo de nuevas tecnologías de conservación, como las altas presiones hidrostáticas, está permitiendo avanzar también en la mejora de productos marinos que llevan a una valorización de los mismos. Un ejemplo de esto lo tenemos en el caso del desconchado de ostras asistido por altas presiones. Las proteínas del músculo abductor de las ostras se pueden desnaturalizar por presión con lo que se facilita su desconchado eliminando riesgos para el consumidor. Al mismo tiempo mejoramos la conservación de las ostras crudas. Las altas presiones reducen el riesgo por *Vibrio* con lo que se puede extender su conservación en refrigeración hasta tres semanas.

Una aplicación importante de las altas presiones hidrostáticas estará en el procesado del salmón ahumado. El ahumado en frío del salmón no permite obtener productos libres de *Listeria monocytogenes*. En Estados Unidos la *L. monocytogenes* causa más de 400 muertes anuales. El procesado por altas presiones del salmón ahumado permitirá reducir la presencia de este microorganismo.

La combinación de procesado por altas presiones y tratamientos con transglutaminasa microbiana (Téllez-Luis et al., 2004) u otros aditivos permitirá obtener productos reestructurados de pescado o derivados del surimi con características de textura mejoradas, con lo que se podrá valorizar especies de pescado que no se están utilizando como el caso del lenguado de Alaska, *Atheresthes stomias* (Uresti et al., 2004). Debemos recordar que esta especie es con mucho la mayor reserva de pescado del golfo de Alaska, incluso mayor que la de Abadejo de Alaska (Regenstein, 2004). Sin embargo, no se está capturando debido a que al cocinar su carne se deshace, como ya hemos comentado, debido a la alta actividad de proteasas endógenas.

Por lo tanto, el estudio del efecto de las altas presiones sobre las proteasas del pescado es una línea de investigación muy interesante, ya que podría permitir desactivarlas, evitando por lo tanto el efecto modori en el procesado hacia derivados del surimi o productos reestructurados (Morales et al., 2001).

En los procesos térmicos de conservación se estudian dos variables operacionales fundamentales, tiempo y temperatura. Con el desarrollo de la tecnología de altas presiones, pasamos a un sistema tridimensional, donde deberemos tener en cuenta tiempo, temperatura y presión. Esto nos permite también pensar en el procesado de alimentos a alta presión y baja temperatura. Tenemos la posibilidad de la conservación de pescado en

estado no congelado a temperaturas por debajo de 0°C. En determinadas condiciones de presión es posible mantener un alimento a temperaturas bajo 0°C sin congelar el agua. Por ejemplo a 200 MPa se puede enfriar el producto bajo presión permaneciendo el agua en estado líquido hasta una temperatura de -20°C. Cuando se desee emplear el producto se procede en sentido inverso. Se calienta el producto hasta 0°C y se procede a la descompresión. Este proceso se ha aplicado a la conservación de frutas y carnes frescas durante semanas, evitando los daños por microorganismos y los daños habituales de la congelación, al mismo tiempo que mantiene las características naturales de los alimentos. Sería interesante estudiar el efecto que tendría este tratamiento en el pescado.

Podemos pensar en la descongelación con alta presión. Al aplicar presión a un alimento congelado, se produce la descongelación al llegar a la temperatura de cambio de fase, la cual va a ser inferior a 0°C. Una vez concluida la descongelación bajo presión, se incrementa la temperatura por encima de 0°C y se procede a la descompresión. Este proceso se ha aplicado a atún y surimi congelados. Se consiguieron tiempos de descongelación menores que descongelando a presión atmosférica. Las altas presiones provocaron desnaturalización de las proteínas, con el consiguiente cambio en el color y una textura más dura. Algunos autores indican que estos efectos adversos pueden evitarse seleccionando adecuadamente las condiciones de presión y temperatura. En otros casos, esta textura más dura puede ser beneficiosa si partimos de productos congelados derivados de surimi de especies que producen geles quebradizos o débiles, siempre y cuando se mantenga una capacidad de retención de agua aceptable.

Dentro de la congelación con alta presión, se engloban dos procesos en esencia distintos, que a menudo se confunden: la congelación asistida por presión y la congelación por cambio brusco de presión.

La congelación asistida por presión consiste en la congelación a presión constante y superior a la atmosférica. De esta forma se puede conseguir hielo I u otros tipos de hielo de menor volumen como hielo III o hielo V. El proceso consiste en aplicar una presión sobre el alimento a conservar y a continuación, manteniendo esa presión, disminuir la temperatura. Una vez alcanzada la congelación, se descomprime el alimento. Este proceso tiene la ventaja de conseguir mayores velocidades de congelación que a presión atmosférica. Este proceso se ha utilizado para congelar tofu, zanahorias y col china. Se encontró que congelando con hielo III o V se disminuían los daños histológicos y de textura (LeBail et al., 2002). Una peculiaridad interesante de este proceso, es que es posible

congelar sin aplicar frío, pues a 900 MPa se puede congelar a temperatura ambiente. Podría ser interesante su aplicación a productos pesqueros como el surimi, en el cual se producen desnaturalizaciones proteicas por el frío.

En la congelación por descompresión brusca se trata de incrementar la presión sobre el alimento hasta unos valores próximos a los 200 MPa. A continuación se disminuye la temperatura hasta valores superior a los  $-20^{\circ}\text{C}$ , condiciones en las que el agua sigue en estado líquida. En este momento se provoca una descompresión brusca con lo que se produce una congelación prácticamente instantánea de un porcentaje importante del agua del alimento (30%), provocando una nucleación uniforme en todo el volumen del producto formando cristales pequeños de hielo que disminuyen los problemas habituales de la congelación. La gran ventaja de este proceso es la formación de cristales de hielo pequeños que mejora la calidad de los productos congelados, en relación con la congelación a presión atmosférica. Se ha aplicado con éxito este proceso a varios vegetales (patata, zanahorias, col china, berenjenas, melocotón y mango). Sin embargo, en productos de origen animal, la alta presión produce daños miofibrilares por desnaturalización de las proteínas, lo cual disminuye su capacidad de retención de agua. En pescado sería interesante estudiar el efecto de baroprotectores para evitar estas desnaturalizaciones.

### **Aminas**

Las aminas biogénicamente activas están presentes en algunos alimentos, por ejemplo chocolate, pescado y productos de la pesca, cerveza, vino tinto y quesos madurados. Estas aminas desempeñan una variedad de funciones en el organismo, tales como la regulación de la temperatura corporal, volumen del estómago y pH. Por tanto, pueden tener una gran influencia en el estado de salud y bienestar.

Algunos de estos compuestos tienen efectos beneficiosos, y se conocen como poliaminas naturales. Sin embargo, algunas personas son sensibles a otro tipo de aminas biogénicamente activas, denominadas aminas biógenas y pueden padecer trastornos desagradables. Los síntomas pueden ser náuseas, ahogo, sofoco, sudoración, taquicardia, dolor de cabeza, sarpullido, inflamación de la boca e hiper o hipotensión. En el pescado europeo la principal amina biógena es la cadaverina, en cambio en centro y sudamérica es la histamina. El contenido de estas aminas en los alimentos debería mantenerse lo más bajo posible. La legislación europea limita su contenido máximo a 200 mg/kg (Cinquina et al., 2004). Incluso, en la producción de harinas de pescado para la alimentación animal, está

controlado el contenido máximo de aminas biógenas (Pescado Nórdico < 500 mg/kg de Histamina+ Putrescina+ Cadaverina y Pescado Sudamericano < 1000 mg/kg de Histamina+ Putrescina+ Cadaverina).

Por lo tanto, la presencia de aminas biógenas en pescado y productos pesqueros supone un riesgo toxicológico para el consumidor. Aunque su formación está condicionada por factores asociados a la aplicación de nuevas tecnologías tales como altas presiones hidrostáticas y atmósferas protectoras, apenas existen datos al respecto. Es interesante avanzar en el estudio de los factores tecnológicos, microbiológicos y bioquímicos que condicionan la formación de aminas biógenas en pescado y productos pesqueros tratados con estas tecnologías que se están desarrollando para la conservación de los productos pesqueros.

El picado del músculo de pescado de la orden de los gadiformes (merluza, bacalao) acelera negativamente los cambios de textura durante la congelación. Estas especies contienen óxido de trimetilamina (TMAO) como osmoregulador. A temperaturas de refrigeración este compuesto se descompone para dar trimetilamina (TMA) que es el compuesto responsable del olor a descomposición del pescado. La descomposición del TMAO a TMA es causada por microorganismos (Timm y Jørgensen, 2002). Sin embargo, cuando el pescado se congela incluso a -30°C, la reacción de descomposición se produce igualmente dando dimetilmanina (DMA) y Formaldehído (FA). Todavía se desconoce si la ruta bioquímica es enzima o no. Lo importante es que aunque el DMA es menos volátil que el TMA y no da olor, el FA es un compuesto activo que provoca entrecruzamientos de las proteínas que llevan a una textura no deseable, quebradiza, que pierde agua rápidamente al ser mordida y que provoca una sensación de textura seca. La solución a este problema no es fácil, pero una adecuada resolución del mismo permitirá mejorar el uso de la congelación como método de conservación.

Dentro de los subproductos de la tecnología de productos pesqueros, se debe destacar la producción de gelatina de pescado a partir de pieles y espinas que cuenta con una serie de ventajas importantes: Adecuado para dietas kosher y halal, adecuado para mercados preocupados por la encefalopatía espongiiforme bovina, se pueden obtener temperaturas de gelificación más bajas que a partir de gelatina de mamíferos.

Por último, no se debe olvidar los problemas medioambientales que generan las industrias pesqueras, debido a la gran producción de residuos con alta demanda de oxígeno que generan. Una propuesta interesante es su utilización como material de co-compostaje. El compostaje aunque permite

una recuperación ecológica de estos residuos puede generar problemas de malos olores durante la aireación de las pilas de compost por la liberación de TMA. Para evitar esto se están obteniendo resultados interesantes con el uso de pilas estáticas de compostaje.

## Bibliografía

- Cinquina, A. L., Longo, F., Calí, A., De Santis, L., Baccelliere, R., Cosan, R. 2004. Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1032, 79–85.
- LeBail, A., Chevalier, D., Mussa, D. M., Ghoul, M.. 2002. High pressure freezing and thawing of foods: a review. *International Journal of Refrigeration* 25 (2002) 504–513
- Morales, O. G., Ramírez, J. A., Vivanco, D. I., Vázquez, M. 2001. Surimi of fish species from the gulf of Mexico: evaluation of the setting phenomenon. *Food Chemistry*, 75, 43-48.
- Regenstein, J. M. 2004. Total utilization of fish. *Food Technology*, 58, 28-30.
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M., Simal-Gándara, J. 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3, 66-80.
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Vázquez, M. 2004. Application in restructured fish products of transglutaminase obtained by *Streptoverticillum ladakanaum* in media made from hydrolysates of sorghum straw. *Journal of Food Science*, 69(1) FMS1-FMS5.
- Timm, M., Jørgensen, B. M. 2002. Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-n-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food Chemistry*, 76, 509–518.
- Uresti, R. M., Velásquez, G., Vázquez, M., Ramírez, J. A., Torres, J. A. 2004. Effect of combining microbial transglutaminase and high pressure processing on mechanical properties of restructured products from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chemistry*, in press.



## Capítulo 10

### **Altas presiones en la industria alimentaria: Consideraciones comerciales en el procesamiento de alimentos por alta presión**

*High pressure in the food industry:  
Commercial concerns in the food high-pressure processing*

**Velazquez Gonzalo<sup>1,2</sup>, Vázquez Pedro<sup>1</sup> y Torres J. Antonio<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology,  
Oregon State University

<sup>2</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad  
Autónoma de Tamaulipas, U.A.M. Reynosa-Aztlán  
E-mail: J\_Antonio.Torres@oregonstate.edu

## **ALTAS PRESIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: CONSIDERACIONES COMERCIALES EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS POR ALTA PRESIÓN**

### **Resumen**

El procesamiento por alta presión (HPP, por sus siglas en inglés) de un alimento a temperatura de refrigeración, medio ambiente, o con calentamiento moderado, inactiva los microorganismos patógenos y deterioradores produciendo cambios mínimos en su calidad. El escalamiento de los procesos en las aplicaciones de HPP es relativamente simple, y es una razón importante por lo que esta tecnología alternativa de procesado es la única que ha llegado ya al consumidor con una variedad de nuevos productos. En este artículo, se describen los componentes esenciales de las unidades de HPP y se mencionan las diferencias principales entre las aplicaciones de bajo y alto costo comercial de esta tecnología. Se describen también ejemplos específicos de oportunidades comerciales competitivas para implementar esta tecnología innovadora.

## **HIGH PRESSURE IN THE FOOD INDUSTRY: COMMERCIAL CONCERNS IN THE FOOD HIGH-PRESSURE PROCESSING**

### **Abstract**

The high pressure processing (HPP) of a food using temperatures of refrigeration, ambient or moderate heating provokes inactivation of pathogen microorganisms and minimal changes in the quality of the food. The scale-up of the process involving HPP applications is relatively simple; this is the important reason because HPP is the unique alternative technology of food preservation that has actually products in the markets. In this article, the main components of the HPP units are described and the principal differences between high and low commercial-cost applications are mentioned. Examples of specific competitive commercial opportunities to implement this new technology are given.

## INTRODUCCIÓN

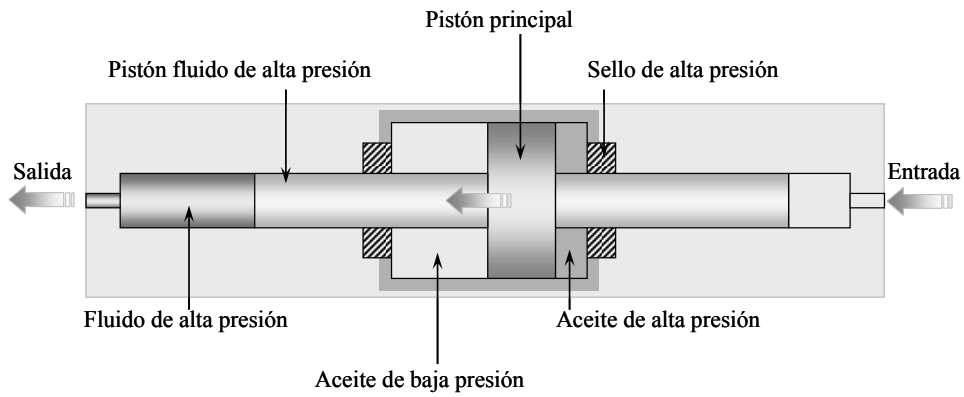
El proceso térmico es el método tradicionalmente utilizado para lograr la estabilidad microbiológica de los alimentos. Aunque esta tecnología es efectiva, económica y está ampliamente disponible en diversas formas dentro de la industria de alimentos, en muchos casos su aplicación ocasiona pérdida importante en la calidad de los alimentos. En cambio, el procesamiento por alta presión (HPP) a temperaturas de refrigeración, medio ambiente o con calentamiento moderado permite la inactivación de microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos con cambios mínimos en su textura, color y sabor en comparación con el efecto que tienen las tecnologías convencionales (Torres y Velazquez, 2004; Velazquez, Gandhi y Torres, 2002; Cheftel, 1995; Knorr, 1993). Un ejemplo ilustrativo de la diferencia entre tratamientos térmico por alta presión es el caso de un huevo crudo (Bridgman, 1914). Después de un tratamiento HPP el huevo gelifica en forma similar a un huevo cocido, sin embargo, la yema retiene el color y el sabor del huevo crudo y la clara se caracteriza por una apariencia más brillante y es más suave al tacto cuando se la compara con la del huevo que ha sido tratado térmicamente. Más aún, el anillo de sulfato ferroso que aparece entre la clara y la yema del huevo calentado, no aparece en el huevo presurizado debido a que el tratamiento de presión no produce liberación de sulfuro de hidrógeno (Galazka y Ledward, 1996).

Utilizando HPP se pueden obtener hasta cinco reducciones decimales en patógenos importantes para la conservación de alimentos incluyendo *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (An, Calik, He, Adams y Morrissey, 2000; Mackey, Forestiere, Isaacs, Stenning y Brooker, 1994; Metrick, Hoover y Farkas, 1989; Patterson, Quinn, Simpson y Gilmour, 1995; Stewart, Dunne, Sikes y Hoover, 1997; Styles, Hoover y Farkas, 1991). A diferencia de los procesos térmicos y otras tecnologías de preservación, los efectos del HPP son uniformes e instantáneos a través del alimento y por lo tanto independientes de la geometría y del tamaño del producto y del equipo. Esto ha facilitado el escalamiento de los resultados obtenidos en laboratorio para producción a escala comercial y también representa una ventaja para los procesadores comerciales cuando es necesario renovar sus equipos.

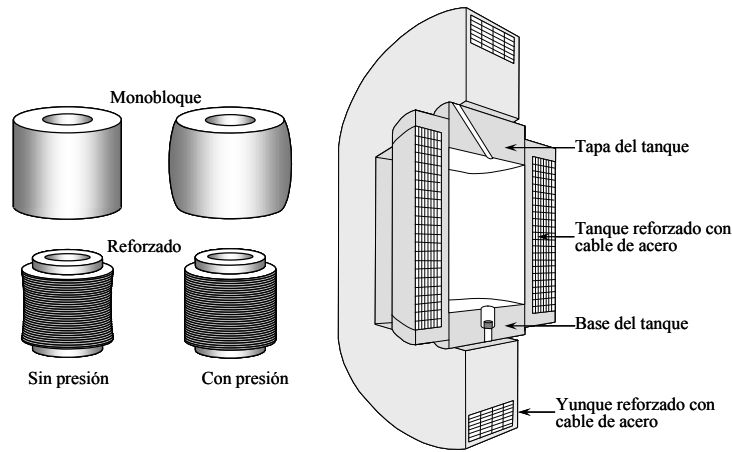
Los componentes clave del equipo utilizado para HPP son los contenedores de alta presión y las bombas intensificadoras cuya función es generar la presión elevada. Es estas bombas el aceite a ~20 MPa es inyectado

en la cámara de baja presión diseñada con una proporción de 30:1 en área entre el pistón del aceite y la del pistón del fluido a alta presión, en forma similar al principio de operación de un gato hidráulico. Por lo general el medio presurizante es agua purificada. La configuración de este dispositivo permite generar una presión aproximada de 600 MPa en el contenedor de alta presión (Figura 1). Cuando el pistón que mueve el aceite alcanza su máximo desplazamiento posible, el sistema es invertido y entonces se alimenta aceite en el lado opuesto del pistón por lo que el fluido a alta presión sale por el lado opuesto de la bomba.

La construcción de un contenedor de alta presión a partir de un solo bloque de material está limitada a un volumen de 25 L para presiones de operación inferiores a 400 MPa (Figura 2). Para volúmenes más grandes y presiones mayores se usan tanques reforzados con cable de acero para construir equipos de operación confiable, segura y de larga duración. Por lo general, se usa la misma tecnología para la fabricación del yunque que sostiene los sellos superior e inferior del contenedor (Figura 2). El reforzamiento con cable de acero incrementa el costo del equipo, conduciendo a una clasificación de las aplicaciones HPP en base a su costo dependiendo si están por abajo o por arriba la barrera tecnológica de ~400 MPa (Figura 3). Un ejemplo de aplicaciones de bajo costo es el desconchado de ostras (ostiones en México) donde se requieren niveles de presión en el rango de 200 a 400 MPa. Por otro lado la producción de guacamole o salsa de guacamole con valores cercanos a 600 MPa es una aplicación de más alto costo. Una segunda barrera tecnológica esta ubicada a valores cercanos a 650 MPa y arriba de este nivel de presión no existen equipos disponibles para aplicaciones comerciales. Sin embargo, se espera que la siguiente generación de equipos alcance niveles de presión de 700 MPa y opere a temperaturas cercanas a 100 °C. Esto permitiría desarrollar futuras aplicaciones donde sea necesaria la inactivación de esporas bacterianas por procesos combinados de presión y calor (Ting, 2003). En la actualidad, los productos obtenidos por alta presión necesitan de refrigeración, actividad acuosa reducida o bajos valores de pH, para evitar la germinación de las esporas bacterianas.



**Figura 1. Tecnología de la bomba de alta presión (adaptada de Torres y Velásquez, 2004).**



**Figura 2. Tecnología de los equipos de alta presión (adaptada de Torres y Velazquez, 2004).**

El éxito comercial de la pasta de aguacate producida por la empresa Avomex Inc. estableció un estándar de calidad en los Estados Unidos para la tecnología HPP. Actualmente se encuentran en el mercado jugos tratados por alta presión en varios países y recientemente fueron introducidos en México por el Grupo Jumex. La retención de calidad en los productos tratados por

HPP se debe a que las condiciones de presión-temperatura-tiempo requeridas para la conservación de los alimentos producen en ellos solo ligeros cambios químicos, y por lo tanto, sus propiedades sensoriales y nutricionales son afectadas en forma mínima. Eso se debe a que las reacciones que ocurren comúnmente durante el tratamiento térmico no se presentan durante el tratamiento por alta presión a menos que exista una vía de reacción alternativa que implique la reducción del volumen inducida por la presión (Galazka y Ledward, 1996). Estudios realizados en Oregon State University han demostrado que los productos tratados por alta presión mantienen las características de un producto fresco de tal forma que es prácticamente imposible distinguirlos de las muestras controles sin tratamiento (Shellhammer, Aleman, McDaniel y Torres, 2003). El interés del consumidor por los productos “frescos” puede satisfacerse con productos refrigerados; sin embargo, en estas condiciones de conservación la vida de anaquel es limitada, lo cual representa una oportunidad comercial para los alimentos tratados por alta presión.

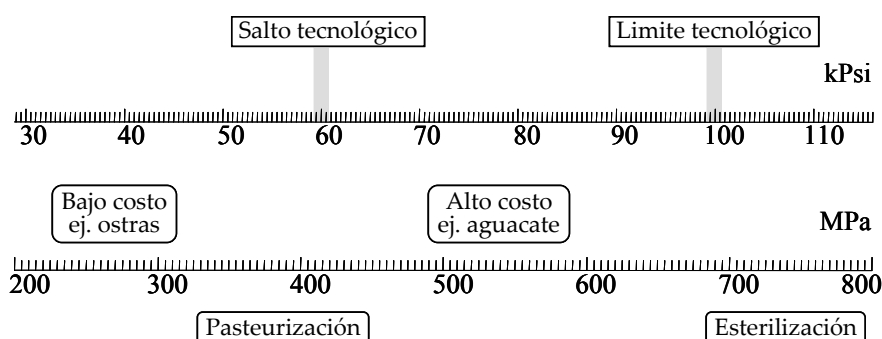


Figura 3. Límites tecnológicos en los equipos para procesamiento por alta presión (HPP) (adaptada de Torres y Velásquez, 2004)..

## OPORTUNIDADES COMERCIALES IDEALES PARA LOS ALIMENTOS HPP

La introducción exitosa de una nueva tecnología para la conservación de alimentos requiere una serie de ventajas competitivas sobre las tecnologías existentes. En el caso de HPP, una restricción adicional es la inversión relativamente alta de capital inicial. Esta desventaja disminuye cuando se opera la planta de HPP a su máxima capacidad durante todo el

año. Debido a lo anterior, para el caso del procesamiento de materias primas estacionales, se requiere la identificación de una combinación de productos para aprovechar al máximo la inversión en el equipo HPP. En las siguientes secciones se muestran ejemplos específicos de las diversas oportunidades en las que HPP presenta evidentemente ventajas competitivas.

### **(1) Productos frescos procesados mínimamente y libres de aditivos químicos**

El ejemplo clásico de satisfacción de la demanda del consumidor por un producto fresco es el procesamiento por alta presión del aguacate (palta en Chile). La planta de alta presión de Avomex Inc. inició sus operaciones en 1996 con una unidad de alta presión con capacidad de 25 L para el procesado por lotes respondiendo a las necesidades de una cadena local de restaurantes con menú de platillos estilo mexicano. Posteriormente y debido a que la demanda del producto se extendió rápidamente, la empresa adquirió una segunda unidad de 25 L y posteriormente una unidad de 50 L equipada con un contenedor embobinado. En 1999, Avomex adquirió una unidad semicontinua y en el 2000 un contenedor embobinado de 215 L para procesamiento por lotes. El proceso de conservación del el guacamole requiere niveles de presión menores a 600 MPa por ~1 min. El aguacate tratado por alta presión fue aceptado en el mercado de los Estados Unidos debido a que no se había satisfecho la demanda del consumidor por un producto con una vida de anaquel aceptable, fácil de usar y libre de aditivos químicos.

Las ensaladas recién cortadas y refrigeradas que los consumidores demandan por salud, comodidad y ahorro en tiempo de preparación son otro ejemplo de mercado potencial para productos HPP (Pao, Petracek y Ismail, 1997). Durante el proceso de cortado y empacado, estos productos suelen contaminarse con *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 y otros patógenos de alto riesgo para el consumidor. Estos microorganismos pueden inactivarse con HPP sin alterar su “frescura”. Estudios reportados en la literatura para este tipo de productos se basaron en procesos de baja presión y tiempos largos de proceso, comúnmente 5-15 min a ~ 400 MPa, reflejando las limitaciones tecnológicos de los equipos de laboratorio disponibles en ese tiempo (e.g., Aleman, Farkas, Torres, Wilhelmsen y McIntyre, 1994). Los equipos HPP disponibles actualmente operan a presiones más elevadas permitiendo tiempos de procesado en el rango de 1-3 min, lo que reduce significativamente los costos de producción (Rogers, 1999; Anónimo, 1999, 2000). Ello implica la necesidad de evaluar cuidadosamente tratamientos con

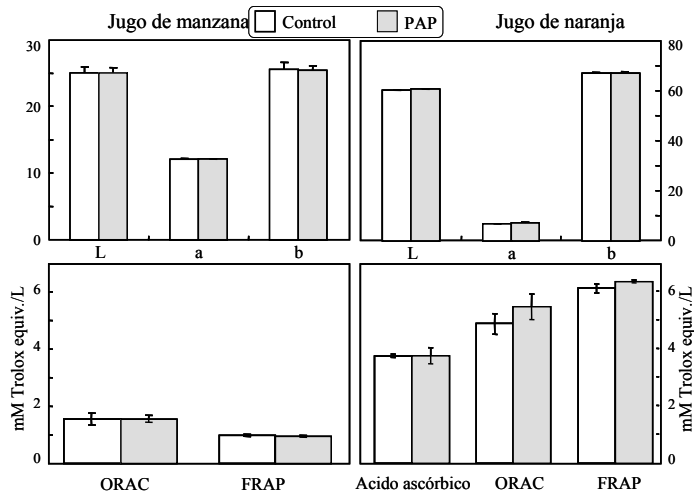


tiempos largos como el de 20 min propuesto para queso fresco por Sandra et al. (2004) o los trabajos ahora obsoletos para estabilización por HPP de trozos de piña reportado por Aleman et al. (1994).

En 1996, se encontró que un jugo de manzana no pasteurizado provocó un brote de *E. coli* O15:H7 afectando a siete estados del oeste de Estados Unidos y British Columbia en Canadá. Aunque este brote solamente afectó aproximadamente a 60 personas, la atención pública se enfocó en este desafortunado evento debido a que los casos de infección incluyeron a una niña de 2 años que sufrió de daño renal permanente y un bebe de 16 meses que murió de paro cardíaco y respiratorio (Anónimo, 1996). La *E. coli* O15:H7 encontrada en un envase de jugo sin abrir de la empresa Odwalla fue utilizada como evidencia para apoyar nuevas regulaciones legales que actualmente requieren una reducción decimal de 5 ciclos logarítmicos para los patógenos en jugos que provienen principalmente de contaminación fecal (Morris, 2000). Sin embargo, aún existe la demanda de jugos libres de tratamiento térmico y la industria de alta presión busca alternativas viables para satisfacer esta demanda con productos que cumplan con el nuevo requerimiento de pasterización. La industria de procesamiento por alta presión ha solicitado un cambio en la regulación que permita el etiquetado de los jugos procesados por alta presión y que se permita denominarlos productos “frescos” debido a que se ha demostrado, con técnicas de análisis sensorial, que no se pueden distinguir del jugo recién exprimido (Shellhamer et al., 2003). El cambio de la etiqueta representaría una ventaja competitiva sobre la pasterización térmica convencional de los jugos de frutas (Anónimo, 2002).

La inactivación de enzimas y de organismos deterioradores en jugos ha sido ampliamente estudiada (Parish, 1998; Goodner, Braddock y Parish, 1998). En un trabajo reportado por Avure Technologies, no se encontró *E. coli* viable durante el almacenamiento de jugo de manzana inoculado con una mezcla de *E. coli* incluyendo O15:H7 tratado a 545 MPa por 1 min a temperatura de refrigeración y almacenado a temperatura ambiente por 2 meses ([www.fresherunderpressure.com](http://www.fresherunderpressure.com)). La inactivación de la pectinmetilesterasa utilizando HPP en combinación con CO<sub>2</sub> en jugo de naranja ha sido investigada por Truong, Boff, Min y Shellhammer (2002). Los autores sometieron muestras de jugos carbonatados y no carbonatados a distintos tratamientos en el rango de 200-600 MPa de presión, por 30-300 s, alcanzando una temperatura de 15 a 50°C al final del proceso. Los resultados mostraron que los tratamientos con alta presión en combinación con CO<sub>2</sub> permiten una mayor velocidad de inactivación de la pectinmetilesterasa, pero

no incrementan su grado de inactivación final. Shellhammer et al. (2003) examinaron los cambios químicos y sensoriales de jugo de manzana y jugo de naranja sin pulpa pasteurizados por alta presión y las determinaciones de color y niveles de antioxidantes, expresados como vitamina C, ORAC y FRAP, no mostraron diferencias significativas entre las muestras tratadas por alta presión y los controles (Figura 4).



**Figura 4. Caracterización de los jugos tratados por presión utilizando mediciones de color, vitamina C, ORAC y FRAP (adaptada de Shellhammer et al., 2003).**

Estudios de evaluación sensorial utilizando la prueba triangular con 101 consumidores de jugo de manzana y 221 consumidores de jugo de naranja demostraron que las muestras tratadas por alta presión fueron indistinguibles del control. Shellhammer et al. (2003) concluyeron que los jugos tratados por alta presión son inocuos y similares a los jugos frescos, confirmando así estudios previamente reportados en la literatura (Bignon, 1996; Donsi, Ferrari y di Matteo, 1996; Cano, Hernandez y de Ancos, 1997; Nienaber y Shellhammer, 2001a,b; Post, 2001; Odebo, 2001; Sellahewa, 2002).

Una oportunidad de particular interés comercial para la industria láctea en México y los Estados Unidos es la posibilidad de producir queso fresco incorporando HPP para inactivar patógenos sin recurrir a tratamientos

térmicos. En el sector industrial de alimentos en México, los productos lácteos representan la tercera actividad más importante y su ritmo de crecimiento en los últimos 6 años ha superado el 25% anual (Castro-López, 2001). En los Estados Unidos se ha observado un crecimiento explosivo del mercado de quesos "hispanos" debido al incremento en la diversidad étnica de la población y a la fuerte demanda de los consumidores en general por quesos con nuevos sabores y texturas (Parker, 2002). En un censo realizado en el 2000, se estimó que de 35.3 millones de hispanos que residen en los Estados Unidos, 23.3 millones son mexicanos y que de la cocina hispana, la mexicana es la que más utiliza el queso en sus platillos. El queso fresco, de color blanco y textura suave, tiene un sabor moderadamente salado y no se funde cuando se calienta. Se usa como relleno en platillos y granulado sobre tacos, enchiladas, burritos, ensaladas y frutas frescas. Este queso presenta ventajas económicas pues no requiere tiempo de maduración y tiene un alto rendimiento (Torres y Chandan, 1981). Tradicionalmente se preparaba con leche no pasteurizada de vaca pero hoy en día debe elaborarse usando leche pasteurizada (Clark et al., 2001). En 1985, se identificaron en el condado de Los Ángeles en California 142 casos de infección debida al consumo de quesos frescos contaminados con *Listeria monocytogenes* (Linnan et al., 1988). En 1997, un lote de queso fresco casero elaborado a partir de leche no pasteurizada causó un brote de salmonelosis en el condado de Yakima, Washington (Bell et al., 1999; Villar et al., 1999).

La fabricación de queso fresco se lleva a cabo por coagulación ácida o con renina y debido a su alto contenido de humedad tiene una corta vida de anaquel (Chandan, 1996). La pasteurización térmica daña propiedades importantes de la leche para la elaboración de queso, inactivando en particular las enzimas que participan en el desarrollo del sabor durante su procesamiento y almacenamiento (Fox et al., 2000). Los consumidores de queso fresco tradicional tienen la percepción de que las características sensoriales del producto elaborado con leche pasteurizada son inferiores. El tratamiento térmico de la leche asegura su inocuidad pero causa el desarrollo de olores y sabores no deseados, debido al incremento en la concentración de compuestos como aldehídos y metil-cetonas (Contarini et al., 1997). Se ha establecido además una alta correlación entre la producción de compuestos sulfúricos y el desarrollo del sabor cocido en la leche causados por el tratamiento térmico (Simon et al., 2001).

Las consideraciones anteriores sugieren una oportunidad para la pasterización HPP en el proceso de fabricación de quesos frescos. Existe gran interés en mantener viables las bacterias prebióticas en el queso fresco

durante almacenamiento en refrigeración hasta por 60 días (Vinderola et al., 2000). Esto se ha demostrado para el queso fresco argentino que tiene un pH  $\geq 6$  e incluye el proceso de ultrafiltración para aumentar la concentración de sólidos en la leche. Ambos factores parecen ejercer un efecto protector sobre las bacterias probióticas pero no se conoce su viabilidad después de un tratamiento HPP y no se estudió si la composición, textura y sabor del queso fueron alterados por el tratamiento HPP (Vinderola et al., 2000).

### **El efecto de procesado por alta presión es único**

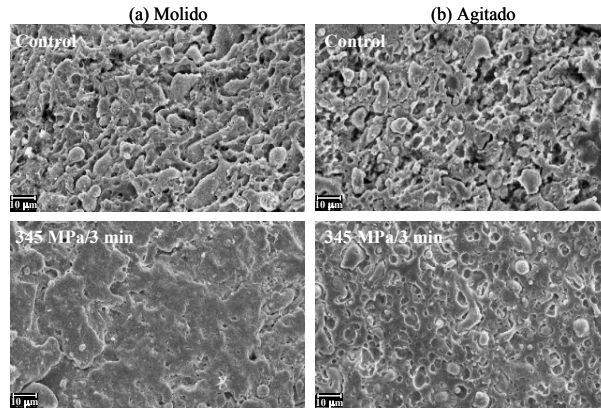
El ejemplo clásico de un efecto único como resultado de un tratamiento HPP es el desconchado de ostras (ostiones) por presión hidrostática moderada (MHP). En 2002, California prohibió la venta de ostras crudas cosechadas en el Golfo de México entre Abril y Octubre, lo que representó una pérdida de mercado estimada en 20 millones de dólares al año para esta industria. Más aún, hoy en día los establecimientos que venden ostras crudas deben tener visible un aviso donde se advierte sobre el peligro de consumir ostras crudas provenientes del Golfo de México (<http://www.dhs.ca.gov/>).

El proceso de desconchado por HPP fue descubierto en 1997 y consiste en someter ostras vivas a presiones de 240-350 MPa por  $\sim 3$  min. Estos tratamientos moderados de alta presión desnaturalizan el músculo abductor y por ello las ostras pueden ser abiertas con un mínimo esfuerzo sin el daño al producto causado por el cuchillo durante el desconchado convencional. La simplificación del costoso y laborioso desconchado es el avance más importante para esta industria en los últimos 100 años (Morrissey, 2003). Más importante aún es la eliminación de accidentes de los operarios con los cuchillos utilizados para el desconchado. A ello se agrega el incremento de la vida de anaquel bajo refrigeración a tres semanas y la reducción del riesgo microbiano para los consumidores de ostras crudas ya que el desconchado por HPP inactiva los patógenos *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. cholerae* no-O:1, *V. hollisae* y *V. mimicus* (Berlin, Herson, Hicks y Hoover, 1999).

Otro ejemplo de un efecto único de HPP es el tratamiento con presión hidrostática moderada propuesto en los trabajos de Serrano (2003) y Serrano, Velazquez, Lopetcharat, Ramírez y Torres (2004a,b) para acelerar el proceso de maduración necesario para el rallado de queso Cheddar. Tratamientos de 345 MPa por 3 ó 7 min aplicados sobre cuajada fresca de queso Cheddar lograron una formación inmediata de la microestructura

similar a la que se puede observar en queso madurado (Figura 5). Estudios de microscopia electrónica de transmisión realizados por Torres-Mora, Soeldner, Ting, Hawes, Alemán et al. (1996) habían demostrado cambios similares de microestructura en queso Cheddar tratado a una presión de 275 MPa por 100 s (Figura 6). Las evaluaciones sensoriales de queso Cheddar rallado llevadas a cabo por Serrano et al. (2004a,b) demostraron que los tratamientos MHP mejoran sus propiedades visuales y de textura al tacto (Figura 7). Las ventajas observadas en queso Cheddar rallado sin madurar incluyeron una menor cantidad de pedazos pequeños, un incremento en la longitud promedio de la tira, un mejoramiento en la uniformidad de su longitud y un incremento en la suavidad de la superficie. El cambio en estas y otras propiedades físicas deseables sugiere que el tratamiento de presión desnatura parcialmente las proteínas y esto lleva a la formación de un queso con una matriz microestructural más continua. Esta observación coincide con los resultados de Galazka y Ledward (1996) que encontraron que a presiones mayores de 300 MPa, muchas proteínas tienden a desdoblarse, promoviendo la reasociación de subunidades a partir de los oligómeros disociados, y por consiguiente, una desnaturación. Los resultados de las investigaciones de Serrano et al. (2004a,b) sugieren que los productores de queso Cheddar rallado podrían utilizar un tratamiento MHP para eliminar los 30 días de maduración que se usan convencionalmente y obtener productos con excelentes atributos táctiles y visuales. Serrano et al. (2004a,b) demostraron que los tratamientos MHP son efectivos para queso Cheddar fabricado por dos tecnologías diferentes, cuajada agitada y cuajada molida. Esta es una observación alentadora pues sugiere que los tratamientos de presión podrían acelerar la capacidad de rallado en otras variedades de quesos de interés comercial. Las ventajas económicas de esta tecnología son el ahorro de ~15 dólares mensuales por cada 1000 libras de queso al eliminar el almacenamiento refrigerado requerido durante la maduración del queso Cheddar, y además por la simplificación del proceso de manufactura del queso rallado. La importancia de esto es que en los Estados Unidos el queso rallado representa el ingrediente queso con los mayores niveles de venta a consumidores, a productores de platillos preparados y en establecimientos de comida rápida. Se ha observado un comportamiento similar en diversos países, y en Alemania por ejemplo, las ventas de queso rallado utilizado en la preparación de pizza incrementaron en un 125 % entre 1995 y 1996, mientras que los quesos rallados de consumo general, principalmente Gouda y Edam, incrementaron sus ventas en un 91%. El rallado del queso se utiliza para cubrir una mayor superficie y de esta forma se obtiene el efecto

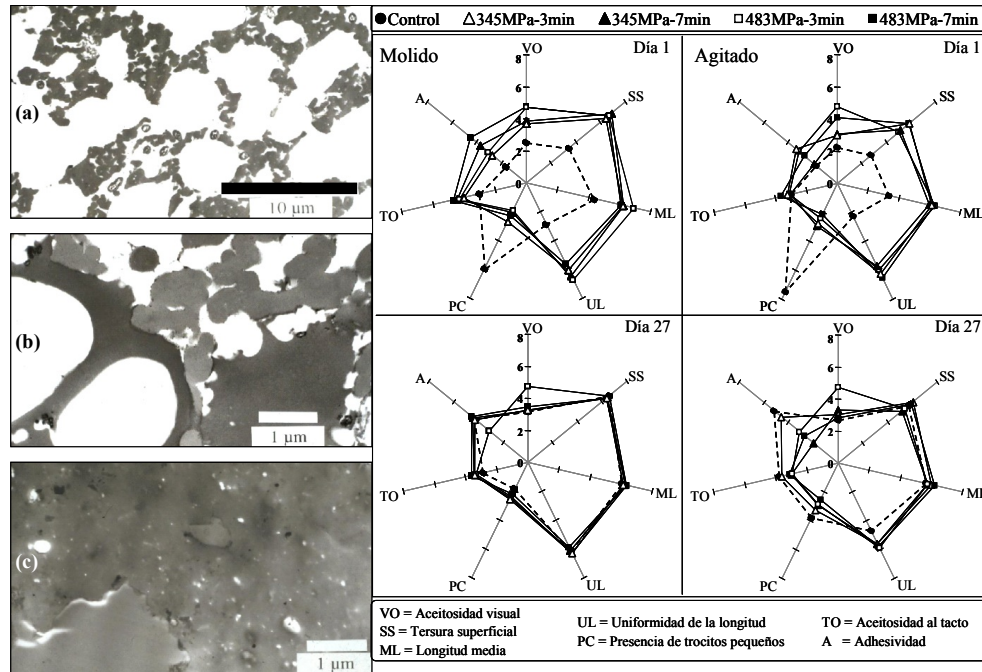
culinario deseado con menor cantidad de queso (Apostolopoulos y Marshall, 1994).



**Figura 5. Análisis de microscopia de barrido electrónico (SEM) en el día 1 para queso Cheddar visualizando los cambios en la microestructura del queso Cheddar inmediatamente después de la aplicación de tratamientos de presión moderada (adaptada de Serrano et al., 2004a,b)**

Un ejemplo adicional sobre un efecto único de HPP en los alimentos es el estudio realizado por Sangronis et al. (2002) quienes evaluaron el efecto de la presión sobre la imbibición de agua, tiempos de cocción y la microestructura de los cotiledones y de la cubierta de los granos de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Los tratamientos a 275, 410, 550 ó 690 MPa a 25 °C por 5 min incrementaron la velocidad de imbibición de agua alcanzando la saturación en la mitad del tiempo necesario para la muestra control. Con estos tratamientos se redujeron los tiempos de cocción sin remojar en un 25% a 39% obteniéndose una calidad comparable al de granos remojados en agua por 3 h. Las fotografías con microscopía electrónica de barrido demostraron que el tratamiento por alta presión induce una agregación de la matriz proteica, así como un hinchamiento de las paredes celulares y de los gránulos de almidón. La cubierta externa pierde su suavidad y las capas celulares se hinchan, comportamiento similar al observado cuando los granos se remojan. HPP parece ser una alternativa para reducir el tiempo de preparación ya que, aunque la aplicación de esta nueva tecnología requiere una alta inversión inicial en la adquisición del equipo, los costos de operación son mucho menores cuando se comparan con la mayoría de los

tratamientos térmicos usados para ablandar la textura de las leguminosas. Adicionalmente, la tecnología HPP no generaría efluentes, en contraposición a la gran cantidad generada por el remojo de estas legumbres.



**Figura 6. Análisis de microscopía de transmisión electrónica (TEM) en el día 1 para queso Cheddar de cuajada molida visualizando los cambios en la microestructura del queso Cheddar inmediatamente después de tratamientos de presión moderada. (a y b) control; (c) muestra tratada a 275 MPa por 100 s (adaptada de Torres-Mora et al., 1996).**

**Figura 7. Propiedades sensoriales visuales y de textura del queso Cheddar rallado a partir de cuajada control y tratada con presión (adaptada de Serrano, 2003)**

## **(2) Productos con alto riesgo comercial para el productor debido a presencia de patógenos**

Existen muchos casos en los que las mejores prácticas de manufactura no logran producir un alimento libre de patógenos, sin embargo, el producto se mantiene en el mercado debido a su fuerte demanda de consumo. Por ejemplo, los productores de pescados y mariscos ahumados en frío no pueden garantizar la inocuidad de estos productos y podrían presentarse casos de contaminación con *Listeria monocytogenes*. Una preocupación adicional es que los estudios realizados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) han encontrado este patógeno en estos productos con una frecuencia del 17%. Este problema también se presenta con los productores de pescados y mariscos ahumados con el proceso tradicional debido a que los mismos estudios han encontrado una incidencia de 4% para *L. monocytogenes* (Heintz y Johnson, 1998). Las mejores prácticas de manufactura y manejo para salmón ahumado en frío solo logran reducir la incidencia de *L. monocytogenes* a  $<1$  ufc/g lo cual explica la razón por la cual estos productos resultan positivos en los procedimientos de detección utilizados por las agencias regulatorias donde los métodos de análisis utilizados tienen una sensibilidad de 0.04 ufc/g. Hasta la fecha no se han reportado casos de brotes de *L. monocytogenes* causados por salmón ahumado; sin embargo, las inspecciones realizadas por las agencias regulatorias conducen a frecuentes rechazos de producto lo cual representa pérdidas económicas considerables para la industria y el consiguiente desprestigio del procesador (Tabla 1). Este impacto podría reducirse con un proceso HPP y reformulación del producto con el objetivo de lograr 5 reducciones decimales de *L. monocytogenes* con un mínimo de daño a la textura del producto ahumado.

Un último ejemplo de interés industrial por la eliminación de riesgos microbiológicos, es la preparación de productos de pescado reestructurados a partir de especies poco utilizadas como es el caso del lenguado *Atheresthes stomias* la cual es una especie de bajo valor comercial debido a la presencia de altas concentraciones de proteasas en el músculo que no permiten su comercialización como filete fresco. La utilización de pescado crudo molido para crear productos reestructurados representa un riesgo de contaminación por la manipulación en la etapa de post-captura y procesado, incluyendo fileteado, molienda, solubilización de la proteína con sal, estructuración del producto y finalmente su empacado. El tratamiento HPP puede reducir la carga microbiana y al mismo tiempo actúa como una alternativa para inducir la gelación de las proteínas miofibrilares sin la necesidad de aplicar calor y



de esta forma obtener productos similares al pescado crudo. El tratamiento a 400-600 MPa de la pasta de lenguado permitió la obtención de productos con características funcionales y mecánicas aceptables (Uresti, Velazquez, Ramirez, Vázquez y Torres, 2004a,b,c,d). Estas condiciones de presión son suficientes para inactivar parásitos y la mayoría de los microorganismos patógenos y deterioradores que podrían contaminar este producto.

### **(3) Productos termolabiles de alto valor agregado**

Los compuestos funcionales o biológicamente activos se han convertido en un mercado muy importante debido al creciente interés del consumidor. Las ventas de suplementos, alimentos funcionales, nutraceuticos y artículos naturales continúan expandiéndose, creando una oportunidad de venta estimada en \$42,000 millones de dólares a nivel mundial. La creciente desconfianza de que si nuestra dieta satisface todas nuestras necesidades nutricionales, y el interes por mejorar nuestra calidad física de vida, son factores importantes que aseguran el crecimiento continuo en la demanda de estos productos. En 1994, el 70% de las mujeres creían que sus dietas cubrían sus demandas nutricionales, porcentaje que bajó al 46% en 2000. Al mismo tiempo, el porcentaje de personas que creen necesitar adicionar nutrientes a sus dietas incrementó de 54% en 1994 a 70% en 2000 (Multi-Sponsor Surveys 2001, Princeton, NJ). La tecnología HPP es capaz de responder al reto de lograr productos para este mercado con cuenta microbiana baja y libre de patógenos sin alterar el contenido de compuestos con actividad biológica.

**TABLA 1. Ejemplos de productos rechazados por contaminación microbiológica de salmón ahumado, 1999-2004. Fuente: <http://www.foodsafetynetwork.ca/>, consultada Septiembre, 2004**

<b>Fecha</b>	<b>Producto</b>
14-Jun-04	Salmón ahumado Catsmo Artisan Smokehouse
12-May-04	Salmón ahumado Stonington Sea
17-Mar-04	Salmón ahumado Sea Specialties Inc.
15-Nov-03	Salmón ahumado/rebanado Nova, West Front Andrew Co.
02-Jul-03	Salmón ahumado Pacific Smoking
08-Jun-03	Salmón ahumado estilo Northwest, Pacific Seafood
12-Abr-03	Salmón ahumado rebanado en tiras largas MacKnight Traditional, Rice Epicurean, y Cromarty's
18-Sep-02	Salmón en trozos Nova, Key Food.
05-Sep-02	Salmón ahumado rebanado Nova
04-Dic-01	Productos congelados de salmón ahumado
07-Mar-01	Salmón ahumado Bear Candy devuelto
26-Jul-00	Salmón rey ahumado Jensen's devuelto
12-Abr-00	Salmón ahumado del Atlántico Chef Daniel Boulud
12-Abr-00	Scandinavian smoke house
12-Abr-00	Salmón ahumado del Atlántico Chef Daniel Boulud
27-Mar-00	Salmón ahumado escocés Craigellachie
14-Mar-00	Salmón tradicionalmente ahumado con roble Grants
10-Mar-00	Smoked Captain (Royal Baltic, Ltd.)
10-Mar-00	Salmón ahumado Imperial Style
11-Ene-00	Salmón fino escocés ahumado Highland crest
10-Ene-00	Salmón ahumado estilo Imperial European
10-Ene-00	Royal Baltic Ltd of New York company
19-Sep-99	Blue Ribbon Smoked Fish Co.
18-Nov-99	Salmón ahumado del Atlántico Kendell Brook
09-Nov-99	Tuv Taam Corp. of Brooklyn
23-Dic-99	Royal Baltic Ltd
06-Abr-99	Perona Farms
01-Abr-99	Perona Farms of Andover

## CONCLUSIONES

El procesamiento por alta presión (HPP) es la única tecnología alternativa de procesado que ha llegado al consumidor con una variedad de nuevos productos y en este trabajo se presentan numerosas oportunidades que se han comercializado y muchas otras que representan nuevas oportunidades para la industria de alimentos. Es importante resaltar que la adopción de una tecnología innovadora depende de los beneficios al consumidor, las ventajas que represente para el productor y también de la

situación general de la economía. Keith Long, de la firma de inversionistas Otter Creek Partners, expresó en 2003 que HPP es una tecnología prometedora pues hay en ella una gran potencialidad, aunque permanece la pregunta fundamental de como comercializarla dentro de una situación económica en la que los inversionistas han estado renuentes a proveer los recursos necesarios debido a la situación económica mundial de los últimos años. El futuro de esta tecnología depende también del éxito de los fabricantes de equipos para solucionar una serie de retos tecnológicos y obtener equipos con bajos costos de operación, de alta confiabilidad y con nuevas capacidades tecnológicas. En este sentido, este futuro es prometedor pues la nueva generación de equipos permitirá procesos de presión a temperaturas elevadas, pero inferiores a las de esterilización convencional, con lo que se espera lograr la inactivación de esporas bacterianas. Todas estas condiciones permitieran desarrollar alimentos estables a temperatura ambiente sin necesidad de la refrigeración para su distribución comercial.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aleman, G., Farkas, D.F., Torres, J.A., Wilhelmsen, E. y McIntyre, S. (1994). Ultra-high pressure pasteurization of fresh cut pineapple. *Journal of Food Protection* 57, 931-4.
- An, H., Calik, H., He, H., Adams, R. y Morrissey, M.T. (2000). Use of high hydrostatic pressure to control pathogens in raw oysters. *Journal of Shellfish Research* 19, 655-656.
- Anónimo. (1999). Developments in high pressure processing. *Food Reviews* 26(7), 13-4.
- Anónimo. (2000). Staying fresh under pressure. *Food Quality* 7(3), 50, 52.
- Anónimo. (2002). Petition. *Nonthermal Processing Division (NPD) Newsletter* 4(3), 7-8.
- Anonymous. (1996). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice - British Columbia, California, Colorado and Washington, October (1996). *Morbidity Mortality Weekly Report* 45(44), 975.
- Apostolopoulos, C. y Marshall, R.J. (1994). A quantitative method for the determination of shreddability of cheese. *Journal of Food Quality* 17, 115-128.
- Bell, R. A., Hillers, V. N., Thomas, T. A. (1999). The Abuela Project: safe cheese workshops to reduce the incidence of *Salmonella typhimurium* from consumption of raw-milk fresh cheese. *American Journal of Public Health* 89(9), 1421-1424
- Berlin, D.L., Herson, D.S., Hicks, D.T. y Hoover, D.G. (1999). Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Applied Environmental Microbiology* 65, 2776-80.
- Bignon, J. (1996). Cold pasteurizers Hyperbar for the stabilization of fresh fruit juices. *Fruit Processing* 6(2), 46-48.

- Bridgman, P.W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *Journal of Biological Chemistry* 19(1), 511-2.
- Byler, D.M. y Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR
- Cano, M.P., Hernandez, A. y de Ancos, B. (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science* 62, 85-8.
- Castro-López, Sánchez-Rodríguez, G., Iruegas-Evaristo, L.F. y Saucedo-Lugo, G. (2001). Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. *Boletín Informativo FIRA* Num. 317, Vol. XXXIII.
- Chandan, R. C. (1996). Cheeses made by direct acidification. In *Feta and Related Cheeses*, Robinson, R.K. and Tamime, A.Y. (Eds), Woodhead Publishing Limited, England.
- Cheftel, J.C. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France* 81(1), 13-38.
- Clark, S., Warner, H., y Luedecke, L. (2001). Acceptability of queso fresco cheese by traditional and nontraditional consumers. *Food Science Technology International* 7, 165-170.
- Contarini, G., Povolo, M., Leardi, R. Y Toppino, M. (1997). Influence of the heat treatment on the volatile compounds of milk. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3171-3177.
- Donsi, G., Ferrari, G. y di Matteo, M. (1996). High pressure stabilization of orange juice: evaluation of the effects of process conditions. *Italian Journal of Food Science* 8(2), 99-106.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. and Sweeney, P.L.H. (2000). Cheese Yield, Ch. 9, p.169-202, In *Fundamentals of Cheese Science*, Aspen Publishers, Maryland.
- Galazka, V.B. y Ledward, D.A. (1996). Effects of high pressure on protein-polysaccharide interactions. In *Macromolecular Interactions in Food Technology*. N. Parris, A. Kato, L.K. Creamer and J. Pearce (Eds). American Chemical Society, Washington. pp. 113-123.
- Goodner, J.K., Braddock, R.J. y Parish, M.E. (1998). Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juices by high pressure. *Journal of Agriculture y Food Chemistry* 46, 1997-2000.
- Heinitz, M.L. y Johnson, J.M. (1998). The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *Journal Food Protection* 61, 318-23.
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology* 47(6), 156, 158-161
- Linnan M J., Mascola L., Lou X.D., Goulet V., May S., Salminen C., Hird D.W., Yonekura M.L., Hayes P., Weaver R., Audurier A., Plikaytis B.D., Fannin S.L., Kleks A., and Broome C.V. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine* 319, 823-828.
- Mackey, B.M., Forestiere, K., Isaacs, N.S., Stenning, R. y Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters Applied Microbiology* 19, 429-432.
- Metrick, C., Hoover, D.G. y Farkas, D.F. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science* 54, 1547-1549, 1564.

- Morris, C.E. (2000). FDA regs spur non-thermal R&D. *Food Engineering* 72(7/8), 61-66, 68.
- Morrissey, M. (2003). Interviewed published December 1 by FSNET, Director of Oregon's Seafood Laboratory, Astoria, OR.
- Nienaber, U. y Shellhammer, T.H. (2001a). High-pressure processing of orange juice, kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science* 66, 328-31.
- Nienaber, U. y Shellhammer, T.H. (2001b). High-pressure processing of orange juice: combination treatments and a shelf life study. *Journal of Food Science* 66, 332-6.
- Odebo, U. (2001). 'Fresher under pressure'. A fully commercial 'cold pasteurization' method for fruit products. *Fruit Processing* 12(6), 220-221.
- Pao, S., Petracek P.D. y Ismail, M.A. (1997). Advances in preparing peeled fresh-cut citrus. *Food Technology International Europe*: 39-40, 42.
- Parish, M.E. (1998). High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. *Journal of Food Safety* 18, 57-65.
- Parker, W. (2002). The booming market for Hispanic cheeses: A national market. *IFT Annual Meeting*, Anaheim, CA, June 15-18.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. y Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *Journal of Food Protection* 58, 524-9.
- Post, G. (2001). Fresher under pressure. Non-damaging processes for fruit juices. *Voedingsmiddelentechnologie* 34(20), 35-38.
- Rogers, N. (1999). High pressure processing. It's time for action. *Food Manufacture* 74(5), 34-6.
- Sandra, S., Stanford, M.A. and Meunier-Goddik, L. (2004). The use of high-pressure processing in the production of Queso Fresco cheese. *Journal of Food Science* 69(4), 153-158.
- Sangronis, E., Ibarz, A., Barbosa-Cánovas, G.V. y Swanson, B.G. (2002). Efecto de la alta presión hidrostática (APH) en la imbibición de agua, tiempos de cocción y microestructura del *Phaseolus vulgaris*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 52(3), 301-306
- Sellahewa, J. (2002). Shelf life extension of orange juice using high pressure processing. *Fruit Processing* 12, 344-50.
- Serrano, J. (2003). Efecto de altas presiones en la microestructura de quesos, Aplicación en el rallado de queso Cheddar para uso comercial. [MSc dissertation], Querétaro, Qro., México, Oregon State Univ. 139 p.
- Serrano, J., Velazquez, G., Lopetcharat, K., Ramirez, J.A. y Torres, J.A. (2004a). Moderate hydrostatic pressure processing to reduce production costs of shredded cheese: microstructure, texture and sensory properties of shredded stirred curd Cheddar. *Journal of Dairy Science*. IN PRESS.
- Serrano, J., Velazquez, G., Lopetcharat, K., Ramirez, J.A. y Torres, J.A. (2004b). Moderate hydrostatic pressure processing to reduce production costs of shredded cheese: microstructure, texture and sensory properties of shredded milled curd Cheddar. *Journal of Food Science*. IN PRESS.

- Shellhammer, T.H., Aleman, G.D., McDaniel, M.R. y Torres, J.A. (2003). A comparison of the sensory and chemical properties of orange and apple juices treated with and without high pressure. *IFT Annual Meeting*, Chicago, IL.
- Simon, M., Hansen, A.P. y Young, C.T. (2001). Effect of various dairy packaging materials on the headspace analysis of ultrapasteurized milk. *Journal of Dairy Science* 84, 774-783.
- Stewart, M.F., Jewett, F.F., Dunne, C.P. y Hoover, D.G. (1997). Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety* 17, 23-26.
- Styles, M.F., Hoover, D.G. y Farkas, D.F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science* 56, 1404-7.
- Ting, E. (2003). Personal communication. Avure Technologies, Inc., Kent, WA.
- Torres N. y Chandan, R.C. (1981). Latin American white cheese - a review. *Journal of Dairy Science* 64, 552-557.
- Torres, J.A. y Velazquez, G. (2004). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, IN PRESS.
- Torres-Mora, M.A, Soeldner, A., Ting, E.Y., Hawes, A.C.O., Alemán G.D., Bakski G.S., McManus, W.R., Hansen, C.L. y Torres, J.A. (1996). Early microstructure changes in Cheddar cheese and effects of high pressure curd processing. *IFT Annual Meeting*, IFT Paper no.6-2, New Orleans, LA.
- Truong, T.T., Boff, J.M., Min, D.B. y Shellhammer, T.H. (2002). Effects of carbon dioxide in high-pressure processing on pectinmethylesterase in single-strength orange juice. *Journal of Food Science* 67, 3058-62
- Uresti, Velazquez, Ramírez, Vázquez y Torres, 2004a,b,c,d
- Velazquez, G., Gandhi, K. y Torres, J.A. (2002). Hydrostatic pressure processing: a review. *Biotam* 12(2), 71-78.
- Villar, R. G., Macek, M.D., Simons, S., Hayes, P.S., Goldoft, M.J., Lewis, J.H., Rowan, L.L., Hursh, D., Patnode, M., y Mead, P.S. (1999). *Journal of the American Medical Association* 281(19), 1811-1816.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D y Reinheimer, J.A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science* 83, 1905-1911.

## Capítulo 11

### **Altas presiones en la industria alimentaria: Retos actuales de investigación en el procesado de alimentos por alta presión**

*High pressure in the food industry:  
Current challenge of research in The food high-pressure processing*

**Velazquez Gonzalo<sup>1,2</sup>, Vázquez Pedro<sup>1</sup> y Torres J. Antonio<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology,  
Oregon State University

<sup>2</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad  
Autónoma de Tamaulipas, U.A.M. Reynosa-Aztlán  
E-mail: J\_Antonio.Torres@oregonstate.edu

## **ALTAS PRESIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: RETOS ACTUALES DE INVESTIGACIÓN EN EL PROCESADO DE ALIMENTOS POR ALTA PRESIÓN**

### **Resumen**

Aunque el procesado de alimentos por alta presión es la única tecnología alternativa de conservación que ha llegado al consumidor con una amplia gama de nuevos productos, es necesaria más investigación para desarrollar las herramientas necesarias en la formulación de productos y optimización de procesos. Para ello se requiere de un conocimiento más preciso del mecanismo de inactivación de las enzimas y microorganismos en los alimentos causada por la presurización, sola o combinada con otros factores como calor, pH, aditivos químicos y microorganismos competidores. Este artículo revisa en forma crítica los trabajos más recientes para generar esta información enfatizando particularmente la investigación que se lleva a cabo en Oregon State University.

*HIGH PRESSURE IN THE FOOD INDUSTRY:  
CURRENT CHALLENGE OF RESEARCH IN  
THE FOOD HIGH-PRESSURE PROCESSING*

### **Abstract**

High pressure processing (HPP) is the only food preservation technology that has reached consumers with a variety of innovative products; however, there is still a need for further research to develop tools that the food industry could use to formulate products and optimize processes. Achieving this goal will require knowing the mechanism of inactivation of enzymes and microorganisms induced by pressure treatments alone or with the assistance of other factors such as heat, pH, chemical additives and introduction of a competitive microflora. This article presents a critical review of the most recent efforts to generate this information with a particular emphasis on the research being conducted at Oregon State University.



## INTRODUCCIÓN

Los tratamientos térmicos son el método más utilizado para estabilizar microbiológicamente los alimentos. Aunque esta tecnología es efectiva, económica y muchas veces existe capacidad de proceso disponible en exceso en las plantas comerciales, las temperaturas elevadas tienen efectos no deseados sobre la calidad del alimento. Además existe una fuerte demanda en los mercados de países desarrollados por productos mínimamente procesados y conservados sin uso de aditivos químicos (Torres y Velazquez, 2004). En comparación con las tecnologías convencionales de conservación de alimentos, el procesamiento por alta presión (HPP, por sus siglas en inglés), a temperaturas de refrigeración, medio ambiente o con calentamiento moderado, inactiva los microorganismos patógenos y deterioradores de alimentos con un mínimo de cambios en su textura, color y sabor (Velazquez, Vázquez y Torres, 2004; Velazquez, Gandhi y Torres, 2002; Cheftel, 1995; Knorr, 1993). Al utilizar HPP se pueden alcanzar hasta cinco reducciones decimales en patógenos incluyendo *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (An, Calik, He, Adams y Morrissey, 2000; Mackey, Forestiere, Isaacs, Stenning y Brooker, 1994; Metrick, Hoover y Farkas, 1989; Patterson, Quinn, Simpson y Gilmour, 1995; Stewart, Dunne, Sikes y Hoover, 1997; Styles, Hoover y Farkas, 1991). A diferencia de los procesos térmicos y otras tecnologías de conservación, los efectos de la presión son uniformes e instantáneos a través del alimento y por lo tanto son independientes de la geometría, del tamaño del equipo y del alimento. Esto ha facilitado la implementación industrial de los resultados obtenidos en el laboratorio.

La conservación de la calidad y frescura de los alimentos tratados por presión se debe a que las condiciones presión-temperatura-tiempo que se usan ocasionan solo ligeros cambios químicos por lo que no afectan sus propiedades sensoriales y nutricionales. Diversos trabajos de investigación han confirmado las excelentes características de los productos HPP por lo que en muchos casos es prácticamente imposible distinguirlos de los controles sin tratamiento. Ejemplos de estos estudios son las evaluaciones sensoriales de prueba triangular utilizando 101 consumidores de zumo de manzana y 221 consumidores de zumo de naranja (Shellhammer, Aleman, McDaniel y Torres, 2003). El trabajo mencionado demostró que las muestras tratadas por alta presión fueron indistinguibles de los controles confirmando estudios previamente reportados en la literatura (Bignon, 1996; Donsi,

Ferrari y di Matteo, 1996; Cano, Hernández y de Ancos, 1997; Nienaber y Shellhammer, 2001a,b; Post, 2001; Odebo, 2001; Sellahewa, 2002). Sin embargo, para la distribución de los productos HPP en el mercado se necesita refrigeración, actividad acuosa ( $a_w$ ) reducida o bajo pH para prevenir la germinación de esporas bacterianas, las cuales no son inactivadas con las condiciones presión-temperatura-tiempo que son posibles en equipos comerciales disponibles en la actualidad. A pesar de ello, HPP es la única tecnología alternativa de procesamiento que puede ofrecer una gran variedad de nuevos productos a los consumidores.

La introducción exitosa de una nueva tecnología demanda ventajas competitivas sobre las tecnologías existentes, evaluación cuidadosa de los efectos sobre los factores de calidad e investigaciones rigurosas para obtener modelos que permitan desarrollar procesos HPP capaces de lograr la inactivación microbiológica necesaria. Los modelos desarrollados deben considerar el efecto de los componentes del alimento y de las condiciones ambientales sobre los factores que determinan su inocuidad y calidad (Seyderhelm, Boguslawski, Michaelis y Knorr, 1996; Oxen y Knorr, 1993). A continuación se resume el estado actual de los conocimientos sobre la aplicación de HPP en la conservación de alimentos.

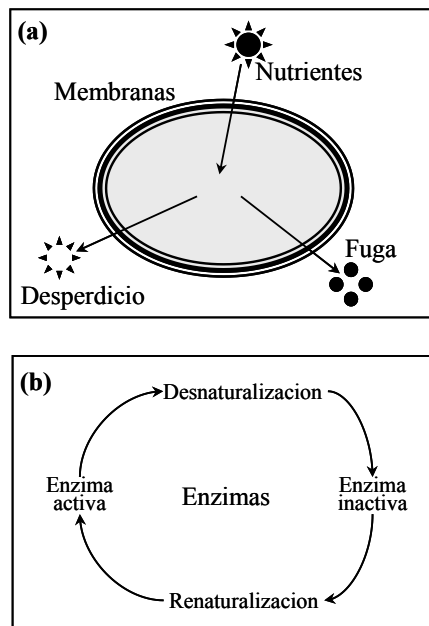


Figura 1. Efecto de la presión hidrostática en las funciones celulares

### **Mecanismos de inactivación bacteriana**

La Tecnología HPP inactiva los microorganismos al interrumpir las funciones celulares responsables de la reproducción y supervivencia, sin necesidad de utilizar temperaturas elevadas (Figura 1). Esta teoría del efecto de la presión hidrostática sobre los microorganismos comienza a ser respaldada por los estudios mecanísticos que han sido reportados en la literatura. HPP altera las membranas celulares en las bacterias y de esta forma afecta a los procesos de transporte celulares relacionados con la obtención de nutrientes y la liberación de desechos celulares. La presencia de compuestos del líquido intracelular en el fluido de suspensión extracelular después de un tratamiento de presión demuestra que cuando las células se someten a condiciones de presión se dañan las membranas (Shimada, Andou, Naito, Yamada, Osumi y Hayashi, 1993). El daño a las membranas ocurre después de la muerte celular, sugiriendo que las mediciones de exclusión de colorantes utilizadas para detectar este efecto de la presión pueden ser usadas para la caracterización de la inactivación microbiana por presión (Ulmer, Gaenzle y Vogel, 2000).

El conocimiento de los mecanismos de daño por presión hidrostática y de reparación celular podría llevar al desarrollo de nuevas aplicaciones para HPP (Chilton, Isaacs, Manas y Mackey, 2001; Hauben, Wuytack, Soontjens y Michiels, 1996). Por ejemplo, la lisis de bacterias iniciadoras causada por HPP, libera proteasas intracelulares que podrían ser aplicadas en la producción de quesos madurados. Malone, Shellhammer y Courtney (2002) sugieren que la pérdida de viabilidad, los cambios en morfología y el aumento de la actividad de la hidrolasa de la pared celular causada por alta presión puede causar daño físico y lisis en *Lactococcus lactis*. Por medio de microscopia de transmisión electrónica se ha demostrado que los tratamientos a 300 MPa producen este tipo de daño en las cepas *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 y SK11 frecuentemente utilizadas en la elaboración de queso. Las suspensiones celulares tratadas a 200 o 300 MPa no presentaron diferencias significativas comparadas con el control, mientras que las suspensiones tratadas a presiones mayores de 400 MPa presentaron una disminución en la actividad de la hidrolasa de la pared celular. Sin embargo, las células tratadas a 100 MPa liberaron azúcares reductores en una cantidad significativamente mayor que cualquiera de las otras muestras, sugiriendo que este nivel de presión activa la hidrolasa de la pared celular o aumenta la accesibilidad de la enzima a la pared celular.

Los efectos de HPP en las proteínas de la membrana de *Salmonella typhimurium* fueron estudiados por Ritz, Freulet, Orange y Federighi (2000). Los patrones de electroforesis de las membranas exteriores en las bacterias sin tratamiento revelaron la existencia de 3 proteínas mayores y 12 menores, sin embargo, después del tratamiento por alta presión solamente se pudieron identificar 2 proteínas mayores. Bajo condiciones ácidas, una de estas proteínas mayores fue más resistente a la presión sugiriendo la existencia de una conformación más estable a pH reducido. Los resultados observados sugieren que un mejor conocimiento del comportamiento de las proteínas de las membranas bacterianas sometidas a presiones bajo diferentes condiciones de pH o  $a_w$  podría llevar hacia el desarrollo efectivo de nuevas aplicaciones para la tecnología HPP.

El tratamiento de *Leuconostoc mesenteroides* por 5 min a 345 MPa y 25 °C alteró las membranas celulares modificando su permeabilidad (Kalchayanand, Frethem, Dunne, Sikes y Ray, 2002). Este daño redujo el potencial de gradiente a través de la membrana limitando la síntesis celular de ATP, lo cual activó la autólisis de las paredes celulares. Microorganismos sometidos a 400 MPa por 10 min a pH 5.6 en solución búfer de citratos, no crecieron en medio de cultivo después de 48 h de incubación. Otros autores (Kalentuç et al., 2004) estudiaron el efecto de la alta presión sobre *L. mesenteroides*, utilizando microscopía electrónica de barrido, microscopía de transmisión electrónica y calorimetría diferencial de barrido para evaluar los cambios estructurales en las células. Los tratamientos de 250 y 500 MPa causaron cambios en la superficie externa y en la estructura interna de las células. Al aumentar la presión, los componentes citoplásmicos fueron afectados y los ribosomas se desnaturalizaron. La microscopía electrónica de barrido, determinación de la integridad de membrana con la tinción de yoduro de propidio y la observación de los cambios en el potencial de membrana por medio de citometría de flujo, fueron las técnicas utilizadas por Ritz, Tholozan, Federighi y Pilet (2002, 2001) para analizar el efecto de tratamientos por presión en *L. monocytogenes*. Los estudios de microscopía electrónica de barrido no mostraron cambios significativos en la morfología celular, mientras que la tinción con yoduro de propidio seguida de la citometría de flujo detectaron solamente en una pequeña fracción de la población con una pérdida de la integridad de la membrana. El daño a la membrana también se refleja en el diferencial ( $pH_{\text{interno}} - pH_{\text{externo}}$ ) como lo demostraron Tholozan, Ritz, Jugiau, Federighi y Tissier (2000) para *S. typhimurium*. Los cambios morfológicos causados por la presión fueron correlacionados con una disminución progresiva del diferencial de pH,

potasio intracelular y concentración de ATP. Otros autores han observado resultados similares (Wouters, Glaasker y Smelt, 1998).

Gaenzle y Vogel (2001) usaron la técnica de fluorescencia en *Escherichia coli* como microorganismo modelo para evaluar la posibilidad de determinar el daño reversible e irreversible causado por presión a la membrana externa que sirve de barrera protectora a las bacterias Gram-negativas. La cinética de permeabilización de la membrana externa y la citoplasmática inducida por los tratamientos de presión fue determinada por medio de la tinción de las células presurizadas con los colorantes fluorescentes yoduro de propidio (IP) y 1-N-fenilnaftilamina (NFN), respectivamente. La fluorescencia del IP incrementó muy poco incluso para tratamientos de presión con una reducción mayor de 6 ciclos logarítmicos en células viables mientras que el aumento de la fluorescencia de NFN, fue observado antes de la muerte celular y de daño subletal, indicando permeabilización de la membrana externa. La fluorescencia de NFN fue utilizada en el desarrollo de una prueba para monitorear *in situ* el daño causado por la presión a la membrana externa. Estos estudios demostraron que el daño reversible a la membrana externa ocurre rápidamente en *E. coli*, y en equilibrio termodinámico con las condiciones de presión, mientras que el daño irreversible fue dependiente del tiempo.

La velocidad de la descompresión después del tratamiento HPP tiene efecto sobre la inactivación de las bacterias. Noma et al. (2004) investigaron el efecto bactericida del tratamiento de alta presión hidrostática seguida de una descompresión lenta (~30 s) o rápida (~2 ms) sobre células de *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana y naranja almacenados a 4 °C y comparados con soluciones tampón con los mismos valores de pH. La descompresión rápida produjo una mayor inactivación que la descompresión lenta tanto en los zumos como en las soluciones tampón. Las células de *E. coli* sin tratar no mostraron ninguna inhibición después de 5 días de almacenamiento; sin embargo, el almacenamiento después de los tratamientos de presión seguidos por descompresión lenta o rápida redujeron la viabilidad de *E. coli* en los zumos, siendo la descompresión rápida la que logró un mayor descenso.

La temperatura de cultivo y el estado fisiológico de una bacteria tienen un efecto importante en la susceptibilidad a la inactivación por presión hidrostática. La resistencia a la presión (200 ó 400 MPa) de las células de *E. coli* NCTC 8164 en fase exponencial alcanzó su más alto nivel cuando se cultivaron a 10 °C, disminuyendo al aumentar la temperatura de incubación a 45 °C (Casadei, Manas, Niven, Needs y Mackey, 2002). En cambio, la resistencia de las células en fase estacionaria fue mínima cuando

la temperatura de crecimiento fue de 10 °C, aumentando al incrementar la temperatura de crecimiento, con un máximo a 30-37 °C y decreciendo nuevamente a 45 °C. Este efecto de la presión se ha correlacionado con la proporción de ácidos grasos no saturados en los lípidos de la membrana, la cual decrece con la temperatura de crecimiento tanto en la fase exponencial como en la estacionaria. En las células en fase exponencial, la resistencia a la presión aumentó con una mayor fluidez en la membrana, mientras que en la fase estacionaria, no se observó ninguna relación entre fluidez de la membrana y resistencia a la presión. Un mutante barotolerante de *Saccharomyces cerevisiae* y la misma levadura sin mutar se compararon en términos de barotolerancia, contenido intracelular de trehalosa, concentración de las tres mayores proteínas de choque térmico (PCHTs), proporción relativa de ácidos grasos saturados e insaturados en los fosfolípidos de la membrana y fluidez de la membrana (Fujii, Iwahashi, Obuchi, Fujii y Komatsu, 1996). Los cambios en la cantidad de trehalosa se asociaron con las diferencias en barotolerancia entre las fases de crecimiento y las células mutantes y sin mutar; sin embargo, estos cambios no se observaron para PCHTs. La fluidez de la membrana del mutante fue menor que la de las células sin mutar. Estos resultados indican que la acumulación de trehalosa y las condiciones de la membrana son más importantes para la barotolerancia que la acumulación de PCHTs.

La eficiencia antimicrobiana de HPP en alimentos fue estudiada por Erkmén y Dogan (2004) quienes utilizaron cepas de *L. monocytogenes* inoculadas en caldos, leche cruda, zumos de durazno y de naranja conteniendo su flora nativa, y después sometidas a tratamientos de alta presión (200-700 MPa a 25°C). Las curvas de supervivencia mostraron que la muerte celular se incrementa al aumentar la presión aplicada. Después de 10 min de tratamiento a 400 MPa en leche cruda, se encontraron reducciones de 2,09 y 2,76 log UFC/mL para las bacterias aeróbicas y *L. monocytogenes*, respectivamente. Cuando el tratamiento de presión fue de 600 MPa se incrementaron estos valores hasta 5,09 y 6,47 log UFC/mL, respectivamente. La muerte bacteriana fue mayor en zumo de naranja que en zumo de durazno, y mayor en zumo de durazno que en leche cruda. *L. monocytogenes* fue más sensible al incremento de presión que al incremento del tiempo de tratamiento. Estos estudios mostraron que presión, edad de la población bacteriana, composición del medio y tiempo de tratamiento son factores que afectan a la inactivación microbiana.

Kalchayanand et al. (2004) estudiaron el efecto combinado de HPP y bacteriocinas sobre suspensiones de *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli*

O157:H7. Estos patógenos fueron tratados por alta presión, una mezcla de bacteriocinas (nisina y pediocina), o ambos factores (Presión + bacteriocinas). Se midió el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se monitorearon los cambios en la morfología celular por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). En *L. monocytogenes*, disminuyó la viabilidad celular después de cada uno de los tres tratamientos mientras que *E. coli* y *Salmonella* solamente sufrieron un descenso en la viabilidad después de tratamientos de presión y de presión + bacteriocinas. La microscopía electrónica de barrido mostró que en las células de *L. monocytogenes* expuestas a bacteriocinas y presión + bacteriocina, la pared celular y la membrana habían colapsado mostrando evidencia de lisis, mientras que este efecto ocurrió en *Salmonella* y *E. coli* cuando se trataron con presión y con presión + bacteriocinas.

### **Mecanismos de inactivación de esporas bacterianas**

Las esporas bacterianas, a diferencia de las células vegetativas, son mucho más resistentes a la presión (Crawford, Murano, Olson y Shenoy, 1996; Mills, Earnshaw y Patterson, 1998; Reddy, Solomon, Fingerhut, Rhodehamel, Balasubramaniam et al., 1999; Sangsuk y Myoung, 2003). La inactivación de esporas se logra con tratamientos cíclicos de presión, y los de presión a temperaturas altas pero inferiores a las utilizadas en la esterilización convencional (Hayakawa, Kanno, Tomita y Fujio, 1994a; Hayakawa, Kanno, Yoshiyama y Fujio, 1994b; Wuytack, Boven y Michiels, 1998; Capellas et al., 2000; Meyer, Cooper, Knorr y Lelieveld, 2000). Sin embargo, la eficacia de estas alternativas depende de la temperatura inicial, el calentamiento adiabático, el pH, el nivel de presión y el tiempo de procesado. La determinación de las esporas más baroresistentes asociadas con envenenamiento por alimentos, y la investigación de los mecanismos responsables de la diferencia entre cepas resistentes a la presión (RP) y sensibles a la presión (SP), son de importancia crítica para el avance de la tecnología HPP. También es muy importante determinar que tipo de aditivos incrementan la inactivación de las esporas por medio de la presión (Roberts y Hoover, 1996; Stewart, Dunne, Sikes y Hoover, 2000; Shearer, Dunne, Sikes y Hoover, 2000; Capellas, Mor-Mur, Gervilla, Yuste y Guamis, 2000).

La *Food and Drug Administration* (FDA) en los Estados Unidos de America establece que todos los alimentos de baja acidez mantenidos a temperatura ambiente en recipientes herméticamente cerrados deben estar libres de esporas de *C. botulinum*. Este requerimiento es un reto que aún no ha logrado alcanzar la tecnología HPP (Tabla 1). Por ello, se necesitan

estudios fundamentales sobre el mecanismo de inactivación de esporas por presión que permitan desarrollar tecnologías que cumplan esta norma de una manera segura y consistente. Por otro lado, es importante resaltar que las esporas de *C. perfringens* son notablemente baroresistentes y más resistentes que las de *C. botulinum*. Además el envenenamiento con alimentos contaminados por *C. perfringens* tipo A es la tercera enfermedad transmitida por alimentos más importante en los Estados Unidos (Olsen, MacKinon, Goulding, Bean y Slutsker, 2000).

El ADN en la espora se encuentra protegido contra el daño físico y químico por un grupo de proteínas ligadas al ADN. Son pequeñas proteínas solubles en ácido (SASP, por sus siglas en inglés) con un peso molecular de 5-7 kDa y representan el 10-20% del contenido proteico de una espora (Setlow, 1988, 1994, 1995). Las esporas de mutantes de *Bacillus subtilis* que no poseen estas proteínas son mucho más sensibles al calor y la presión que las esporas silvestres (Mason y Setlow, 1986; Setlow, 1988; Fairhead, Setlow y Setlow, 1993; Setlow y Setlow, 1993; Setlow y Setlow, 1995; Setlow, Setlow y Setlow, 1997; Paidhungat, Setlow, Daniels, Hoover, Papafragkou, y Setlow, 2002). El rol similar que juegan las SASP en la resistencia al calor del *C. perfringens* se encuentra actualmente bajo investigación (Sarker, Shivers, Sparks, Juneja y McClane, 2000; Sarker, Carman y McClane, 1999). Estas investigaciones necesitan ampliarse para incluir su rol en la resistencia a la presión. Estudios preliminares han revelado la existencia de múltiples SASP tipo  $\alpha/\beta$  en *C. perfringens* (Setlow y Waites, 1976; Granum, Richardson y Blom, 1987; Cabrera-Mattinez, Mason, Setlow, Waites y Setlow, 1989; Holck, Bolm y Granum, 1990; Cabrera-Mattinez y Setlow, 1991). Se han clonado ya tres genes de *C. perfringens* que codifican para las SASP de tipo  $\alpha/\beta$  y se ha determinado su secuencia de nucleótidos (Cabrera-Mattinez y Setlow, 1991; Holck et al., 1990).

Los cambios en la estructura de las esporas bacterianas causados por HPP no han sido esclarecidos (Clouston y Wills, 1969; Hoover, Metrick, Papineau, Farkas y Knorr, 1989). Por ejemplo, se sabe relativamente poco acerca de los efectos combinados de presión y calor en las proteínas de la corteza de las esporas. Gandhi, Torres, Velázquez, Anderson y Malencik (2003) utilizaron octil- $\beta$ -D-glucopiranosido (OGP), un solvente no iónico, a temperatura ambiente y urea/dodecil sulfato de sodio (UDS) a 37 y 70°C para analizar las proteínas de la corteza de las esporas de *B. subtilis* ATCC 6633 (Figura 2).



**TABLA 1. Inactivación de las esporas bacterianas por presión**

	<b>P, MPa</b>	<b>t, min</b>	<b>T, C</b>	<b>Observaciones</b>
<u>A temperaturas de refrigeración y ambiente</u>				
<i>Bacillus</i>				
<i>stearothermop</i>	981	40		
<i>hilus</i>			5-10	Inactivación nula
<i>Bacillus subtilis</i>	588	120		
<i>Bacillus licheniformis</i> <sup>1</sup>				
<i>Clostridium</i>				
<i>sporogenes</i> <sup>2</sup>	600	30	20	Inactivación nula
<i>Bacillus cereus</i> <sup>3</sup>	400	25	30	0.5 reducciones decimales
<i>C. perfringens</i> <sup>4</sup>	100 y 500	15 y 30	25	Poca o nula reducción
<u>Con calentamiento moderado</u>				
<i>C. botulinum</i> tipo E <sup>5</sup>	827	5	50-55	~5 reducciones decimales
<i>C. botulinum</i> tipo A <sup>12</sup>	827	20	75	~3 reducciones decimales
<i>Bacillus</i>				
<i>stearothermop</i>	800		70	6 reducciones decimales
<i>hilus</i>	800	3	60	7 reducciones decimales
<i>Bacillus licheniformis</i>	900		70	Inactivación parcial
<i>Bacillus coagulans</i> <sup>6</sup>				
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>8</sup>	827	10	75	4 reducciones decimales
<i>Clostridium</i>				
<i>sporogenes</i> <sup>7</sup>	689	20	80	5 reducciones decimales
<i>Clostridium</i>	100			
<i>perfringens</i> <sup>4</sup>	y 500	15 y 30	45 y 65	Poca o no reducción
<i>Alicyclobacillus</i>				
<i>acidoterrestris</i> <sup>9</sup>	621	10	71	>5.5 reducciones decimales
<i>Bacillus cereus</i> <sup>10</sup>	483	20	50	~7.6 reducciones decimales
<i>Geobacillus</i>				
<i>stearothermop</i>	30	120	95	Poca reducción
<i>hilus</i> <sup>11</sup>				
<i>Bacillus anthracis</i> <sup>13</sup>	500	4	75	Total destrucción

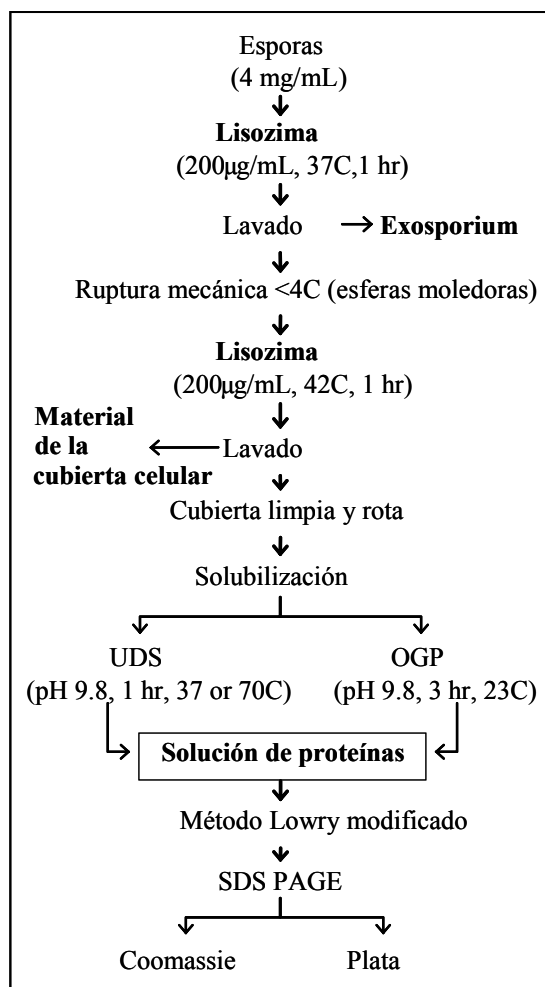
(1) Nakayama, Yano, Kobayashi, Ishikawa y Sakai (1996); (2) Mills et al. (1998); (3) McClements, Patterson y Linton (2001); (4) Papafragkou, Hoover y Daniels (2002); (5) Reddy et al. (1999); (6) Gola, Forman, Carpi, Maggi, Cassara et al. (1996); (7) Crawford et al. (1996); (8) Balasubramanian, Balasubramanian y Reddy (2001); (9) Lee et al. (2002); (10) Kalchayanand et al. (2004); (11) Watanabe et al. (2003); (12) Reddy et al. (2003); (13) Clery-Barraund et al. (2004).

Esta metodología fue comparada con procedimientos publicados en cuanto al rendimiento de proteína recuperada, fracciones de proteína identificadas, composición de aminoácidos y compatibilidad con técnicas

espectroscópicas para el análisis de proteínas en la corteza de la espora (Gandhi, 2002). Los resultados reflejan diferencias en la capacidad de solubilización entre los métodos de OGP y UDS, así como cambios en la estructura nativa de las proteínas causados por el método de extracción. El análisis de aminoácidos de las proteínas del extracto con OGP mostró una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos como glicina, alanina, valina y tiroxina, y también concentraciones mayores de los ácidos aspártico y glutámico, sugiriendo que las proteínas de la corteza de la espora contienen regiones ácidas e hidrofóbicas.

Finalmente, la inducción de la germinación causada por alta presión necesita ser investigada para mejorar la efectividad de los tratamientos por alta presión. Paidhungat, Setlow, Daniels, Hoover, Papafragkou y Setlow (2002) demostraron que las esporas de *B. subtilis* sin receptores de germinación, germinaban más lentamente que las esporas silvestres. A 100 MPa no fue posible inducir su germinación; sin embargo, una presión de 550 MPa indujo la liberación de ácido dipicolínico y la germinación en esporas sin receptores de germinación incluso cuando éstas no contenían una o dos de las enzimas esenciales para la hidrólisis de la corteza.

Los autores concluyeron que una presión de 100 MPa activa los receptores de germinación, mientras que una presión de 550 MPa abre los canales que liberan el ácido dipicolínico desde el interior de la espora, conduciendo a la germinación.



**Figura 2. Protocolo de extracción de proteína de la cubierta de esporas utilizando octil-β-D-glucopiranosido (OGP) a temperatura ambiente ó urea/dodecil sulfato de sodio (UDS) a 37 °C y 70 °C**

### **Efecto en la conformación de las proteínas y la actividad enzimática**

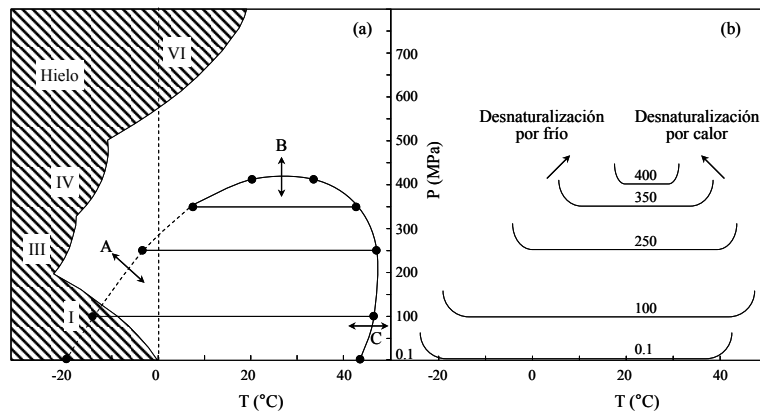
Los cambios estructurales en las proteínas producidos por los tratamientos de alta presión parecen ser diferentes a los causados por los tratamientos de temperatura alta (Mozhaev et al., 1996). Cuando se aplica presión a las proteínas, ocurre un cambio en su volumen que puede ocasionar una desnaturalización. De acuerdo con el principio de Le Chatelier, cuando se aplica presión a una proteína, se suma una restricción al volumen, de tal manera que las reacciones que requieren un cambio negativo en el volumen ( $-\Delta V$ ) serán aceleradas, mientras que las reacciones que requieran un cambio positivo en el volumen ( $+\Delta V$ ) serán inhibidas. Esto significa que las reacciones que se observan comúnmente durante el tratamiento térmico no tendrán lugar durante el tratamiento por alta presión a menos que encuentren un mecanismo alternativo de reacción que implique una reducción en el volumen (Galazka y Ledward, 1996). Por ejemplo, los enlaces disulfuro que estabilizan a las proteínas pueden romperse debido a una oxidación inducida por la presión y la presencia de oxígeno. Sin embargo, las reacciones que necesitan de mayor energía de activación, como la liberación de  $H_2S$  a partir de cisteína, no podrán ocurrir ya que no pueden llevarse a cabo aplicando únicamente presión.

Se han observado efectos reversibles en las proteínas a presiones de 100-200 MPa donde las proteínas oligoméricas se disocian en subunidades, posiblemente por el debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, las estructuras monoméricas se desnaturalizan parcialmente debido a la ruptura de las interacciones hidrofóbicas intramoleculares y de los puentes salinos. A presiones mayores de 200 MPa, muchas proteínas tienden a desnaturalizarse, y puede ocurrir una reasociación de las subunidades a partir de los oligómeros disociados (Balny y Masson, 1993). Después del tratamiento de presión, muchas proteínas regresan a una conformación macromolecular modificada que puede ser similar a la forma nativa, pero no necesariamente idéntica (Galazka y Ledward, 1996). La modificación en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas después de aplicar un tratamiento de presión ( $>300$  MPa) podría inducir la aparición del estado de glóbulo fundido (Chapleau et al., 2004).

La desnaturalización por presión de las proteínas parece favorecer la desestabilización de las interacciones no covalentes en la estructura terciaria (Pittia et al., 1996a, b; Tedford et al., 1999). Estructuralmente, estas proteínas retienen un alto porcentaje de su estructura secundaria; sin embargo, existe un desdoblamiento de la proteína que expone las regiones

hidrofóbicas y podría causar su agregación (Mozhaev et al., 1996; Tedford et al., 1999). Otros investigadores han estudiado la desnaturalización de las cadenas proteicas inducida por presión y la función que desempeñan los grupos -SH y S-S. Generalmente, es desdoblamiento de la proteína durante el tratamiento por alta presión es seguida por la formación de agregados hidrofóbicos estabilizados por enlaces disulfuro después de la aplicación de presión (Funtenberger et al., 1997). Por arriba de 300 MPa y en presencia de oxígeno, puede ocurrir una oxidación de los grupos sulfhidrilo, promoviendo la formación de puentes disulfuro intermoleculares por reacciones de intercambio -SH/S-S mediadas por el ataque nucleofílico de un enlace disulfuro por la forma ionizada S<sup>-</sup> de un grupo -SH (Galazka y Ledward, 1996).

El efecto de la presión y la temperatura sobre la desnaturalización de proteínas ha sido descrito por Hawley (1971) en un diagrama presión-temperatura (Figura 3). La desnaturalización ocurre en la región fuera de la curva elíptica e incluye tres áreas:



**Figura 3. Diagrama presión- temperatura de la desnaturalización de proteínas**

desnaturalización por frío (A), desnaturalización por presión (B) y desnaturalización por calor (C). Los límites inferiores y superiores de la desnaturalización por calor y por frío se aproximan a presiones más altas. La desnaturalización proteica causada por bajas temperaturas fue predicha y después demostrada por Hayashi et al. (1998), y teóricamente puede ocurrir desnaturalización proteica a presiones negativas o alto vacío (Smeller y Fidy, 2002).

Los cambios conformacionales en las proteínas causados por alta presión hidrostática indican que las enzimas en los alimentos podrían sufrir una alteración en su actividad biológica después de ser sometidas a tratamientos de presión. Estudios de la cinética de inactivación de pectinmetilesterasa (Polydera et al., 2004) revelaron que esta enzima sigue una cinética de inactivación de primer orden cuando es sometida a tratamientos de presión (100-800 MPa) y temperatura (30-60°C), resultando en una actividad residual del 5-20%. Se encontró que la presión y la temperatura actúan de manera sinérgica, excepto en los tratamientos de mayor temperatura y menor presión donde se observó un efecto antagónico. Riahi y Ramaswamy (2004) estudiaron la cinética de inactivación de amilasa en zumo de manzana encontrando que su inactivación fue más pronunciada a pH bajo, mayor temperatura, mayor presión y tiempos de tratamiento largos. También encontraron que existe un descenso repentino en la actividad enzimática al aplicar un pulso de presión con tiempo de tratamiento cero. A este fenómeno le llamaron “el efecto del pulso de presión”, el cual aumenta con la presión. Fachin et al. (2002) estudiaron la inactivación de dos poligalacturonasas de tomate con diferente termoestabilidad y encontraron que el efecto de la presión en las enzimas parece no correlacionar con su termoestabilidad. Por último, experimentos realizados en lisozima han demostrado que la presión a la cual inicia la desnaturalización es mayor cuando la presión se aplica más lentamente (Heremans y Wong, 1985; Wong y Heremans, 1988). Esto es muy importante pues revela los efectos dinámicos de la presión que podrían jugar un papel muy importante en la estabilización de alimentos por HPP.

### **Modelos de inactivación microbiana: efecto combinado de temperatura, presión y tiempo**

Los intentos para predecir el efecto combinado de la presión, tiempo y temperatura basados en los modelos de inactivación microbiana de primer orden han resultado inadecuados (e.g., Figura 4). Más aun, en los últimos años se han propuesto alternativas al modelo D-z para estimar la inactivación térmica debido a los problemas de ajuste que presenta el modelo (Figura 5). Por otro lado, es necesario desarrollar modelos para la inactivación de enzimas por presión (Ly-Nguyen et al., 2002, 2003; Fachin et al., 2002; Lauber et al., 2001; Nienaber y Shellhammer, 2001a,b; Indrawati et al., 2001; Ludikhuyze et al., 2000, 1998, 1996; van-den Broeck et al., 2000; Weemaes et al. 1999; Cavaille y Combes, 1995) y para la predicción de los

cambios en los factores de calidad causados por la presión (Minh-Thuy-Nguyen et al., 2003; Mussa y Ramaswamy, 1997; Ratchada-Tangwongchai et al., 2000). En el caso de procesos combinados de presión a temperaturas elevadas pero inferiores a las de esterilización convencional, se necesitan modelos para estimar la transferencia de calor del alimento al medio de presurización durante la compresión/descompresión (Hartmann y Delgado, 2003). Los parámetros para estos modelos necesitan considerar el efecto de los parámetros intrínsecos del alimento sobre las constantes cinéticas (Smelt et al., 2002) incluyendo el efecto de la  $a_w$  reducida (Palou et al., 1997) y del pH, el cual ha demostrado ser dependiente del medio y de la presión (Figura 6).

Los modelos para la cinética de inactivación basados en la función de distribución de probabilidad de Weibull (Cunha et al., 1998) han dado buenos ajustes generando parámetros cinéticos consistentes. Lemos et al. (1999) estudiaron la inactivación de la peroxidasa del rábano, una enzima históricamente considerada como un indicador de los procesos de presión, y encontraron que un grupo de 327 datos cinéticos podía ser descrito adecuadamente por un modelo en el que el parámetro de forma ( $\beta$ ) variaba con la presión pero no con la temperatura, y que el parámetro de velocidad ( $1/\alpha$ ) variaba exponencialmente con la presión y la temperatura de acuerdo al modelo de Arrhenius con una energía de activación independiente de la presión.

Una propuesta alternativa para describir el efecto sobre microorganismos ha sido asumir un nivel de inactivación microbiana independiente del tiempo de tratamiento de presión, denominado presión de muerte instantánea (PMI) (Mussa et al., 1999, 1998), seguido por una cinética de inactivación semilogarítmica convencional durante el tiempo de compresión. Basak et al. (2002) aplicaron este modelo a zumos de frutas inoculados con  $\sim 10^8$  cfu/ml de *L. mesenteroides* y  $\sim 10^6$  cfu/ml de *S. cerevisiae* y sometidos a presiones de 100-400 MPa por 0-120 min a 20°C. La presión necesaria para reducir los valores D por un factor de 10 ( $z_p$ ) en zumo sin concentrar fue similar para *L. mesenteroides* y *S. cerevisiae*, i.e., 137 y 135 MPa, respectivamente, mientras que en zumo concentrado los valores correspondientes fueron 251 y 287 MPa. En leche cruda, el PMI y los valores D para *E. coli* K-12 y la microflora nativa fueron dependientes de la presión y la temperatura (Pandey et al., 2003). A temperaturas de 3 y 21°C, los valores de  $z_p$  para la microflora nativa fueron 227 y 240 MPa, respectivamente, mientras que los volúmenes de activación fueron -2.32 y

$-2.34 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{g}\cdot\text{mol}$ , respectivamente. Los valores correspondientes para *E. coli* a estas dos temperaturas fueron 179 y 205 MPa, y  $-2.95$  y  $-2.75 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{g}\cdot\text{mol}$ , respectivamente.

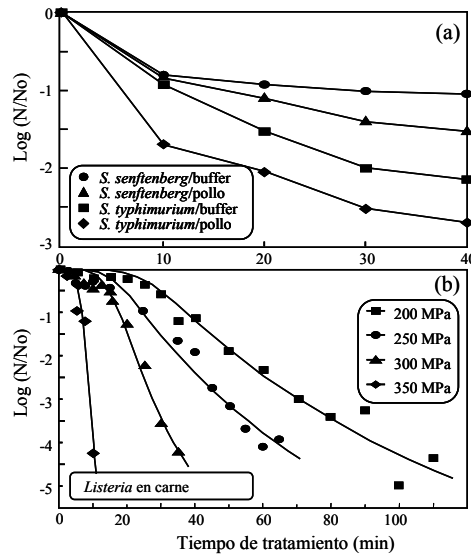


Figura 4. Ejemplos de desviaciones del modelo lineal para inactivación microbiana por presión con respecto a los datos experimentales en alimentos y sistemas modelo

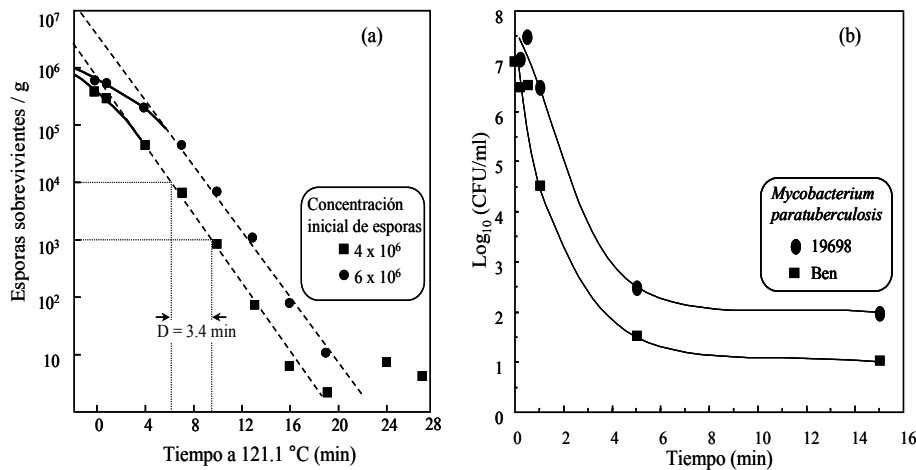


Figura 5. Ejemplos de desviaciones del modelo lineal para inactivación microbiana por presión con respecto a los datos experimentales en alimentos y sistemas modelo



Reyns et al. (2000) encontraron que en el intervalo 120-320 MPa y -4-45°C, *Z. bailii* y *Z. hellenicus* son las dos cepas de levadura más resistentes a la presión. La cinética de inactivación se analizó con modelo bifásico isobárico e isotérmico cuya primera fase con cinética de primer orden cubrió 4-6 ciclos logarítmicos y continuó con una fracción inactivada mucho más lentamente. En muchos casos, ha sido posible explicar este comportamiento bifásico en base a cambios fisicoquímicos del alimento. Utilizando datos reológicos, Dong-Un-Lee et al. (2001) sugirieron que el cambio de fase (coagulación) del huevo entero líquido durante los tratamientos de presión explica la velocidad bifásica de inactivación para *E. coli* K12.

**Nuevos sistemas para evaluar el efecto del HPP: Experimentos *in situ*, en tiempo real, sistemas ópticos modulares y redes neuronales**

Existe poca información acerca del efecto de la presión sobre los microorganismos, la inactivación de enzimas y los cambios en los alimentos. Las técnicas de dicroísmo circular (DC) y de DC con transformada de Fourier, permiten detectar cambios en la estructura secundaria en proteínas y polipéptidos (Kurt, 1996; Price, 1995). Estructuras tales como la "α-helice, hojas β\$ y plegamiento no definido dan lugar a espectros DC con perfiles y magnitudes característicos que permiten determinar la fracción aproximada de cada conformación. En el rango de 250-350 nm, la señal de DC es sensible a los enlaces disulfuro y a los cambios en la estructura terciaria (Kurt, 1996; Venyaminov y Kalnin, 1990; Krimm y Bandekar, 1986).

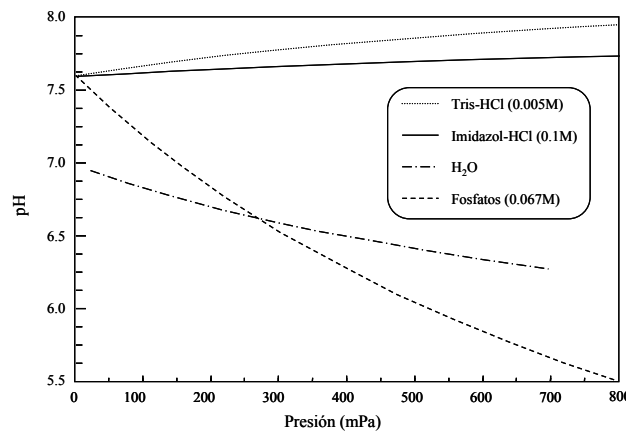


Figura 6. Cambios en el pH del medio inducidos por la presión ([http://www.tu-berlin.de/fb15/institute/lmt1/dahlem/html/body\\_high\\_pressure.html](http://www.tu-berlin.de/fb15/institute/lmt1/dahlem/html/body_high_pressure.html))

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier no genera estructuras de proteína con resolución atómica; sin embargo, proporcionan información útil para monitorear los cambios en la estructura secundaria de las proteínas. La banda I de amida a 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ , refleja principalmente la vibración de estiramiento del enlace C=O y está directamente relacionada con la conformación. Estos modos vibracionales son sensibles a la presencia de puentes de hidrógeno y al acoplamiento del dipolo de transición entre enlaces peptídicos adyacentes, por lo cual, también son sensibles a cambios en la estructura secundaria. La banda II de amida a 1510 y 1580  $\text{cm}^{-1}$ , es más compleja que la banda I de amida y es también sensible a los cambios en la conformación de la proteína. Esta banda resulta del doblamiento del enlace N-H y del estiramiento del enlace C-N (Krimm y Bandekar, 1986). Las moléculas de agua tienen una intensa señal en la región de la banda I de amida, por lo que es necesario medir las muestras en  $\text{D}_2\text{O}$  o que la resonancia del solvente sea extraída digitalmente. Se han llevado a cabo muchos intentos para obtener información cuantitativa de la estructura secundaria de las proteínas a partir de análisis de las bandas I de amida aplicando técnicas de ajuste de curva y reconocimiento del patrón con éxito variable (Byler y Susi, 1986; Byler et al., 1988; Fry et al., 1988; Surewicz et al., 1993). Debido a que las limitaciones potenciales del dicroísmo circular y de espectroscopía de infrarrojo son diferentes, los dos métodos son altamente complementarios y se utilizan en combinación para obtener mayor exactitud en los análisis.

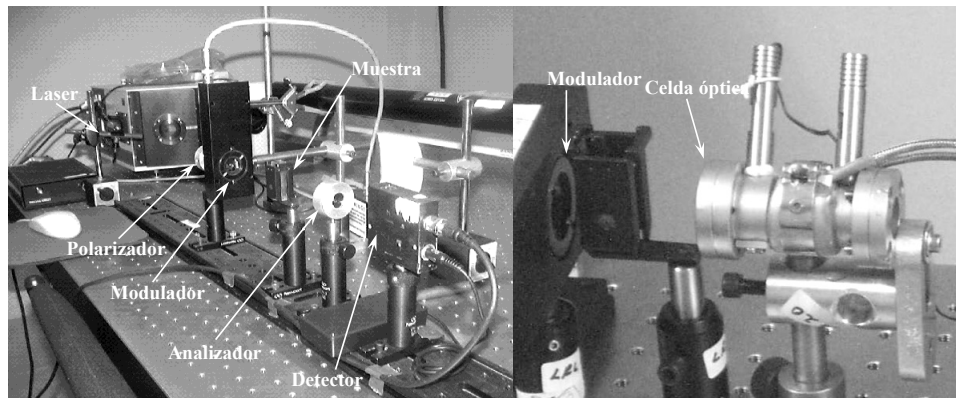
La longitud de onda para la máxima fluorescencia de una proteína depende de la polaridad del ambiente circundante a los residuos de triptófano y tirosina. De esta forma, el centro de masa espectral disminuye cuando la polaridad del medio aumenta, característica que puede ser monitoreada durante la desnaturalización de proteínas. Dumoulin et al. (1999) utilizaron esta técnica para demostrar la inactivación de la carboxipeptidasa Y (CPY) de *S. cerevisiae* por medio de tratamientos de alta presión. Esta enzima vacuolar de 61 kDa contiene 9 residuos de triptófano y 23 de tirosina distribuidos irregularmente a lo largo de su cadena. Las presiones menores a 150 MPa inducen pequeños cambios conformacionales y se conserva un 80% de la actividad catalítica. Esta leve pérdida de actividad enzimática puede deberse a los efectos directos de la presión sobre la catálisis. Las presiones entre 150-500 MPa inducen cambios conformacionales caracterizados por una mayor disminución en el centro de masa espectral de fluorescencia intrínseca y la pérdida total de la actividad catalítica. Los cambios conformacionales en este intervalo de presiones corresponden

probablemente a las alteraciones en el sitio activo. Las presiones mayores de 550 MPa inducen un decremento en el centro de masa espectral de transición de fluorescencia intrínseca.

Son necesarios procedimientos experimentales *in situ* que utilicen las técnicas espectroscópicas anteriormente descritas para aplicarlas al estudio de alimentos y sistemas modelo, ya sea solamente bajo presión o en combinación con calor. Actualmente, un sistema óptico modular está siendo desarrollado en OSU (López et al., 2004) para estudios *in situ* en tiempo real. El prototipo ha sido probado para medir la polarización óptica *in situ* utilizando un modulador fotoelástico y una celda con control de temperatura donde se puede simular el procesado de alimentos (Figura 7). En el diseño de este sistema se ha hecho especial énfasis en la construcción modular del equipo y la adquisición de datos a alta velocidad, la cual ha sido probada hasta alcanzar 200,000 mediciones/s utilizando una tarjeta de adquisición de datos NI 6035E con un panel conector SCXI-1303 (National Instruments, Austin, TX). Una futura ventaja de este sistema que se encuentra en construcción es el control remoto de este instrumento por medio de una interfase de red a través de Internet. Las futuras versiones incluirán el uso de otras técnicas ópticas con un contenedor de presión con ventanas de zafiro y equipado para control preciso de temperatura y presión. Una alternativa puede ser el uso de celdas especiales fabricadas con dos diamantes presionadas entre sí con un sistema mecánico relativamente simple. Las superficies de los diamantes son polígonos de 8 o 16 lados con áreas en el rango de 0.1 a 0.5 mm<sup>2</sup> (0.1 a 0.8 mm de ancho entre lados opuestos), mientras que la superficie trasera del yunque, llamada “mesa”, tiene una superficie 25 a 1000 veces más grande. Este dispositivo es posteriormente montado en una pieza metálica con una sección transversal mucho más grande. De esta forma, con una fuerza moderada actuando en la parte de atrás de esta parte metálica, se pueden alcanzar presiones elevadas en la muestra.

El modelaje del comportamiento térmico de los alimentos durante el tratamiento por alta presión utilizando modelos físicos resulta una tarea complicada, debido a la carencia casi total de valores para las propiedades termofísicas de los alimentos bajo presión. Un estudio para predecir el comportamiento de un alimento sometido a un tratamiento de alta presión fue llevado a cabo por Torrecilla et al. (2004). En este trabajo, se construyó una red neuronal artificial y se evaluó su capacidad para predecir los parámetros involucrados en el procesado de alimentos por medio de presión y temperatura. La red neuronal fue alimentada con un archivo de datos que

contenía la presión aplicada, la velocidad de incremento de presión, la temperatura buscada, la temperatura del tanque de alta presión, la temperatura ambiente y el tiempo necesario para equilibrar la temperatura en la muestra de alimento después de aplicar la presión. La red neuronal fue capaz de predecir esta última variable con gran exactitud. Estos resultados demuestran que el sistema de red neuronal es una alternativa viable para el control del proceso de alta presión ya que no se requiere del conocimiento de las propiedades barofísicas de los productos para realizar el modelaje.



**Figura 6. Prototipo experimental para un sistema de mediciones in-situ y en tiempo real de los efectos de proceso en sistemas modelo de alimentos**

## CONCLUSIONES

La primera comunicación de alimentos tratados por alta presión fue reportada por Hite (1899) quien aplicó tratamientos de 670 MPa por 10 min a la leche y detectó una disminución de 5-6 ciclos logarítmicos en la cuenta microbiana total. Hite comprobó también que la carne sometida a 530 MPa por 1 h tuvo un crecimiento microbiano insignificante después de tres semanas. Posteriormente, Bridgman (1914) demostró la coagulación por presión de la albúmina de huevo. En las últimas dos décadas, se han establecido programas de investigación en la técnica de procesamiento por alta presión en Japón, Europa, América Latina y Estados Unidos. La investigación sobre alta presión en Oregon State University comenzó a

principios de la década de 1990 con estudios sobre procesos a presión constante y con pulsos de presión sobre frutas y zumos (Aleman et al., 1994, 1998). Avances recientes en el equipamiento, la exitosa comercialización de los productos HPP y la demanda del consumidor por alimentos mínimamente procesados inocuos y de alta calidad, han creado un interés considerable en la tecnología del procesamiento por alta presión (Velazquez et al., 2004). Una búsqueda en las bases de datos como Food Science & Technology Abstracts (FSTA) y AGRICOLA dió como resultado ~100 investigaciones publicadas en la década de 1980, cerca de 2000 en la de 1990 y más de 1000 desde el año 2000. Estos trabajos brindarán apoyo a esta tecnología emergente y ayudarán a la creación de nuevas empresas de procesamiento de alimentos por alta presión.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aleman, G.D., Farkas, D.F., Torres, J.A., Wilhelmsen, E. & McIntyre, S. (1994). Ultra-high pressure pasteurization of fresh cut pineapple. *Journal of Food Protection* 57, 931-934.
- Aleman, G.D., Ting, E.Y., Farkas, D.F., Mordre, S.C., Hawes, A.C.O. & Torres, J.A. (1998). Comparison of static and step-pulsed ultra-high pressure on the microbial stability of fresh cut pineapple. *Journal of Science and Food Agriculture* 76, 383-388.
- An, H., Calik, H., He, H., Adams, R. & Morrissey, M.T. (2000). Use of high hydrostatic pressure to control pathogens in raw oysters. *Journal of Shellfish Research* 19, 655-656.
- Balasubramanian, V.M., Balasubramanian, S. & Reddy, N.R. (2001). Effect of pH and temperature on spore inactivation during high pressure processing. *IFT Annual Meeting*, New Orleans, LA.
- Balny, C. & Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International* 9, 611-628
- Basak, S., Ramaswamy, H.S. & Piette, J.P.G. (2002). High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3, 223-231.
- Berry, M.R. Jr., Bradshaw, J.G. & Kohnhorst, A.L. (1985). Heating characteristics of ravioli in brine and in tomato sauce processed in agitating retorts. *Journal of Food Science* 50, 815-822.
- Bignon, J. (1996). Cold pasteurizers Hyperbar for the stabilization of fresh fruit juices. *Fruit Processing* 6(2), 46-48.
- Bridgman, P.W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *Journal of Biological Chemistry* 19(1), 511-2.

- Byler, D.M. & Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469-487.
- Byler, D.M., Farrell, H.M., Susi, H. (1988). Raman spectroscopic study of casein structure. *Journal of Dairy Science* 71, 2622-2629.
- Cabrera-Mattinez, R.M. & Setlow, P. (1991). Cloning and nucleotide sequence of three genes coding for small, acid-soluble proteins of *Clostridium perfringens* spores. *FEMS Microbiology Letters* 77, 127-132.
- Cabrera-Mattinez, R.M., Mason, J.M., Setlow, B., Waites, W.M. & Setlow, P. (1989). Purification and amino acid sequence of two small, acid-soluble proteins from *Clostridium bifermentans* spores. *FEMS Microbiology Letters* 61, 139-144.
- Cano, M.P., Hernandez, A. & de Ancos, B. (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science* 62, 85-88.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J. & Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiology* 17, 633-641.
- Casadei, M.A., Manas, P., Niven, G., Needs, E. & Mackey, B.M. (2002). Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied Environmental Microbiology* 68, 5965-5972.
- Cavaille, D. & Combes, D. (1995). Effect of temperature and pressure on yeast invertase stability: a kinetic and conformational study. *Journal of Biotechnology* 43, 221-228.
- Chapleau, N., Mangavel, C., Compoin, J.P. & Lamballerie-Anton, M. (2004). Effect of high pressure processing on myofibrillar protein structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 66-74.
- Cheftel, J.C. & Culioli J. (1997). Effect of high pressure on meat: A review. *Meat Science* 46, 211-36.
- Cheftel, J.C. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France* 81(1), 13-38.
- Chilton, P., Isaacs, N.S., Manas, P. & Mackey, B.M. (2001). Biosynthetic requirements for the repair of membrane damage in pressure-treated *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 71, 101-104.
- Clery-Barraund, C., Gaubert, A., Masson, P. & Vidal, D. (2004). Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 635-637.
- Clouston, J.G. & Wills, P.A. (1969). Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumillus* spores by hydrostatic pressure. *Journal of Bacteriology* 97, 684-690.
- Crawford, Y.J., Murano, E.A., Olson, D.G. & Shenoy, K. (1996). Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *Journal of Food Protection* 59, 711-715.
- Cunha, L.M., Oliveira, F.A.R. & Oliveira, J.C. (1998). Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the Weibull probability distribution function. *Journal of Food Engineering* 37, 175-191.
- Donsi, G., Ferrari, G. & di Matteo, M. (1996). High pressure stabilization of orange juice: evaluation of the effects of process conditions. *Italian Journal of Food Science* 8(2), 99-106.

- Dumoulin, M., Ueno, H., Hayashi, R. & Balny, C. (1999). Contribution of the carbohydrate moiety to conformational stability of the carboxypeptidase Y. High pressure study. *European Journal of Biochemistry* 262, 475-483.
- Erkmen, O. & Dogan, C. (2004). Effects of ultra high hydrostatic pressure on *Listeria monocitogenes* and natural flora in broth, milk and fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology* 39, 91-97.
- Fachin, D., van Loey, A., Indrawati, Ludikhuyze, L. & Hendrickx, M.E. (2002). Thermal and high-pressure inactivation of tomato polygalacturonase: a kinetic study. *Journal of Food Science* 67, 1610-1615.
- Fairhead, H., Setlow, B. & Setlow, P. (1993). Prevention of DNA damage in spores and in vitro by small, acid-soluble proteins from *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* 175, 1367-1374.
- Fry, D.C., Byler, D.M. & Susi, H. (1988). Solution structure of the 45-residue MgATP-binding peptide of adenylate kinase as examined by 2-D NMR, FTIR and CD spectroscopy. *Biochemistry* 27, 3588-3598.
- Fujii, S., Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, T. & Komatsu, Y. (1996). Characterization of a barotolerant mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of trehalose content and membrane fluidity. *FEMS Microbiology Letters* 141, 97-101.
- Funtenerger, S., Dumay, E. & Cheftel, J.C. (1997). High pressure promotes b-lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* 45, 912-921.
- Gaenzle, M.G. & Vogel R.F. (2001). On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli*. *Systematic Applied Microbiology* 24, 477-485.
- Galazka, V.B. & Ledward, D.A. (1996). Effects of high pressure on protein-polysaccharide interactions. In *Macromolecular Interactions in Food Technology*. N. Parris, A. Kato, L.K. Creamer and J. Pearce (Eds). American Chemical Society, Washington. pp. 113-123.
- Gandhi, K., Torres, J.A., Velazquez, G., Anderson, S.R. & Malencik, D. (2003). Coat protein solubilization methodology to study bacterial spore resistance to heated pressurization. *IFT Annual Meeting*, Chicago, IL.
- Gandhi, K.K. (2002). *Bacillus subtilis* endospore coat protein solubilization methods for studying effects of high pressure processing. Masters thesis submitted to Oregon State University.
- Gola, S., Forman, C., Carpi, G., Maggi, A., Cassara, A. & Rover, P. (1996). Inactivation of Bacterial spores in phosphate buffer and in vegetative cream treated with high pressure. In R. Hayashi & C. Balny, editors. *High Pressure Bioscience and Biotechnology: Proceedings of the International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Kyoto, Japan, November 5- 9, (1995). Elsevier Science Publication, New York, p 253-259.
- Granum, P.E., Richardson, M. & Blom, H. (1987). Isolation and amino acid sequence of an acid soluble spore protein from *Clostridium perfringens* spores. *FEMS Microbiology Letters* 42, 225-230.
- Hartmann, C. & Delgado A. (2003). The influence of transport phenomena during high-pressure processing of packed food on the uniformity of enzyme inactivation. *Biotechnology & Bioengineering* 82, 725-735.

- Hauben, K.J.A, Wuytack, E.Y., Soontjens, C.C.F. & Michiels, C.W. (1996). High-pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. *Journal of Food Protection* 59, 350-355.
- Hawley, S.A. (1971). Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry* 10, 2436-2442.
- Hayakawa, I., Kanno, T., Tomita, M. & Fujio, Y. (1994). Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Science* 59, 159-163.
- Hayakawa, I., Kanno, T., Yoshiyama, K. & Fujio, Y. (1994). Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Science* 59, 164-167.
- Hayashi, R., Kinsho, T. & Ueno, H. (1998). Combined application of subzero temperature and high pressure on biological materials. In *High Pressure, Food Science, Bioscience, and Chemistry*. N.S. Isaacs (Ed). The Royal Society of Chemistry, Cambridge. p. 53.
- Heremans, K. & Wong, P.T.T. (1985). Pressure effects on the Raman spectra of proteins, Pressure induced changes in the conformation of lysozyme in aqueous solutions. *Chemical Physics Letters* 118, 101-14.
- Hite, B.H. 1899. The effects of pressure in the preservation of milk. *Bulletin West Virginia University Agricultural Experiment Station, Morgantown* 58, 15-35.
- Holck, A., Bolm, H. & Granum, P.E. (1990). Cloning and sequencing of the genes encoding acid-soluble spore proteins from *Clostridium perfringens*. *Gene* 92, 107-111.
- Hoover, D.G, Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. & Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology* 43(3), 99-107.
- Indrawati, van Loey, A.M., Ludikhuyze, L.R. & Hendrickx, M.E. (2001). Pressure-temperature inactivation of lipoxygenase in green peas (*Pisum sativum*): a kinetic study. *Journal of Food Science* 66, 686-693.
- Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A. & Ray, B. (2004). Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* 91, 91-98.
- Kalchayanand, N., Frethem, C., Dunne, P., Sikes, A. & Ray, B. (2002). Hydrostatic pressure and bacteriocin-triggered cell wall lysis of *Leuconostoc mesenteroides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3, 33-40.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P. & Ray, B. (2004). Interaction of hydrostatic pressure parameters and bacteriocine-based preservatives on inactivation of spores of *Bacillus cereus*. *IFT Annual Meeting*, Las Vegas, July 12-16.
- Kalentuç, G., Lee, J., Alpas, H. & Bozoglu, F. (2004). Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1116-1122.
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology* 47(6), 156, 158-161.
- Krimm, S. & Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry* 38, 181.
- Kurt, D.B. (1996). Protein Secondary Structure. Course of Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.



- Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H. & Henle, T. (2001). Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *European Food Research Technology* 213, 273-276.
- Lee, D.U., Heniz, V., & Knorr, D. (2001). Biphasic inactivation kinetics of *Escherichia coli* in liquid whole egg by high hydrostatic pressure treatments. *Biotechnology Progress* 17(6), 1020-1025.
- Lee, S., Richard, H. D. & Kang, D. (2002). Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4158-4161.
- Lemos, M.A., Oliveira, J.C., van Loey, A. & Hendrickx, M.E. (1999). Influence of pH and high pressure on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase. *Food Biotechnology* 13, 13-32.
- Lopez, D., Mendoza, P., Kongraksawech, T., Velazquez, G., Huerta, J. & Torres, J.A. (2004). *In-situ* optical polarization measurements for food processes. *IFT Annual Meeting*, Las Vegas, NV.
- Ludikhuyze, L., Claeys, W. & Hendrickx, M.E. (2000). Combined pressure-temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: a kinetic study. *Journal of Food Science* 65, 155-160.
- Ludikhuyze, L., de Cordt, S., Weemaes, C., Hendrickx, M.E. & Tobback, P. (1996). Kinetics for heat and pressure-temperature inactivation of *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *Food Biotechnology* 10, 105-129.
- Ludikhuyze, L., Indrawati, van den Broeck, I., Weemaes, C., Hendrickx, M.E. (1998). Effect of combined pressure and temperature on soybean lipoxygenase. II. Modeling inactivation kinetics under static and dynamic conditions. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* 46, 4081-4086.
- Ly-Nguyen, B., van Loey, A.M., Fachin, D., Verlent, I., Duvetter, T., Vu, S.T., Smout, C. & Hendrickx, M.E. (2002). Strawberry pectin methylesterase (PME), purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. *Biotechnology Progress* 18, 1447-1450.
- Ly-Nguyen, B., van Loey, A.M., Smout, C., Ozcan, S.E., Fachin, D., Verlent, I., Vu-Truong, S., Duvetter, T. & Hendrickx, M.E. (2003). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: a kinetic study. *Journal of Food Science* 68, 1377-1383.
- Mackey, B.M., Forestiere, K., Isaacs, N.S., Stenning, R. & Brooker, B. (1994). The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters Applied Microbiology* 19, 429-432.
- Malone, A.S., Shellhammer, T.H. & Courtney, P.D. (2002). Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Environmental Microbiology* 68, 4357-4363.
- Mason, J.M. & Setlow, P. (1986). Essential role of small, acid-soluble spore proteins in resistance of *Bacillus subtilis* spores to UV light. *Journal of Bacteriology* 167, 174-178.
- McClements, J.M.J., Patterson, M.F. & Linton, M. (2001). The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Food Protection* 64, 514-522.

- Metrick, C., Hoover, D.G. & Farkas, D.F. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of Salmonella. *Journal of Food Science* 54, 1547-1549, 1564.
- Meyer, R.S., Cooper, K.L., Knorr, D. & Lelieveld, H.L.M. (2000). High-pressure sterilization of foods. *Food Technology* 54(11), 67, 68, 70, 72.
- Mills, G., Earnshaw R. & Patterson, M.F. (1998). Effects of high hydrostatic pressure on *Clostridium sporogenes* spores. *Letters Applied Microbiology* 26, 227-230.
- Minh-Thuy-Nguyen, Indrawati & Hendrickx, M.E. (2003). Model studies on the stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* 51, 3352-3357.
- Mozhaev, V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. & Balny, C. (1996). High Pressure effects on protein structure and function. *Proteins, Structure, Function and Genetics* 24, 81-91.
- Mussa, D.M. & Ramaswamy, H.S. (1997). Ultra high pressure pasteurization of milk, kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 30, 551-557.
- Mussa, D.M., Ramaswamy, H.S. & Smith, J.P. (1998). High pressure (HP) destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in raw milk. *Food Research International* 31, 343-350.
- Mussa, D.M., Ramaswamy, H.S. & Smith, J.P. (1999). High-pressure destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* on pork. *Journal of Food Protection* 62, 40-45.
- Nakayama, A., Yano, Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M. & Sakai, K. (1996). Comparison of pressure resistances of spores of six Bacillus strains with their heat resistance. *Applied Environmental Microbiology* 62, 3897-3900.
- Nienaber, U. & Shellhammer, T.H. (2001a). High-pressure processing of orange juice, kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science* 66, 328-331.
- Nienaber, U. & Shellhammer, T.H. (2001b). High-pressure processing of orange juice: combination treatments and a shelf life study. *Journal of Food Science* 66, 332-336.
- Noma, S., Tomita, C., Shimoda, M. & Hayakawa, I. (2004). Response of Echerichia coli O157:H7 in apple and orange juices by hydrostatic pressure treatment with rapid decompression. *Food Microbiology* 21, 469-473.
- Odebo, U. (2001). 'Fresher under pressure'. A fully commercial 'cold pasteurization' method for fruit products. *Fruit Processing* 12(6), 220-221.
- Olsen, S.J., MacKinon, L.C., Goulding, J.S., Bean, N.H. & Slutsker, L. (2000). Surveillance for foodborne disease outbreaks in the United States, 1993-1997. *Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases* 49(SS01), 1-51.
- Oxen, P. & Knorr, D. (1993). Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 26, 220-223.
- Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W.B., Hoover, D., Papafragkou, E. & Setlow, P. (2002). Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied Environmental Microbiology* 68, 3172-3175.

- Palou, E., Lopez-Malo, A., Barbosa-Canovas, G.V., Welti-Chanes, J. & Swanson, B.G. (1997). Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 30, 703-708.
- Pandey, P.K., Ramaswamy, H.S. & Idziak. (2003). High pressure destruction kinetics of indigenous microflora and *Escherichia coli* in raw milk at two temperatures. *Journal of Food Processing Engineering* 26, 265-283.
- Papafragkou, E., Hoover, D.G. & Daniels, W.B. (2002). Inactivation of *Clostridium perfringens* by high hydrostatic pressure. *IFT Annual Meeting*, Anaheim, CA.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. & Gilmour, A. (1995). Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate buffered saline and foods. *Journal of Food Protection* 58, 524-529.
- Pittia, P., Wilde, P.J. & Clark, D.C. (1996). The foaming properties of native and pressure treated beta-casein. *Food Hydrocolloids* 10, 335-342.
- Pittia, P., Wilde, P.J., Husband, F.A. & Clark, D.C. (1996). Functional and structural properties of beta-lactoglobulin as affected by high pressure treatment. *Journal of Food Science* 61, 1123-1128.
- Polydera, A.C., Galanou, E., Stoforos, N.G. & Taoukis, P.S. (2004). Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering* 62, 291-298.
- Post, G. (2001). Fresher under pressure. Non-damaging processes for fruit juices. *Voedingsmiddelentechnologie* 34(20), 35-38.
- Price, N.C. (1995). Protein analysis by circular dichroism. In *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*. R. A. Meyers (Ed.). VCH Press, Weinheim, Vol. 1, p. 384-396.
- Ratchada-Tangwongchai, Ledward, D.A. & Ames, J.M. (2000). Effect of high-pressure treatment on the texture of cherry tomato. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 1434-1441.
- Reddy, N.R., Solomon, H.M., Fingerhut, G.A., Rhodehamel, E.J., Balasubramaniam, V.M. & Palaniappan, S. (1999). Inactivation of *Clostridium botulinum* type E spores by high pressure processing. *Journal of Food Safety* 4, 277-288.
- Reddy, N.R., Solomon, H.M., Tetzloff, R.C. & Rhodehamel, E.J. (2003). Inactivation of *Clostridium botulinum* type A spores by high pressure processing at elevated temperatures. *Journal of Food Protection* 66, 1402-1407.
- Reyns, K.M.F.A., Soontjens, C.C.F., Cornelis, K., Weemaes, C.A., Hendrickx, M.E. & Michiels C.W. (2000). Kinetic analysis and modelling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology* 56, 199-210.
- Riahi, E. & Ramaswamy, H.S. (2004). High pressure inactivation kinetics of amylase in apple juice. *Journal of Food Engineering* 64, 151-160.
- Ritz, M., Freulet, M., Orange, N. & Federighi, M. (2000). Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* 55, 115-119.
- Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M. & Pilet, M.F. (2001). Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied Environmental Microbiology* 67, 2240-2247.

- Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M. & Pilet, M.F. (2002). Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 79, 47-53.
- Roberts, C.M. & Hoover, D.G. (1996). Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 363-368.
- Rogers, N. (1999). High pressure processing. It's time for action. *Food Manufacture* 74(5), 34-36.
- Sangsuk, Oh & Myoung, J. (2003). Inactivation of *Bacillus cereus* spores by high hydrostatic pressure at different temperatures. *Journal of Food Protection* 66, 599-603.
- Sarker, M.R., Carman, R.J. & McClane, B.A. (1999). Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Molecular Microbiology* 33, 946-958.
- Sarker, M.R., Shivers, R.P., Sparks, S.G., Juneja, V.K. & McClane, B.A. (2000). Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Applied & Environmental Microbiology* 66, 3234-3240.
- Sellahewa, J. (2002). Shelf life extension of orange juice using high pressure processing. *Fruit Processing* 12, 344-350.
- Setlow, B. & Setlow, P. (1993). Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Applied & Environmental Microbiology* 59, 3418-3423.
- Setlow, B. & Setlow, P. (1995). Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Applied & Environmental Microbiology* 61, 2787-2790.
- Setlow, B., Setlow, C.A. & Setlow, P. (1997). Killing bacterial spores by organic hydroperoxidases. *Journal Industrial Microbiology* 18, 384-388.
- Setlow, P. & Waites, W.M. (1976). Identification of several unique low molecular weight basic proteins in dormant spores of *Clostridium bifermentans* and their degradation during spore germination. *Journal of Bacteriology* 127, 1015-1017.
- Setlow, P. (1988). Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species, structure, synthesis, genetics, function and degradation. *Annual Reviews of Microbiology* 42, 319-338.
- Setlow, P. (1994). Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology* 176 (Symp Suppl), 49S-60S.
- Setlow, P. (1995). Mechanisms for the prevention of damage to the DNA in spores of *Bacillus* species. *Annual Reviews Microbiology* 49, 29-54.
- Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G. & Knorr, D. (1996). Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science* 61, 308-310.
- Shearer, A.E.H., Dunne, C.P., Sikes, A. & Hoover, D.G. (2000). Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives and mild heat. *Journal of Food Protection* 63, 1503-1510.

- Shellhammer, T.H., Aleman, G.D., McDaniel, M.R. & Torres, J.A. (2003). A comparison of the sensory and chemical properties of orange and apple juices treated with and without high pressure. *IFT Annual Meeting*, Chicago, IL.
- Shimada, S., Andou, M., Naito, N., Yamada, N., Osumi, M. & Hayashi, R. (1993). Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology & Biotechnology* 40, 123-131.
- Smeller, L. & Fidy, J. (2002). The unique elliptic phase diagram of proteins, possibility of negative pressure denaturation. *NATO ARW Liquids Under Negative Pressure* 23, 25.
- Smelt, J.P.P.M., Hellemons, J.C., Wouters, P.C. & van Gerwen, S.J.C. (2002). Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. *International Journal of Food Microbiology* 78, 57-77.
- Stabel, J.R., Steadham, E.M. & Bolin, C.A. (1997). Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4975-77.
- Stewart, C.M., Dunne, C.P., Sikes, A. & Hoover, D.G. (2000). Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA 3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 1(1), 49-56.
- Stewart, M.F., Jewett, F.F., Dunne, C.P. & Hoover, D.G. (1997). Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety* 17, 23-26.
- Styles, M.F., Hoover, D.G. & Farkas, D.F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science* 56, 1404-1407.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H., & Chapman, D. (1993). Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389-394.
- Tedford, L.A., Kelly, S.M., Price, N. & Schaschke, C.J. (1999). Interactive effects of pressure, temperature and time on the molecular structure of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Food Science* 64, 396.
- Tholozan, J.L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M. & Tissier, J.P. (2000). Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology* 88, 202-212.
- Torrecilla, J.S., Otero, L. & Sanz, P.D. (2004). A neural network approach for thermal/pressure food processing. *Journal of Food Engineering* 62, 89-95.
- Torres, J.A. & Velazquez, G. 2004. Commercial opportunities & research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, IN PRESS.
- Ulmer, H.M., Gaenzle, M.G. & Vogel, R.F. (2000). Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TW1.460. *Applied Environmental Microbiology* 66, 3966-3973.
- van-den Broeck, I., Ludikhuyze, L.R., van Loey, A.M. & Hendrickx, M.E. (2000). Inactivation of orange pectinesterase by combined high-pressure and temperature treatments: a kinetic study. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* 48, 1960-1970.

- Velazquez, G., Gandhi, K. & Torres, J.A. (2002). Hydrostatic pressure processing: a review. *Biotam* 12(2), 71-78.
- Velazquez, G., Vazquez, P. & Torres, J.A. 2004. Alta presión en la Industria Alimentaria: I. Consideraciones Comerciales en el Procesamiento de Alimentos por Alta Presión. In *Proceedings of the International Congress of Food Safety*, Reynosa, Tamaulipas, October 12-15, México.
- Venyaminov, S.Y. & Kalnin, N. N. (1990). Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* 30, 1243-1257.
- Watanabe, T., Furukawa, S., Hirata, S., Koyama, J., Ogihara, T. & Yamasaki, M. (2003). Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores by high pressure carbon dioxide treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7124-7129.
- Weemaes, C., Ludikhuyze L., van den Broeck, I. & Hendrickx, M.E. (1999). Kinetic study of antibrowning agents and pressure inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Journal of Food Science* 64, 823-827.
- Wong, P.T.T. & Heremans, K. (1988). Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen deuterium exchange in chymotrypsinogen, a Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry et Biophysics Acta* 956, 1-9.
- Wouters, P.C., Glaasker, E. & Smelt, J.P.P.M. (1998). Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Applied Environmental Microbiology* 64, 509-514.
- Wuytack, E.Y., Boven, S. & Michiels, C.W. (1998). Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Applied Environmental Microbiology* 64, 3220-3224.



## Capítulo 12

### Crecimiento microbiano en alimentos refrigerados

*Microbial growth in refrigerated foods*

**Paredes Daniel<sup>1</sup>, Morales-Blancas Elton<sup>1,2</sup>, Ah-Hen Kong Shun<sup>2</sup>,  
Velazquez Gonzalo<sup>3</sup>, Torres J. Antonio<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Food Process Engineering Group, Oregon State University, USA

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICYTAL), Universidad  
Austral de Chile, Casilla 47, Valdivia, Chile

<sup>3</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos,  
Universidad Autónoma, UAM-Reynosa-Aztlán, México  
E-mail: J\_Antonio.Torres@oregonstate.edu



## CRECIMIENTO MICROBIANO EN ALIMENTOS REFRIGERADOS

### MICROBIAL GROWTH IN REFRIGERATED FOODS

#### Resumen

Desde finales de la década de los 80, los alimentos refrigerados mínimamente procesados han experimentado un crecimiento explosivo y han sido focos de numerosos estudios relacionados a la acotación de los rangos máximos de temperatura de la cadena de frío para mejorar la seguridad alimentaria y garantizar su adecuada vida útil. La vida útil de los productos refrigerados está firmemente determinada por los efectos acumulativos de la temperatura que se use desde los procesos productivos hasta pasar por todas las etapas de almacenamiento y transporte requeridas para su comercialización. En esta cadena de frío se presentan frecuentemente numerosos abusos de temperatura por intervalos de tiempo generalmente desconocidos. La situación ideal es mantener toda la cadena de frío a temperaturas inferiores a 5 °C. Una forma interesante de abordar la problemática de la cadena de frío en forma eficiente y con bajos costos, es con el uso de indicadores de tiempo-temperatura (TTI por sus siglas en inglés); sin embargo, éstos presentan la limitación de responder a la temperatura de la superficie a la que son adicionados y no a la del producto al interior del empaque. Otra forma de abordar el problema es la denominada microbiología predictiva, la cual en base al uso de modelos matemáticos que relacionan la temperatura de almacenamiento con la cinética de crecimiento microbiano permite determinar la vida útil del producto refrigerado. En los últimos años, diversos modelos predictivos y bases de datos han sido implementados en paquetes de software comerciales y gratuitos para que sean utilizados por los profesionales de la industria, academia o gobierno.

## INTRODUCCIÓN

En los mercados desarrollados, la demanda por alimentos refrigerados con una prolongada vida útil ha experimentado un considerable aumento en las últimas décadas. Esto ha sido producto de un cambio en los hábitos alimenticios del consumidor moderno con una tendencia hacia productos mínimamente procesados. Estos requieren generalmente de refrigeración para su distribución y comercialización debido a que su actividad de agua ( $a_w$ ) es típicamente elevada lo que favorece el crecimiento de las bacterias causantes de su deterioro e incrementa el riesgo de que contengan un número elevado de patógenos (Simpson et al., 1989). En muchos países latinoamericanos, se ha observado también este notable aumento en el consumo de alimentos refrigerados. Este incremento se debe a cambios en el estilo de vida que al reflejarse en los hábitos de alimentación han generado una tendencia hacia alimentos refrigerados de mayor conveniencia, portabilidad, valor nutricional y calidad sensorial. El consumo de platos preparados listos para consumir, productos lácteos frescos, alternativas cárneas a partir de proteínas vegetales y lácteas, artículos de pastelería, ensaladas preparadas y un gran número de postres refrigerados ha experimentado un notable aumento. También se observa un fuerte consumo de ingredientes refrigerados que sirven de base para la preparación desde comidas rápidas hasta menús muy sofisticados (Anónimo, 2002). Estos productos son en su gran mayoría alimentos mínimamente procesados, y si son sometidos a tratamientos térmicos, las temperaturas de proceso son moderadas, por lo que contendrían una carga microbiana significativa. Como consecuencia, estos alimentos deben mantenerse bajo estricta refrigeración para que sean seguros y tengan una adecuada vida útil para su comercialización efectiva.

Los alimentos se clasifican de acuerdo a su  $a_w$  en *productos altamente perecibles* ( $\text{pH} > 5.2$  y  $a_w > 0.95$ ) que deben ser almacenados a  $\leq 5$  °C, *productos perecibles* ( $\text{pH}$  de 5.2 a 5.0 y  $a_w$  entre 0.95 y 0.91) que deben ser almacenados a  $\leq 10$  °C, y *productos estables* que no requieren refrigeración y tienen una  $a_w \leq 0.95$  y  $\text{pH} \leq 5.0$  o  $a_w < 0.86$  (Li y Torres, 1993c). Los alimentos mínimamente procesados pertenecen a los primeros dos grupos y han sido focos de numerosos estudios para prolongar su vida útil. Puesto que la temperatura juega un rol crucial en las etapas de procesamiento, distribución y almacenamiento, denominadas en conjunto

como la *cadena de frío*, un buen control de ésta es imprescindible para asegurar una adecuada vida útil (Simpson et al., 1989).

La calidad de un alimento refrigerado se puede determinar microbiológica, sensorial o fisicoquímicamente. Estos métodos presentan problemas asociados con el tiempo y esfuerzo necesario para realizar estas evaluaciones por lo que se han hecho grandes avances en el desarrollo de la microbiología predictiva (Almonacid-Merino et al., 1993; Almonacid-Merino y Torres, 1993; McMeekin et al., 1997). Esta alternativa al muestreo de productos, y su análisis de laboratorio correspondiente, se basa en el uso de modelos matemáticos que relacionan la temperatura de almacenamiento con procesos de transferencia de calor y de cinética de crecimiento para determinar cuando se alcanza la carga microbiana que causa la pérdida de calidad del producto. La predicción de esta condición microbiológica podría mejorar significativamente la distribución y comercialización de los alimentos refrigerados creando una mayor confianza en el consumidor (Simpson et al., 1989; Almonacid-Merino y Torres, 1993; Koutsoumanis, 2001). Una ventaja adicional de esta alternativa es que permite evaluar diferentes escenarios de empaque para aislar el producto de los abusos de temperaturas para poder identificar aquellas con buena relación costo-beneficio. Este enfoque permite mejorar además la toma de decisiones cuando se evalúan innovaciones de los procesos productivos, mejoras a la infraestructura de la cadena de frío y estrategias para el control de situaciones de abuso (Almonacid-Merino y Torres, 1993). A continuación se presentarán estrategias de monitoreo de la cadena de frío y algunos avances en microbiología predictiva.

### **La cadena de frío en la industria de alimentos**

La vida útil de los productos refrigerados está firmemente determinada por los efectos acumulativos de la temperatura de todas las etapas previas a su consumo desde los procesos productivos hasta pasar por todas las etapas de almacenamiento y transporte requeridas para su comercialización. Para la mayoría de los alimentos, se recomienda que la cadena de frío se mantenga dentro de un rango de temperatura entre -1 y 2 °C y que por ningún motivo sea superior a 5 °C (Simpson et al., 1989). Desafortunadamente, los canales de distribución no están siempre bien equipados para esta óptima distribución y expendio de alimentos refrigerados. Los frecuentes abusos de temperatura se reflejan en serios problemas de estabilidad microbiológica. Por ejemplo, en muchos supermercados, los estantes refrigerados se encuentran programados para

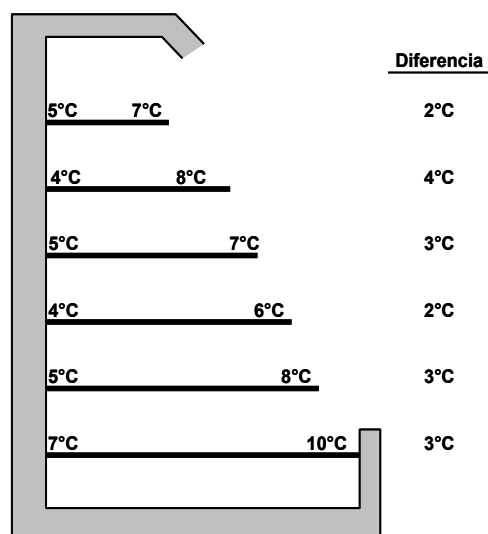
operar entre 7 y 10 °C, y lo que es más grave aún, muchas veces estos equipos se apagan durante la noche.

La extensa introducción de alimentos refrigerados minimamente procesados que se encuentran hoy en el mercado hace urgente la necesidad de acotar los rangos máximos de temperatura de la cadena de frío para poder mejorar la seguridad alimentaria (Corlett, 1988; Mory, 1988). En los EEUU, se han observado grandes mejoras y los supermercados mantienen hoy en día los productos refrigerados en “*pasillos fríos*” mantenidos a unos 5 °C. Por otro lado, los países latinoamericanos están lejos de esta realidad, y si bien los grandes supermercados mantienen pasillos fríos, éstos se encuentran muy por encima de los 5 °C. Esta es una situación preocupante para la industria de alimentos puesto que la principal causal de disminución de la vida útil es el crecimiento de bacterias psicotrópicas. Además debe considerarse el crecimiento de importantes patógenos que presentan crecimiento rápido a temperaturas entre 7 y 10 °C, moderado entre 5 y 7 °C y crecimiento lento a 5 °C tales como *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*. En términos generales la vida útil de un producto se reduce a la mitad si este se encuentra entre 7 y 10 °C (Simpson et al., 1989).

La cooperación entre los productores de alimentos con las empresas de transporte en frío, almacenamiento refrigerado y de supermercados es necesaria para obtener información cuantitativa de las temperaturas que se observan para determinados productos y en mercados específicos. Por ejemplo, en estudios reportados por Simpson et al. (1989) se encontró en las estanterías de los supermercados encuestados que un 60-80% de los productos lácteos evaluados estaba fuera del rango de temperatura recomendado. Las mismas encuestas encontraron que en las estanterías del tipo abiertas, sólo el 23% de los productos se encontraban por debajo de 5 °C mientras que en las cerradas esta fracción alcanzaba al 75%. Se observó además que la distribución de temperatura dentro de las estanterías abiertas presentaba diferencias importantes de acuerdo a la ubicación del producto en ellas (Figura 1).

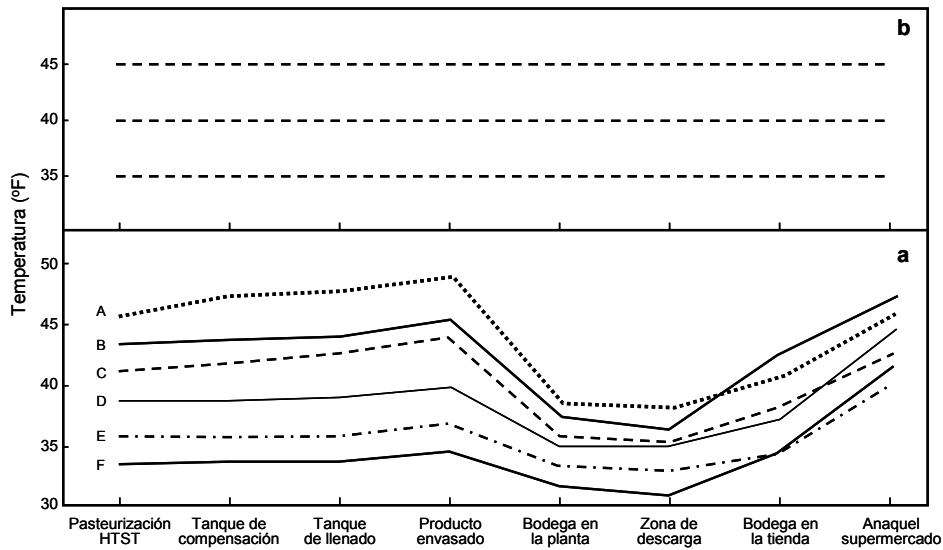
Los problemas de la cadena de frío no se presentan solamente en los supermercados. Este es más bien un problema generalizado producto de una cadena de frío inadecuada y la falta de un organismo de regulación que tome acción sobre la materia. Esto conlleva a grandes pérdidas económicas por deterioro del producto, disminución de su vida útil lo que dificulta su comercialización y también una pérdida importante de confianza del consumidor. Por ello se recomienda realizar estudios que examinen la temperatura en los distintos puntos de la cadena de frío a través de estudios

confidenciales donde cada empresa es asignada un código secreto que solo ella conoce. Esto permite conocer la temperatura de la cadena de frío para determinar las necesidades comunes a todas las empresas, y también si una empresa en particular que debe mejorar su infraestructura con respecto al resto de las encuestadas. Las mejoras a la infraestructura de una empresa individual favorecen al resto pues aumentan la confianza del consumidor en los alimentos refrigerados. Un ejemplo de este tipo de estudio fue reportado por Simpson et al. (1989) para la comercialización de la leche fresca (Figura 2a). En este estudio se observaron comportamientos comunes tales como el enviar a la bodega en la planta, leche envasada no suficientemente enfriada durante su pasteurización y por ello se estaría perdiendo tiempo de vida útil. Se observó también que la temperatura promedio en las bodegas de los supermercados, y por sobre todo en los anaqueles de venta, estaría sobre los valores recomendados. Se pueden establecer metas que el sector trata de mantener tales como una temperatura promedio en toda la cadena de frío de 35 °F (1.7 °C), aceptar que valores individuales alcancen ocasionalmente los 40 °F (4.4 °C) pero que si un punto excede 45 °F (7.2 °C) se tomen medidas extremas como el reprocesamiento o destrucción de la leche fresca afectada (Figura 2b).



**Figura 1.** Diferencias de temperatura en estanterías abiertas típicas de supermercado. Fuente: Torres, 1989.

Thomas y O'Beirne (2000) han destacado el riesgo que implican para el consumidor, los abusos de temperatura en alimentos para consumo directo tales como ensaladas de zanahoria, cebolla y betarraga pre-picadas, ensalada cesar pre-picada y otras diversas mezclas de vegetales. Estos son productos que no reciben tratamientos térmicos antes de ser consumidos. Farber et al. (1998) y Odumeru et al. (1997) señalan un peligro adicional, la presencia en estos productos de *Listeria monocytogenes*, ya que este patógeno puede multiplicarse durante su vida útil (9 días a 4 °C). Por otro lado, los abusos de temperatura en la cadena productiva, distribución y comercialización de la carne de pollo, un producto que se consume cocido, afectarían principalmente la vida útil del producto y tendría menores implicancias para la salud del consumidor cuando este los somete a una adecuada cocción (Russell et al., 1996).



**Figura 2. Ejemplo de cadena de frío para la producción y distribución de leche fresca.**  
Fuente: Simpson et al., 1989.

Otro ejemplo de producto con potencial riesgo por abusos de temperaturas, es el salmón ahumado en frío, envasado al vacío y distribuido refrigerado a <5 °C. Si el salmón ahumado en frío está contaminado con *L. monocytogenes* antes de ser empacado, este patógeno es capaz de crecer

durante el almacenamiento refrigerado del producto con los pertinentes riesgos para el consumidor (Hudson y Mott, 1993). Los productores de pescados y mariscos ahumados en frío no pueden garantizar la inocuidad de estos productos y por ello estudios realizados por la *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* han encontrado este patógeno con una frecuencia del 17% en estos productos. Este problema también se presenta con los productores de pescados y mariscos ahumado en caliente debido a que los mismos estudios han encontrado en ellos una incidencia de 4% para *L. monocytogenes* (Heintz y Johnson, 1998). Las mejores practicas de manufactura para salmón ahumado en frío logran reducir la incidencia de *L. monocytogenes* a <1 ufc/g lo cual explica porque estos productos resultan positivos en los procedimientos de control utilizados por las agencias regulatorias ya que ellos tienen una sensibilidad de 0.04 ufc/g. Las inspecciones realizadas por las agencias regulatorias conducen a frecuentes rechazos de producto causando pérdidas económicas considerables para la industria y son causal de desprestigio para el productor.

La importancia de mantener una baja temperatura de refrigeración durante el almacenamiento de alimentos no debe subestimarse. Las temperaturas bajas extienden el periodo de lag del crecimiento de los microorganismos y disminuyen su velocidad de crecimiento exponencial. Ello permite alargar significativamente la vida útil del producto como se muestra para el caso de la dorada (*Sparus aurata*) y su deterioro por el crecimiento de *Pseudomonas spp.*

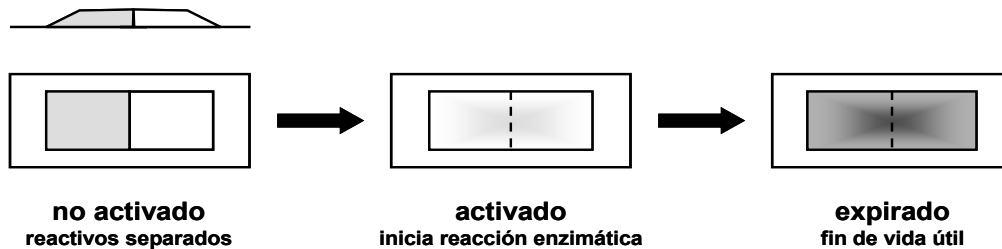
**TABLA 1. Deterioro de la dorada (*Sparus aurata*) por crecimiento de *Pseudomonas spp.* bajo condiciones isotérmicas. (Fuente: Koutsoumanis, 2001)**

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo lag (h)</b>	<b>Vida útil (h)</b>
0	37.2 ± 5.9	145 -255
5	19.9 ± 2.8	98 -152
8	13.0 ± 2.5	49 -71
10	11.8 ± 1.2	45 - 51
15	8.1 ± 0.6	25 – 45

### Indicadores de tiempo-temperatura (TTI)

Una forma interesante de abordar la problemática de la cadena de frío en forma eficiente y con bajos costos, es utilizando los *indicadores de tiempo-temperatura* (TTI por sus siglas en inglés). El funcionamiento de muchos de ellos está basado en una reacción química que produce el cambio de color de un indicador lo que ocurre a una velocidad influenciada por la temperatura. Shimoni et al. (2001) comprobaron que estos indicadores de tiempo temperatura son efectivos para registrar la historia de temperatura que exhibe un determinado alimento refrigerado y dan información sobre el estado de frescura del producto.

Un ejemplo de TTI actualmente en el mercado es Vitsab cuyo costo unitario fluctúa alrededor de US\$ 0.35-1. El funcionamiento del Vitasab ([www.vitsab.com](http://www.vitsab.com)) se basa en reacciones enzimáticas y tiene dos pequeños recipientes para mantener dos soluciones en forma separada hasta que se active el TTI para comenzar el monitoreo de temperatura (Figura 3). Uno contiene una mezcla de enzimas de color verde y la otra es la solución del sustrato de color blanco. Cuando se mezclan, comienza la reacción y a medida que se va consumiendo el sustrato el TTI va tornándose de color amarillo. Una vez alcanzado este color, esto indica que el producto se encuentra al final de su vida útil.



**Figura 3.** Esquema del Vitsab, un ejemplo comercial de indicador tiempo-temperatura. Fuente: [www.vitasab.com](http://www.vitasab.com).

Actualmente Vitsab es usado por British Airways ([www.britishairways.com](http://www.britishairways.com)), con lo que aseguran que los alimentos servidos no hayan presentado abusos de temperaturas y estén dentro del rango de vida útil. También, Vitsab es utilizado para la distribución de lechugas cortadas listas para servir y consumir ([www.rpaulsingh.com](http://www.rpaulsingh.com)).



Una limitación de los TTI es que ellos responden a la temperatura de la superficie a la que son adicionados y no a la temperatura del producto al interior del empaque y que es la que condiciona la calidad sanitaria y vida útil del alimento refrigerado. Esta limitación fue estudiada por Malcata (1990) asumiendo que la temperatura ambiental se aproxima a una función sinusoidal para obtener una expresión basada en tres parámetros adimensionales para estimar el error en la vida útil estimada por el TTI. Cabe mencionar que el error es del tipo conservativo ya que en general la vida útil verdadera es subestimada por el TTI.

### **Efecto del abuso de temperatura en el crecimiento microbiano de alimentos refrigerados**

Los efectos de los abusos de temperatura en la cadena de frío de los alimentos refrigerados con vida útil prolongada han sido evaluados por varios investigadores (Simpson et al., 1989; Almonacid-Merino y Torres, 1993; Li y Torres, 1993a,b; Almonacid-Merino et al., 1993; Almonacid-Merino y Torres, 1993; Hudson y Avery, 1994; Houtsma et al., 1996; McMeekin et al., 1997; Marth, 1998; Thomas et al., 1999; Bovill et al., 2000; Carlin et al., 2000; Koutsoumanis, 2001; Sumner y Krist, 2002; Dalgaard et al., 2002). Las principales causas de disminución de vida útil de los alimentos son la pérdida de calidad sensorial causada por microorganismos y por el crecimiento de patógenos.

Los microorganismos causantes de deterioro y los patógenos pueden clasificarse en psicotrofos y mesófilos. Los primeros crecen durante el almacenamiento prolongado a temperaturas de refrigeración (bajo 7 °C) pero sus temperaturas de máximo crecimiento fluctúan entre 30 y 35 °C. Por otra parte, los mesófilos crecen bien entre 20 y 45 °C con un óptimo entre 30 y 40 °C pero pueden sobrevivir las temperaturas de refrigeración y crecer durante los periodos de abuso de temperatura (Simpson et al., 1989; Almonacid-Merino y Torres, 1993; Marth, 1998; Koutsoumanis, 2001).

Entre los microorganismos causantes de deterioro en productos refrigerados de larga vida útil se destacan las bacterias ácido lácticas (LAB por sus siglas en inglés), *Bacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Chryseomonas luteola* y *Pseudomonas* spp. (Li y Torres, 1993a,b; Zwietering et al., 1996; Membre y Kubaczka, 1998; Marth, 1998; Carlin et al., 2000; Koutsoumanis, 2001). Las LAB son anaerobias facultativas e incluyen *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Pediococcus* spp. El tipo de deterioro que causan depende de si son homofermentativas, produciendo principalmente ácido láctico, o heterofermentativas produciendo una mezcla

de ácidos acético, fórmico y láctico, etanol y dióxido de carbono. Las LAB deterioran una amplia gama de alimentos como leche y productos lácteos, carnes, vegetales, jugos de frutas, productos azucarados, bebidas alcohólicas y productos conservados con vinagre (Marth, 1998). *B. subtilis* y *B. licheniformis* son bacterias aeróbicas facultativas mesófilas presentes en carne, leche, vegetales, pescado, salsas, productos comerciales pasteurizados como puré de brócoli, papas y zanahoria y son importantes causantes de deterioro debido a los abusos de temperatura (Zwietering et al., 1996; Carlin et al., 2000). *B. thermosphacta* es una bacteria aeróbica facultativa presente en la carne de vacuno, cerdo y cordero sellado al vacío, además en carnes procesadas térmicamente como jamón laminado y otros (Simpson et al., 1989; Li y Torres, 1993a,b). En la carne sellada al vacío, la capacidad de deterioro de *B. thermosphacta* varía con el pH y la permeabilidad de oxígeno, provocando desarrollo de limo y producción de sabores y aromas rancios asociados con ácidos grasos de cadena corta (Marth, 1998). *Chryseomonas luteola* es psicotrofa y fitopatógena y presenta la habilidad de crecer en vegetales durante la post-cosecha causando deterioro principalmente en jugos de vegetales (Membre y Kuboczka, 1998). Por último, las *Pseudomonas* spp son aeróbicas y son el principal agente causante de deterioro en alimentos refrigerados. Su crecimiento, al igual que el de otros psicotrófos gram negativos, se ve afectado por la tensión de oxígeno, sal, otros aditivos de alimentos,  $a_w$ , pH y otros. Durante su fase de crecimiento, producen lipasas y proteasas causantes de la degradación de proteínas y lípidos con la consecuente formación de péptidos y ácidos grasos con impacto sensorial indeseable tales como amargura, rancidez, olor a podredumbre y veces una pigmentación verdosa (Li y Torres, 1993b; Marth, 1998; Koutsoumanis, 2001). Los principales patógenos que han sido objeto de estudio para la cuantificación del efecto de los abusos de temperatura incluyen a *Aeromonas hydrophila*, *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* (Buchanan y Klawitter, 1990, 1992; Hudson y Avery, 1994; Houtsma et al., 1996; Buchanan et al., 1997; Thomas et al., 1999; Augustin et al., 2000; Bovill et al., 2000; Jeyamkondan et al., 2001). *A. hydrophila* es anaeróbica facultativa, puede crecer bajo temperaturas de refrigeración y se encuentra principalmente en aguas estancadas, leche cruda, carnes de cordero, aves, porcino y vacuno, mariscos, quesos, lechuga (Marth, 1998; Jeyamkondan et al., 2001). *L. monocytogenes* es una bacteria anaerobia facultativa y ha sido encontrada en el suelo, forraje, salas de procesamiento de alimentos, y en humanos y animales sanos.

La situación ideal de mantener la temperatura de toda la cadena fría de distribución a su óptima temperatura, típicamente entre 0 y 4 °C, para retrasar el crecimiento de los microorganismos, no se cumple siempre, sea por infraestructura deficiente, empaque inadecuado del producto, mal manejo del proceso o por errores de manipulación del producto durante su distribución y comercialización. La realidad es que hay numerosos abusos de temperatura y que duran intervalos de tiempo generalmente desconocidos. El ciclo de crecimiento de una población de microorganismos consta de las fases lag, exponencial, estacionaria y de declinación. Los investigadores de microbiología predictiva se han enfocado en estudiar las primeras dos fases, y los efectos de fluctuaciones de temperatura en la fase lag y log, ya que cuando la población microbiológica llega a la fase estacionaria, el producto ya se encuentra deteriorado.

La fase lag corresponde al período de adaptación del microorganismo a las nuevas condiciones del entorno. Los microorganismos deben realizar un esfuerzo para poder adaptar sus características intracelulares a las nuevas condiciones ambientales. Por ejemplo, la respuesta a la acidez extracelular puede ser la síntesis de una base intracelular. Almonacid-Merino et al. (1993) asumieron que este esfuerzo intracelular corresponde en su mayoría al necesario para aumentar la concentración de RNA, indicador del estado fisiológico de la célula, el cual llega a su máximo valor al entrar a la fase exponencial. La síntesis de RNA se ve incrementada con los abusos de temperatura. Esta es la fase que es conveniente extender para aumentar la vida útil de los alimentos. Koutsoumanis (2001), concluyó que al producirse un aumento de temperatura de 2 a 15 °C y luego disminuirla bruscamente a 2°C se produce una nueva fase lag. Sin embargo, durante cambios graduales de temperatura no aparecen nuevas fases lag y ello podría deberse a que el microorganismo parece adaptarse paulatinamente a las nuevas condiciones de temperatura. La duración de la fase lag puede ser expresada matemáticamente como (Robinson et al., 1998):

$W_n$  es el trabajo necesario de biosíntesis y para los procesos que una célula debe realizar después de la transición del entorno  $E_1$  al entorno  $E_2$ . Por

$$t_{lag} = \frac{W_n}{R}$$

ejemplo, para el caso de *Pseudomonas* en pescado,  $E_1$  correspondería al pescado vivo, con pH neutro (7.0), mientras que  $E_2$  sería el pescado después de sacrificado, con un pH cercano a 6.0. En este caso la diferencia de pH en el músculo correspondería a la cantidad significativamente mayor de ácido

láctico producido durante el rigor mortis. Como los ácidos lipofílicos y el ácido láctico son capaces de penetrar la membrana plasmática de la célula, el trabajo necesario ( $W_n$ ), podría corresponder al realizado por la bomba de protones para elevar el pH interno y permitir el adaptarse a las nuevas condiciones de la carne de pescado. El tiempo que demora la célula en realizar dicho trabajo sería la duración de la fase lag (Koutsoumanis, 2001). Otro ejemplo, sería el trabajo necesario para insaturar las moléculas de fosfolípidos, que actúan como puente de transporte de nutrientes entre la célula y su entorno, porque al bajar la temperatura la fluidez de la membrana decrece por la formación de un gel, que impediría el traspaso de iones y componentes (Beales, 2004).

En general, la dificultad de predecir la fase lag se debería a la falta de conocimiento sobre el estado fisiológico de los microorganismos que contaminan el producto. Esto se refiere a que puede haber células muertas, células que están en pleno estado de crecimiento, dañadas y bajo reparación o dañadas e incapaces de reproducirse (McMeekin et al., 1997). Una vez que las células se han adaptado a las nuevas condiciones del entorno, comienza la fase log o de crecimiento exponencial. Algunos autores prefieren hablar de “temperatura característica” en vez de energía de activación, que proviene de la ecuación de Arrhenius. Sin embargo, Simpson et al. (1989) señalan que este parámetro se ve afectado por las condiciones de crecimiento y la disponibilidad de substrato, más que por los rangos de temperatura de interés. Otro problema de la ecuación de Arrhenius, es que fue diseñada para reacciones de primer orden y no siempre se adecua al complejo sistema biológico de crecimiento microbiano (Simpson et al., 1989).

### **Microbiología predictiva**

Hace 10 años, McMeekin et al. (1993) definió *microbiología predictiva* como una ciencia cuantitativa que evalúa objetivamente el efecto de las operaciones de procesamiento, distribución y almacenaje en la seguridad microbiológica y calidad de los alimentos. Más tarde, los mismos autores usaron la expresión “*ecología microbiológica cuantitativa de los alimentos*”, transformándose en una expresión más genérica. Por otra parte, en un trabajo más reciente, McKeller y Xu (2003) ponen especial énfasis a la descripción mediante modelos matemáticos de las respuestas microbiológicas al entorno del alimento.

En uno de los primeros trabajos de microbiología predictiva, Simpson et al. (1989) evaluaron el crecimiento de *B. thermophacta* en medio líquido bajo cuatro escenarios de simulación de almacenamiento,

temperatura constante de 2 °C, 8 °C y 14 °C, y un ciclo de temperatura de 24 h a 2 °C y 24 h a 14 °C (Figura 4). A 2 °C no se observó crecimiento y a 8 °C, el promedio entre la temperatura mínima y máxima del ciclo de temperatura, el crecimiento fue mucho menor que el observado a la temperatura fluctuante con ciclo de 24 h. Esto demuestra que para predecir el abuso de temperatura no es recomendable el usar la temperatura promedio de almacenamiento puesto que ella subestima el efecto de los abusos de temperatura en la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Un modelo compuesto, considerando el periodo de lag y el de crecimiento exponencial a la temperatura del substrato, permitió predecir de forma más fiable el crecimiento microbiológico y por ende permitiría una buena determinación de la vida útil de un producto almacenado a temperatura variable (Simpson et al., 1989).

Almonacid-Merino y Torres (1993) desarrollaron una herramienta computacional para evaluar los efectos de la duración de los abusos de temperatura en un medio líquido. El uso de esta herramienta validada permitió demostrar que exponer un alimento a una temperatura de abuso (20°C) por solo un 2 - 3% del tiempo de almacenamiento disminuye su vida útil en un 20 - 30%. Koutsoumanis (2001) estudió en dorada (*Sparus aurata*) el comportamiento de la microflora natural en condiciones aeróbicas y con diferentes perfiles de abuso de temperatura. La vida útil del producto en condiciones de temperatura constantes a 0 y 2 °C fue de 10 días, pero bajo condiciones dinámicas de temperatura, la vida útil disminuyó en un 27 a 75% dependiendo de la temperatura máxima del abuso (9 a 16°C).

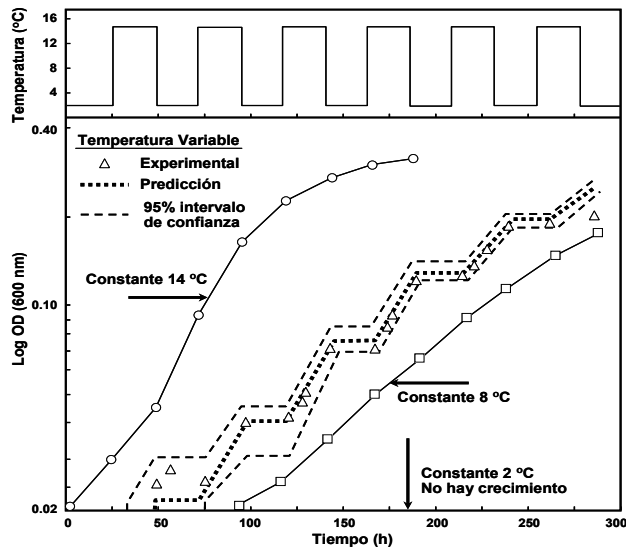


Figura 4. Predicción y determinación experimental de crecimiento microbiano bajo fluctuaciones de temperatura (*Brochothrix thermosphacta* en medio líquido de cultivo). Fuente: Simpson et al., 1989.

### Software para microbiología predictiva

En Gran Bretaña, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentos comenzó en 1988, un programa coordinado para predecir el crecimiento y muerte de bacterias patógenas. Estos datos fueron la base para *Food MicroModel*, uno de los primeros software validado de uso comercial. Posteriormente, se creó la Food Standards Agency (FSA), quién se hizo cargo de financiar estos programas, y en el 2003, esta agencia hizo pública todos los datos usados en el *Food MicroModel* y se comenzó a desarrollar *Growth Predictor*, un software gratuito basado en todos los datos disponibles para bacterias patógenas y utilizando los avances de los años noventa ([www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor](http://www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor)). En forma paralela a los esfuerzos británicos, el Eastern Regional Research Center de la USDA Agricultural Research Service desarrolló el *Pathogen Modeling Programme* (PMP, [www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm](http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm)). Posteriormente, estos dos centros crean una alianza para establecer una base de datos común. Nace entonces *Combase* (*Combined Database of Microbial Response to Food Environments*) una base de datos y modelos disponibles para microbiólogos

de alimentos trabajando en industria, academia o gobierno (www.combase.cc).

## CONCLUSIONES

El muestreo de productos y su posterior análisis microbiológico, físico-químico o sensorial, y la microbiología predictiva son dos alternativas para estimar la calidad de un alimento refrigerado. Este último enfoque permitiría desarrollar métodos asistidos por computador y aplicaciones Web para evaluar los efectos de las combinaciones tiempo-temperatura sobre la velocidad de crecimiento microbiano en los alimentos refrigerados. Las herramientas computacionales predictivas son de suma utilidad para evaluar innovaciones de los procesos productivos, mejoras a la infraestructura de la cadena de frío y mejores estrategias para el control de situaciones de abuso.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almonacid-Merino, S.F. & Torres, J.A. (1993). Mathematical models to evaluate temperature abuse effects during distribution of refrigerated solid foods. *Journal of Food Engineering* 20, 223-245.
- Almonacid-Merino, S.F., David, R.T. & Torres, J.A. (1993). Numerical and statistical methodology to analyze microbial spoilage of refrigerated solid foods exposed to temperature abuse. *Journal of Food Science* 58(4), 914-920.
- Anónimo. (2002). Mercados en crecimiento en el mundo: Alimentos y Bebidas. Reporte Ejecutivo de Noticias de ACNielsen – Servicios globales: Mayo 2002, 22p.
- Augustin, J.C., Rosso, L. & Carlier, V.A. (2000). A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food-Microbiology* 57(3), 169-181.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Safety* 3, 1 – 20.
- Bovill, R., Bew, J., Cook, N., Agostino, M., Wilkinson, N., & Baranyi, J. (2000). Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology* 59(3), 157-165.
- Buchanan, R.L. & Klawitter, L.A. (1990). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. Microbial Food Safety Research Unit, U.S. Department of Agriculture, ARS, Eastern Regional Research Center.
- Buchanan, R.L. & Klawitter, L.A. (1992). The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Echerichia coli* O157:H7. Microbial

Food Safety Research Unit, U.S. Department of Agriculture, ARS, Eastern Regional Research Center.

- Buchanan, R.L., Whiting, R.C. & Damert, W.C. (1997). When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14(4), 313-326.
- Carlin, F., Guinebretiere, M.H., Choma, C., Pasqualini, R., Braconnier, A. & Nguyen-The, C. (2000). Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurized and chilled vegetable purees. *Food Microbiology* 17(2), 153-165.
- Corlett, Jr., D.A. (1988). Microbial issues, safety, shelf life, and distribution. Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, New Orleans, LA.
- Dalgaard, P., Buch, P. & Silberg, S. (2002). Seafood Spoilage Predictor--development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology* 73(2/3), 343-349.
- Farber, J.M., Wang, S.L., Cai, Y. & Zhang, S. (1998). Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh cut vegetables. *Journal of Food Protection* 61(2), 192-195.
- Heinitz, M.L. & Johnson, J.M. (1998). The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *Journal of Food Protection* 61, 318-23.
- Houtsma, P.C., Kant-Muermans, M.L., Rombouts, F.M. & Zwietering, M.H. (1996). Model for the combined effects of temperature, pH, and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and Bologna-type sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 62(5), 1616-1622.
- Hudson, J.A. & Avery, S.M. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cooked mussel tissue under refrigeration and mild temperature abuse. *Journal of Food Safety* 14(1), 41-52.
- Hudson, J.A. & Mott, S.J. (1993). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold smoked salmon under refrigeration mild temperature abuse. *Food Microbiology* 10(1), 61-68.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D.S. & Holley, R.A. (2001). Microbial growth modeling with artificial neural networks. *International Journal of Food Microbiology* 64(3), 343-354.
- Kotsoumanis, K. (2001). Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Applied Environmental Microbiology* 64(4), 1821-1829.
- Li, K-Y. & Torres, J.A. (1993a). Effects of temperature and solute on the minimum water activity for growth and temperature characteristic of selected mesophiles and psychrotrophes. *Journal of Food Processing and Preservation* 17, 305-318.
- Li, K-Y. & Torres, J.A. (1993b). Microbial growth estimation in liquid media exposed to temperature fluctuations. *Journal of Food Science* 58(3), 644-648.
- Li, K-Y. & Torres, J.A. (1993c). Water activity relationship for selected mesophiles and psychrotrophs at refrigeration temperature. *Journal of Food Protection* 56(7), 612-615.
- Malcata, F.X. (1990). The effect of internal thermal gradients on the reliability of surface mounted full-history time-temperature indicators. *Journal of Food Processing and Preservation* 14(6), 481-497.



- Marth, E. (1998). Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety. *Food Technology* 52(2), 57-62.
- McKellar, R.C. & Lu, X. (eds). (2003). Modeling microbial responses in foods. CRC Press, Boca Raton, FL.
- McMeekin, T.A., Brown, J., Kirst, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Ratkowsky, T., Ross, T., Salter, M. & Soontranon, S. (1997). Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases* 3(4), 541-549.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T. & Ratkowsky, D.A. (1993). Predictive microbiology: Theory and application, 340pp. Research Studies Press Ltd., John Wiley & Sons Inc., Taunton, U.K.
- Membre, J.K. & Kubaczka, M. (1998). Degradation of pectic compounds during pasteurized vegetable juice spoilage by *Chryseomonas luteola*: a predictive microbiology approach. *International Journal of Food Microbiology* 42(3), 159-166.
- Mory, C.W. (1988). Distribution of refrigerated foods from producer to consumer: State-of-the-art and the challenges ahead. Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, New Orleans, LA.
- Odumeru, J.A., Mitchel, S.J., Alves, D.M., Lynch, J.A., Yee, A.J., Wang, S.L., Styliadis, S. & Faber, J.M. (1997). Assessment of the microbiological quality of ready to use vegetables for health-care food service. *Journal of Food Protection* 60(8), 954-960.
- Robinson, T.P., Ocio, J.M., Kaloti, A. & Mackey, M. (1998). The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology* 44, 83-92.
- Russell, S.M., Fletcher, D.L., & Cox, N.A. (1996). The effect of temperature mishandling at various times storage on detection of temperature abuse of fresh broiler chicken carcass. *Poultry Science* 75(2), 261-264.
- Shimoni, E, Anderson, E.M. & Labuza, T.P. (2001). Reliability of time temperature indicators under temperature abuse. *Journal of Food Science* 66(9), 1337-1340.
- Simpson, R., Li, K-Y. & Torres, J.A. (1989). A management tool to improve the microbial quality of refrigerated foods. In *Proceedings of the International Conference on Technical Innovations in Freezing and Refrigeration of Fruits and Vegetables*, 9-12 July, University of California, Davis, CA, pp. 171-184.
- Sumner, J. & Krist, K. (2002). The use of predictive microbiology by the Australian meat industry. *International Journal of Food Microbiology* 73(2/3), 363-366.
- Thomas, C. & O'Beirne, D. (2000). Evaluation of impact of short-term temperature abuse on the microbiology and shelf life of a model ready to use vegetable combination product. *International Journal of Food Microbiology* 59(1/2), 47-57.
- Thomas, C., Prior, O. & O'Beirne, D. (1999). Survival and growth of *Listeria* species in a model ready-to-use vegetable product containing raw and cooked ingredients as affected by storage temperature and acidification. *International Journal of Food Science and Technology* 34(4), 317-324.
- Torres, J.A. 1989. Temperature control throughout the distribution system. Proceedings of the IFT Short Course on Minimally Processed Foods, Institute of Food Technologists, June 24-25, Chicago, IL.
- Zwietering, M.H., Wit, J.C., & Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30(1/2), 55-70.

## Capítulo 13

### **Brotos De Enfermedades Transmitidas Por Alimentos**

*Food-Borne Disease Outbreaks*

Acosta-González Rosa Issel, Flores-Gutiérrez Gerardo H.\*

Universidad Autónoma de Tamaulipas,  
Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán,  
Cuerpo Académico de Ciencias de la Salud y Red Interinstitucional de Salud  
de la Universidad Autónoma de Tamaulipas  
Correo electrónico: ghflores@uat.edu.mx

## **BROTOS DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS**

### **Resumen**

En los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos un patógeno utiliza estos últimos para su dispersión. La investigación epidemiológica para controlarlos se basa en: 1) definición y confirmación de casos mediante hallazgos clínicos y de laboratorio, para determinar las características de los individuos que se incluirán y excluirán de estudios posteriores; 2) definir antecedentes epidemiológicos para decidir si realmente es un brote; 3) obtener medidas epidemiológicas para construir una curva epidémica; 4) generar una hipótesis del inicio del brote y comprobarla estadísticamente utilizando estudios observacionales; 5) coleccionar muestras para identificar el agente implicado, usando técnicas diagnósticas sensible y específicas; 6) establecer medidas de control para evitar la aparición de casos nuevos, pero teniendo en cuenta posibles repercusiones económicas y de opinión pública. Aunque estos procedimientos se encuentran listados en un orden lógico, en la mayoría de estos brotes algunos de ellos se realizan de manera simultánea.

### *FOOD-BORNE DISEASE OUTBREAKS*

### **Abstract**

The food-borne disease outbreaks are those in which a pathogen uses any kind of food to reach the hosts. The epidemiological investigation for controlling these outbreaks is based in: 1) definition and confirmation of cases using clinical and laboratory findings; these cases will be included or excluded from subsequent studies; 2) define the epidemiological background, which can help to decide if there is an outbreak or not; 3) construct an epidemic curve, using some epidemiological patterns; 4) generate an hypothesis concerning the beginning of the outbreak, and statistically probe it using observational studies; 5) collect samples for identifying the associated pathogen by means of sensitive and specific diagnostic techniques; 6) implement control measures to avoid new cases, considering the possible economic and public opinion. Despite these steps and procedures are listed in a logical order, some of them are simultaneously carried out in many of the food-borne outbreaks.

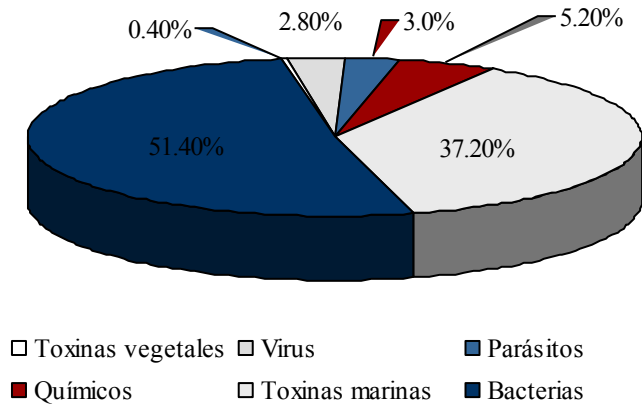
## INTRODUCCIÓN

La importancia que tiene el control de los alimentos con el fin de evitar problemas de salud pública es una actividad que ha sido reconocida ya desde la segunda mitad del siglo XIX, la cual en un principio era supervisada y regulada por autoridades sanitarias y médicos cirujanos (Elvbakken, 2001); sin embargo, fue a finales de la década de 1940 e inicio de 1950 cuando los médicos veterinarios, mediante la creación de la disciplina de la salud pública veterinaria, incursionaron en el área de la inocuidad de los alimentos apoyando de esta manera las actividades tendientes a proteger aspectos relacionados con la salud y el consumo de alimentos en las poblaciones humanas (FAO, 2001; Held y Gregory, 1992; Schwabe, 1991).

Las actividades de los médicos veterinarios relacionadas con la inocuidad de los alimentos incluyen, además de controlar las enfermedades zoonóticas de origen alimentario, asegurar la higiene de los alimentos y controlar el uso y presencia de sustancias tóxicas (Lathers, 2002), haciendo énfasis en la salud del hato en lugar de la salud individual de los animales y en la higiene en las unidades de producción en lugar de las plantas de sacrificio (Lipman et al., 2002). Estas actividades han sido consideradas por diversos organismos internacionales, entre los que se encuentran la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud, como unas de las más importantes de los médicos veterinarios (Casas Olascoaga et al., 1991). Sin embargo, en la actualidad algunas disciplinas profesionales han desplazado las actividades de los médicos veterinarios relacionadas con la inocuidad de los alimentos de origen animal, entre las que se encuentran los bioquímicos en alimentos y los químicos farmacéuticos biólogos, por mencionar solamente algunas de ellas.

Las enfermedades transmitidas por alimentos se definen como aquellas en las que los agentes de enfermedad pueden llegar al hospedador utilizando los alimentos como medio de dispersión. Las diferentes formas en las que los alimentos de origen animal pueden llegar a generar problemas de salud pública ocasionando brotes, se dividen básicamente en la presencia de agentes infecciosos y contaminantes no biológicos en los alimentos, los cuales pueden aparecer durante el proceso de producción, sacrificio y procesamiento o empaquetado de los alimentos de origen animal.

En la actualidad, se considera que existen entre 150 y 200 enfermedades animales que cuentan, la mayor parte de ellas, con posibilidades de ser transmitidas a través del consumo de sus productos. Los agentes infecciosos que se pueden encontrar en los alimentos de origen animal se subdividen a su vez en bacterias, parásitos y protozoarios y, virus. Algunas de las principales bacterias que se presentan y relacionan con enfermedades transmitidas por alimentos son *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shigella* spp., *Streptococcus* spp., *Brucella* spp. y *Escherichia coli*, identificando su presencia en alimentos como son carne y productos cárnicos, leche y lácteos, pollo y pescados y mariscos (Flores-Gutiérrez, 2002; Contreras-Hinojo et al., 2004). La presencia de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Diphyllobothrium* spp., *Eustrongylides* sp., *Acanthamoeba* spp. y otras amibas de vida libre, *Toxoplasma gondii*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Trichinella spiralis*, han sido reportados como parásitos y protozoarios presentes en alimentos de origen animal, llegando a ellos en la mayoría de los casos como contaminación durante su manejo y procesamiento. De igual manera los virus que ocasionan problemas graves de salud, Hepatitis A, Hepatitis E, Rotavirus y el virus de Norwalk, aunque no son patógenos propios de los animales estos llegan a los alimentos como consecuencia de malas prácticas de higiene durante el procesamiento por parte del personal que es portador de estos patógenos. A pesar de la existencia de diferentes microorganismos como contaminantes de los alimentos, son las bacterias las que se han identificado en la mayoría de los casos de enfermedades y brotes como consecuencia de la presencia de alimentos contaminados en el continente americano (Figura 1).



**Figura 1. Principales contaminantes y agentes patógenos identificados en alimentos (Flores-Gutiérrez, 2002)**

Entre los contaminantes no biológicos que en un momento dado se pueden encontrar en un alimento de origen animal, se encuentran agentes físicos y químicos. La clasificación de los agentes físicos se refiere a sustancias extrañas (piezas o porciones de metal o madera, entre otros); sin embargo, dado que estos agentes extraños son fácilmente identificados, pueden ser retirados durante el procesamiento de los alimentos.

Los agentes químicos presentes en los alimentos de origen animal principales comprenden residuos de drogas de uso veterinario, antibióticos, antihelmínticos, insecticidas y anabólicos, químicos industriales, metales pesados y pesticidas, los cuales se encuentran relacionados con carne, leche y huevo; debido a esta circunstancia, la toxicología en general, y la toxicología veterinaria en particular, también deben incluirse dentro de las disciplinas relacionadas con la inocuidad de los alimentos. Sin embargo, los contaminantes químicos antes mencionados solo se encuentran en cantidades traza en los alimentos, los problemas de salud pública relacionados con su presencia solo se presentan cuando existe una exposición aguda a los mismos, pero sí afectan el comercio internacional y la confianza de los consumidores. En los alimentos de origen animal se pueden encontrar cantidades mínimas de diversos antibióticos, los cuales pueden contribuir a generar resistencia bacteriana hacia los mismos, llegando a los humanos a

través del consumo de productos y subproductos procedentes de dichos animales; sin embargo, esta relación no ha sido ampliamente comprobada. A pesar de lo anterior, algunos antibióticos se han identificado en alimentos de origen animal, entre los que se encuentran la estreptomicina, penicilina, oxitetraciclina, neomicina y sulfametazina.

Una vez que el contaminante, sin importar su clasificación, ha llegado al alimento y este es consumido viéndose implicados varios individuos y en el que uno o varios alimentos actuaron como vehículo del agente etiológico, se presenta un brote de enfermedades transmitidas por alimentos o brotes de enfermedades alimentarias. Estos conceptos relacionados con la inocuidad de los alimentos han tomado una nueva relevancia como consecuencia de los relativamente recientes brotes de encefalopatía espongiiforme bovina (Elvbakken, 2001).

Generalmente, se considera que el número de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos que se reportan corresponde a una fracción del número real de brotes que pudieran estar ocurriendo en un momento dado. Esta situación obedece a diferentes factores, entre los que se encuentran los siguientes:

- En algunos casos, las enfermedades ocasionadas por los patógenos que se pudieran encontrar como contaminantes de los alimentos, generalmente de origen bacteriano, son auto-limitantes; es decir, que su curso puede en un momento dado resolverse sin la administración de tratamiento.
- El número de individuos implicados así como el lugar en el que se presentan los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos: los brotes que implican una mayor cantidad de individuos o aquellos que se presentan en lugares públicos o altamente concurridos, son más fáciles de reconocer y reportar en comparación con los que solamente implican un número reducido de individuos o los que se presentan en lugares privados, como es el caso de los hogares.
- La gravedad de los casos presentes en el brote es determinante debido a que, obviamente, es más fácil reconocer aquellos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los que se presentan casos de fatalidad.

Una vez que se presenta un brote de enfermedades transmitidas por alimentos y este es reconocido por los responsables de su control, la manera en que se investiga y controla el mismo se fundamenta en dos partes

principales, la identificación del agente etiológico implicado mediante el uso de técnicas de diagnóstico confiables y, el estudio de diversos indicadores epidemiológicos. Dado que existe un gran número de agentes etiológicos con posibilidades de ser transmitidos a través del consumo de alimentos, en este capítulo solamente se revisará principalmente la manera en que se aborda y realiza la investigación epidemiológica de un brote, entre la que también se incluye la evaluación y estrategias de uso de las técnicas diagnósticas implicadas en estas investigaciones.

## **INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE BROTES DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS**

La importancia que la investigación epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos posee en el ámbito de la salud pública, radica en el hecho de poder identificar y eliminar las fuentes de exposición de los agentes etiológicos involucrados, para poder evitar de esta manera la presentación de nuevos casos de enfermedad y, dictar las medidas necesarias que pudieran evitar la presentación futura de brotes similares. Dentro de las disciplinas profesionales implicadas en la investigación de estos brotes, aparentemente pudiera hacer se cargo una sola de las que fueron mencionadas anteriormente; sin embargo, se requiere del apoyo y participación conjunta de otras disciplinas, entre las que se pueden mencionar algunas de las siguientes: médicos cirujanos, especialistas en nutrición, matemáticos y estadísticos, economistas e ingenieros especialistas en geografía e informática, dependiendo de los casos específicos, y solo por mencionar algunas de las disciplinas requeridas.

A pesar de que la investigación de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos se realiza como cualquier investigación epidemiológica, existen ciertas características particulares que complican el estudio y control de este tipo de brotes, entre las que se encuentran las siguientes: la investigación de estos brotes se debe realizar al mismo tiempo en que está ocurriendo el brote, de lo contrario las muestras clínicas y de alimentos necesarias son prácticamente imposibles de obtener; dada esta primera situación relacionada con la investigación simultánea durante la ocurrencia del brote, existe una urgencia por encontrar y eliminar el origen del mismo para evitar la presentación de nuevos casos, además de la presión legal y económica existente; cuando el brote implica un gran número de individuos o se presentan casos de fatalidad, es común que los medios de



comunicación difundan la noticia aumentando la urgencia de controlar el brote, pero sesgando la información que se puede obtener por parte de los individuos implicados.

El primer paso necesario en la investigación epidemiológica de un brote es el reconocimiento del mismo; para este caso específico de tipo de brotes, el primer reporte acerca de la ocurrencia del mismo lo proporcionan los individuos que se encuentran directamente implicados en el mismo o personas cercanas a ellos. Una vez que se ha reconocido la existencia de un brote, existen algunos puntos esenciales que se deben atender al realizar su investigación. Entre estos puntos se encuentran la definición de caso y la confirmación de la existencia de los mismos, establecer los antecedentes epidemiológicos del brote, decidir si realmente se trata de un brote lo cual se logra mediante los dos puntos anteriores, realizar un estudio de epidemiología descriptiva, generar y comprobar una hipótesis relacionada con el inicio del brote, realizar una investigación ambiental colectando y probando muestras clínicas y de alimentos necesarias para la determinación de casos y el origen del brote y, implementar medidas de control (Reingold, 1998). A continuación se describirán separadamente cada uno de los puntos mencionados, los cuales a pesar de que se encuentran listados en orden lógico, cuando se presentan los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos dichos puntos pueden ocurrir y deben atenderse de manera simultánea.

#### Definición y confirmación de casos

La definición de casos es decir los individuos que presentan la enfermedad que se encuentra bajo estudio en la presentación de un brote, y por ende la determinación de los criterios de exclusión, se realiza de una manera sencilla en algunos brotes; por ejemplo, en un brote de gastroenteritis de origen bacteriano un caso confirmado mediante técnicas de laboratorio se puede definir como la identificación positiva de una muestra ya sea clínica o de alimentos o bien, la definición clínica de estos casos se puede definir como la aparición de nuevos cuadros clínicos de diarrea. En algunos brotes, la definición de los casos se vuelve más compleja cuando se trata de enfermedades relativamente nuevas. Una ventaja adicional que se tiene al definir los casos de manera correcta se presenta cuando en el brote existe un gran número de individuos implicados y se requiere la realización de un

estudio de casos-controles para determinar los factores de riesgo implicados en la presentación de la enfermedad, ya que una definición estricta de los casos permitirá reducir el número de individuos bajo observación.

La manera en que se confirman los casos depende básicamente de los hallazgos clínicos y de laboratorio. El primer paso consiste en una observación detallada de los hallazgos clínicos, ya sean estos realizados mediante la exploración directa de los individuos involucrados en el brote o bien mediante el análisis de la información contenida en los registros médicos. Una vez que se han analizado los hallazgos clínicos, estos deben ser confirmados mediante el análisis de las muestras biológicas adecuadas haciendo uso de técnicas de laboratorio confiables. La concordancia que debe existir entre las manifestaciones clínicas ocasionadas por el agente etiológico identificado mediante el diagnóstico de laboratorio, es una condición que debe existir para descartar la posible clasificación errónea de los casos.

**Establecimiento de los antecedentes epidemiológicos del brote de enfermedades transmitidas por alimentos**

Una vez que se han definido correctamente las características que deben presentar los individuos para que puedan ser considerados como casos implicados dentro de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos, se debe realizar una serie de actividades tendientes a determinar, primeramente, si la frecuencia con que se presentan los casos realmente excede el número que normalmente se esperaría, para que de esta manera se pueda considerar la presencia de un brote; este exceso en el número de casos varía de acuerdo con características propias de cada brote relacionadas principalmente con el tamaño de la población en donde se supone que está ocurriendo, mientras más pequeña sea la población como en el caso de un consultorio o una comida compartida en un establecimiento o en el hogar es más fácil reconocer la presencia de un brote, a diferencia de lo que ocurriría en el caso de una ciudad o región. Posteriormente, estas actividades ayudarán a definir los patrones temporales y espaciales del brote y, encontrar más casos para incluirlos en los estudios epidemiológicos requeridos en la investigación del brote. Los antecedentes epidemiológicos del brote se ven reforzados cuando existen y se pueden utilizar técnicas de diagnóstico confiables de otra manera, la investigación requiere de un trabajo relacionado con la revisión de antecedentes clínicos más laborioso.

## Epidemiología descriptiva de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos

Mediante la determinación de las medidas epidemiológicas descriptivas adecuadas se logra la definición de las determinantes del hospedador que se están presentando en la ocurrencia del brote, algunas de ellas corresponden con la edad, sexo, tipo racial, lugar de residencia, ocupación, viajes recientes o asistencia a eventos en donde se comparten alimentos, las cuales se definen como tasas de enfermedad ajustadas. Estas medidas epidemiológicas que se relacionan con la cuantificación de enfermedades, en el caso específico de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, la tasa que generalmente se debe calcular es la tasa de ataque, ya sea esta cruda o ajustada, la cual se describirá más adelante.

Después de haber determinado que individuos pueden ser considerados como casos en un brote de enfermedades transmitidas por alimentos y las tasas necesarias, la manera más sencilla de encontrar estas determinantes se realiza mediante curvas epidémicas en las que se grafica el tiempo de aparición de los casos relacionando con algunas características mencionadas anteriormente, logrando de esta manera los primeros pasos para emitir una hipótesis relacionada con las causas o fuentes de la aparición del brote; para el caso de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos esta información es relativamente fácil de obtener.

### Generación y comprobación de hipótesis

Una hipótesis relacionada con la aparición de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos debe incluir las fuentes y rutas de transmisión de los patógenos implicados, las cuales en algunos brotes pueden resultar obvias pero siempre se deben confirmar mediante el análisis de diferentes muestras clínicas y de alimentos. Para poder tener una hipótesis adecuada, se deben analizar conjunta y cuidadosamente diversas fuentes de información que han sido generadas de manera previa, entre las que se incluyen variables epidemiológicas, microbiológicas, veterinarias, de alimentos y aquellas relacionadas con la ecología de la enfermedad, y relacionarlas con la aparición de un brote actual. Otra forma en la que se puede obtener información para la generación de la hipótesis, es mediante la

realización de entrevistas con los individuos implicados en el brote o con personas relacionadas con ellos, lo cual es común de realizar en los brotes para obtener un listado de los alimentos y sus ingeridos en un periodo de tiempo dado y sus características, principalmente cuando al realizar un estudio preliminar de caso-control no se pueden evidenciar de manera correcta todos los factores de riesgo involucrados en el brote.

La comprobación de la hipótesis que ha sido generada acerca del inicio del brote debe ser comprobada mediante estudios de epidemiología analítica, entre los que se incluyen los estudios seccionales-cruzados, estudios de caso-control y estudios de cohortes. Estos estudios se clasifican como observacionales debido a que no se modifican las variables que se encuentran bajo estudio en la presentación del brote. A pesar de que dichos estudios comparte el objetivo común de relacionar la exposición a un factor dado y la presencia de la enfermedad en el brote, cada uno de ellos presenta características y aplicaciones particulares (Tabla 1).

**Tabla 1. Características de los estudios observacionales utilizados en la investigación de brotes transmitidas por alimentos**

Estudio	Temporalidad	Individuos involucrados	Análisis estadístico
Seccional-cruzado o transversal	Realizados en un momento concreto en el tiempo	Un grupo de individuos enfermos y otro de sanos, que se encuentran expuestos y no expuestos a un factor	Razón de prevalencias
Caso-Control	Prospectivo o retrospectivo	Un grupo de casos (individuos enfermos) comparado y un grupo de controles (individuos sanos) comparados con la exposición a factores de riesgo	Razón de desventajas
Cohortes	Prospectivo o retrospectivo	Un grupo de individuos expuestos a un factor de riesgo y un grupo no expuesto	Riesgo relativo

Para poder realizar los análisis estadísticos requeridos por cada estudio epidemiológico en particular, es necesario hacer uso de una tabla de contingencia de doble entrada en la que se realiza el acomodo de la información de acuerdo a la clasificación de los grupos de individuos involucrados en el estudio, así como también dependiendo de la exposición a

los factores bajo estudio, en este caso en particular, el consumo de alimentos sospechosos de haber iniciado el brote (Tabla 2).

**Tabla 2. Tabla de contingencia de doble entrada utilizada en el análisis estadístico de los estudios observacionales en la investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos**

	Individuos expuestos		Total
	Sí	No	
Enfermos (Casos)	A	B	M1 = A + B
Sanos (Controles)	C	D	M0 = C + D
Total	N1 = A + C	N0 = B + D	T

De acuerdo con lo descrito en la Tabla 1, cada estudio epidemiológico posee un análisis estadístico en particular, los cuales se describen en la Figura 2.

**Figura 2. Cálculo de la razón de prevalencias, riesgo relativo y razón de desventajas utilizadas en el análisis estadístico los estudios observacionales en la investigación de brotes de enfermedades alimentarias**

$$\frac{\left(\frac{A}{N1}\right)}{\left(\frac{B}{N0}\right)} = \frac{A * N0}{B * N1} = \frac{A * (B + D)}{B * (A + C)}$$

Razón de prevalencias y riesgo relativo

$$\frac{\left(\frac{A}{C}\right)}{\left(\frac{B}{D}\right)} = \frac{A * D}{B * C}$$

Razón de desventajas

La interpretación que se hace de los resultados obtenidos una vez que se han realizado los cálculos anteriores, se interpreta de manera similar para los tres tipos de estudios: si el valor obtenido es igual a uno, no existe una relación entre la presentación de los casos en el brote y los alimentos que consumieron dichos casos como un factor de riesgo; si el valor obtenido es mayor que uno, el factor analizado se considera como un factor de riesgo, es decir que el alimento consumido puede ser considerado como la fuente del brote; si el valor obtenido es menor que uno, entonces el factor que se encuentra en evaluación puede ser considerado como un factor de protección.

Otra opción con que se cuenta para la determinación del alimento implicado en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, la constituyen el cálculo de las tasas de ataque y la construcción de una tabla de tasas de ataque. La tasa de ataque es una tasa de incidencia que se utiliza cuando la presentación de las enfermedades ocurre en un periodo corto de tiempo, como es durante el curso de un brote y especialmente los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. La tasa de ataque se define como el número de casos nuevos presentados en un periodo de tiempo dado, dividido entre el número de individuos que se encontraban al riesgo al momento de iniciar el brote es decir quines consumieron el alimento del cual se sospecha en la hipótesis generada como aquel que dio origen al brote, lo cual se expresa de manera porcentual; este cálculo se obtiene de la siguiente forma:

$$\text{Tasa de ataque} = \frac{\text{Número de individuos enfermos al consumir un alimento}}{\text{Número total de individuos que consumieron el mismo alimento}} * 100$$

Una vez que se tiene la información necesaria para el cálculo de las tasas de ataque, una tabla de tasas de ataque se construye de la siguiente manera (Tabla 3).

**Tabla 3. Ejemplo para la construcción de una tabla de tasas de ataque utilizada en el análisis estadístico en la investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos**

	Individuos que consumieron el alimento			Individuos que no consumieron el alimento			Diferencia entre tasas de ataque
	Número de enfermos (A)	Número total (B)	Tasa de ataque (%) (C)	Número de enfermos (D)	Número total (E)	Tasa de ataque (%) (F)	
Alimento <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	(A <sub>1</sub> /B <sub>1</sub> )*100	D <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	(D <sub>1</sub> /E <sub>1</sub> )*100	(C <sub>1</sub> - F <sub>1</sub> )
Alimento <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	(A <sub>2</sub> /B <sub>2</sub> )*100	D <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	(D <sub>2</sub> /E <sub>2</sub> )*100	(C <sub>2</sub> - F <sub>2</sub> )
Alimento <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	(A <sub>3</sub> /B <sub>3</sub> )*100	D <sub>3</sub>	E <sub>3</sub>	(D <sub>3</sub> /E <sub>3</sub> )*100	(C <sub>3</sub> - F <sub>3</sub> )
•	•	•	•	•	•	•	•
•	•	•	•	•	•	•	•
•	•	•	•	•	•	•	•
Alimento <sub>n</sub>	A <sub>n</sub>	B <sub>n</sub>	(A <sub>n</sub> /B <sub>n</sub> )*100	D <sub>n</sub>	E <sub>n</sub>	(D <sub>n</sub> /E <sub>n</sub> )*100	(C <sub>n</sub> - F <sub>n</sub> )

Cuando se da el caso en que se deben analizar de esta manera una gran cantidad de alimentos, una opción viable es eliminar del diseño de la tabla de tasas de ataque, aquellos alimentos que fueron consumidos por la totalidad de los individuos implicados o aquellos que provinieron del mismo origen, como es el caso de alguna fuente de agua. Después de haber construido y realizado los cálculos necesarios para una tabla de tasas de ataque, la interpretación de sus resultados se realiza de manera sencilla: el alimento que obtiene un mayor valor en cuanto a diferencias de tasas de ataque (esta diferencia también recibe el nombre de riesgo atribuible) es el responsable de la ocurrencia del brote; la confiabilidad de este tipo de cálculos ha sido comprobada en diversos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, ya que al realizar un análisis posterior de las muestras de los alimentos que ocasionaron los brotes se identificaron los mismos patógenos que en las muestras clínicas de los individuos enfermos. Además, se debe tener en cuenta que en el grupo no expuesto o que no consumieron los alimentos implicados, no deben existir individuos enfermos o el número debe ser reducido, estando la mayoría de los individuos enfermos en el grupo expuesto es decir que sí consumieron el alimento en cuestión y, como resultado de las dos condiciones anteriores el riesgo relativo, la razón de prevalencias, la razón de desventajas y/o el riesgo atribuible deben ser mayores en el grupo expuesto.

Una vez que se ha concluido el estudio epidemiológico necesario para comprobar la hipótesis, se debe tener cuidado con la interpretación estadística que se da de las relaciones entre variables, ya que en algunos casos no se presenta una asociación verdadera dependiendo de la confianza que se le de al estudio o de la presencia de variables de confusión en el diseño del mismo; consecuentemente, se deben revisar y analizar adecuadamente las pruebas estadísticas que se utilizarán, la magnitud de la relación de los eventos observados haciendo uso de la razón de prevalencias, razón de desventajas, riesgo relativo o riesgo atribuible, así como también la plausibilidad biológica de los eventos ocurridos (dosis-respuesta, periodo de incubación).

Además, cuando existe una relación estadística significativa entre la presencia de la enfermedad y varios posibles factores de riesgo relacionados con el consumo de varios alimentos a la vez, es de suma importancia determinar si existen fuentes múltiples de infección, quizás debido a contaminación cruzada de los diversos alimentos ingeridos, esto con el fin de

evitar la presencia de variables de confusión. Para determinar la exactitud de las relaciones estadísticas también se debe tener en cuenta las características de los individuos que se deben contabilizar dentro del grupo expuesto, ya que existe la posibilidad de se clasifiquen de manera errónea por diferentes causas, entre las que se encuentran la obtención de información incorrecta por parte de las personas implicadas en el brote (barreras de lenguaje, mala memoria, algún tipo de disfunción mental), fuentes múltiples de exposición por contaminación cruzada, la presencia de una transmisión secundaria de persona a persona después de la aparición del brote o personas con las mismas manifestaciones clínicas y de enfermedad pero que no estuvieron relacionadas con el brote.

Otra posibilidad que existe cuando no se presentan relaciones estadísticas significativas consiste en que la fuente de exposición no se encuentra entre aquellas que se están investigando, por lo cual se deben generar nuevas hipótesis, pero cuando se trata del inicio del brote o cuando se sabe que varias personas consumieron el mismo tipo de alimentos o en el mismo lugar o establecimiento, esta posibilidad carece de valor lógico. De la misma manera, cuando en el brote se involucra un número reducido de personas enfermas y no enfermas, la potencia estadística del estudio del brote se reduce, reduciendo las posibilidades de encontrar diferencias entre los grupos expuestos y no expuestos y su relación estadística significativa con los alimentos que pudieran haber originado el brote.

#### Investigación ambiental

En la investigación ambiental de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos se incluye la colección de muestras clínicas y de alimentos y bebidas que se sospecha estuvieron implicadas en el brote; este proceso de colección de muestras se guía haciendo uso de los hallazgos de diferentes parámetros identificados durante la investigación epidemiológica del brote. Esta colección de muestras, a diferencia de otras investigaciones epidemiológicas, se debe realizar tan pronto como sea posible ya que de otra manera no estarán disponibles cuando se trata de residuos de alimentos. Además, se debe considerar la cantidad de muestras que se tomarán, especialmente cuando se utilizan técnicas de diagnóstico laboriosas o con un costo elevado; en este caso, es posible tomar un número alto de muestras pero analizar unas cuantas de ellas.



Existe la posibilidad de que al momento de analizar las muestras ambientales provenientes de los alimentos que se sospecha fueron la fuente de origen del brote; sin embargo, esta situación no es concluyente por diferentes razones, entre las que se incluyen el hecho de que los alimentos analizados no hayan sido el origen del brote, las muestras pueden no estar disponibles si ha transcurrido mucho tiempo entre el inicio del brote y la colección mencionada, errores cometidos durante la recolección y manejo de las muestras o cambios que pudieran sufrir las mismas y, el uso de técnicas de laboratorio con baja confiabilidad diagnóstica, técnicamente difíciles de realizar o que no estén disponibles para la identificación de los patógenos implicados en el brote.

Existen diversas técnicas de laboratorio que se utilizan en la investigación epidemiológica, incluyendo la investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, las cuales se dividen en patognomónicas y subrogadas. Las técnicas subrogadas son aquellas que identifican directamente el agente etiológico implicado en el brote (identificación microbiológica o secuencias del ADN de microorganismos, identificación de sustancias tóxicas) y son consideradas como predictores absolutos de la enfermedad; por el contrario, las técnicas subrogadas son aquellas que identifican un cambio secundario en el hospedador como respuesta a la infección por el antígeno (respuestas inmunes identificadas mediante técnicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo). Independientemente del tipo de técnica diagnóstica que se utilice en la investigación de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos, estas deben poseer ciertas características que deben ser tomadas en cuenta antes de seleccionarla para su uso: deben representar un bajo costo para la investigación y fácil de llevar a cabo, ya que se maneja una gran cantidad de muestras; además, debe poseer ciertos parámetros que la hace ser exacta, precisa y confiable.

La exactitud de una técnica de diagnóstico se evalúa mediante la consideración de dos parámetros: la sensibilidad, es decir la capacidad de la técnica para identificar la menor cantidad posible del agente etiológico proporcionando resultados adecuados y, la especificidad, que es la capacidad de la técnica para identificar el agente etiológico para el cual está dirigida, o lo que es lo mismo, que no presente reacciones cruzadas. La precisión de una técnica de diagnóstico se relaciona con la reproducibilidad de la misma, la cual se refiere al hecho de que tantas veces como se repita la misma, esta

debe emitir los mismos resultados, sin importar si se está trabajando con muestras positivas o negativas. La confiabilidad diagnóstica se evalúa mediante el cálculo de la sensibilidad epidemiológica (la ausencia de resultados falsos negativos), la especificidad epidemiológica (la ausencia de resultados falsos positivos) y los valores predictivos (la probabilidad de obtener un diagnóstico verdadero, sin importar si este es positivo o negativo) (Santellano-Estrada et al., 2004).

Cuando se está trabajando por primera vez con una técnica de diagnóstico, es necesario evaluar los parámetros epidemiológicos mencionados anteriormente, los cuales también se obtienen mediante el uso de una tabla de contingencia de doble entrada, pero es necesario contar una técnica diagnóstica de constatación que posea características diagnósticas superiores a las de la técnica que se encuentra bajo evaluación o bien, mediante el uso de muestras controles positivas y negativas (Tabla 4).

**Tabla 4. Tabla de contingencia de doble entrada para el cálculo de la confiabilidad diagnóstica de una técnica de laboratorio**

		Técnica diagnóstica de constatación o estado de muestras control		
		Positivo	Negativo	Total
Técnica de diagnóstico en evaluación	Positivo	Verdaderos positivos (A)	Falsos positivos (B)	A + B
	Negativo	Falsos negativos (C)	Verdaderos negativos (D)	C + D
	Total	A + C	B + D	N

Una vez que se ha diseñado esta tabla, el cálculo de los parámetros epidemiológicos, los cuales se expresan de manera porcentual, se realiza utilizando las notaciones presentadas en la Figura 3.

**Figura 3. Cálculo de la confiabilidad de una técnica de diagnóstico**

$\frac{A}{(A + C)} * 100$	$\frac{D}{(B + D)} * 100$	$\frac{A}{(A + B)} * 100$	$\frac{D}{(C + D)} * 100$
Sensibilidad epidemiológica (%)	Especificidad epidemiológica	Valor predictivo	Valor predictivo negativo (%)

(%)                      positivo (%)

De la misma manera, al momento de realizar la evaluación de la técnica diagnóstica, se debe evaluar la concordancia, es decir la medida en que sus resultados coinciden en relación con los resultados de la técnica de concordancia o el estado que guardan las muestras control; sin embargo, se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos de esta manera no son indicadores relacionados con la confiabilidad de la técnica evaluada. Lo anterior se realiza mediante los valores incluidos en la tabla de contingencia de doble entrada y el uso de alguna de las siguientes pruebas estadísticas: kappa o, J de Youden, las cuales se utilizan en el caso específico de la evaluación de técnicas de diagnóstico debido al hecho de que se está trabajando con muestras no independientes (cada muestra es analizada por dos métodos diferentes), por lo que metodológicamente no se debe utilizar la prueba de  $\chi^2$ .

Proporción esperada (EP) debida al azar =

$$\frac{(A+B)}{N} * \frac{(A+C)}{N} + \frac{(C+D)}{N} * \frac{(B+D)}{N}; \kappa = \frac{\left(\frac{A+D}{N}\right) - EP}{1 - EP}$$

$$J \text{ de Youden} = \frac{A}{A+C} + \frac{D}{B+D} - 1$$

La interpretación de las dos medidas de concordancia descritas anteriormente, se realizan de manera sencilla de la siguiente manera: un valor de cero indica la ausencia de concordancia entre ambas técnicas de diagnóstico, mientras que la mayor concordancia se obtiene con un valor de uno, una concordancia moderada se expresa con un valor de 0.5.

Las evaluaciones de exactitud, precisión y confiabilidad mencionadas, deben realizarse continuamente y no esperar a la presentación de cualquier tipo de brote. Una vez que se ha realizado dicha evaluación, una técnica diagnóstica aceptable con posibilidades de ser utilizada en el análisis de las muestras clínicas y de alimentos procedentes de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos, debe poseer valores de por lo menos 90% en cada uno de los indicadores de la confiabilidad de dicha técnica. En el caso dado de una técnica diagnóstica no posea estos valores, y exista premura por obtener resultados de las muestras colectadas durante la investigación

epidemiológica de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos, existe la posibilidad de hacer uso de las técnicas de diagnóstico múltiples. En estas técnicas múltiples se utilizan pruebas de diagnóstico que poseen baja sensibilidad y especificidad epidemiológicas, pero mediante la realización de dos técnicas en paralelo y en serie es posible aumentar la confiabilidad de la investigación que se está realizando durante la presentación del brote.

Se consideran como técnicas en paralelo cuando ambas pruebas se realizan de manera a la totalidad de las muestras procedentes del brote, considerando como negativas a aquellas muestras que obtienen resultados negativos por ambas técnicas y como muestras positivas a aquellas que a las que obtienen estos resultados por cualquiera de las dos técnicas; el resultado de las muestras en paralelo es un aumento en la sensibilidad epidemiológica obtenida en la investigación del brote. Para la realización de las técnicas en serie, en primer lugar se analizan las muestras haciendo uso de cualquiera de las dos técnicas y a continuación se utiliza la segunda técnica de diagnóstico solamente a aquellas muestras que resultaron positivas a la primera técnica, de manera que se consideran como positivas las muestras que obtuvieron este resultado por ambas técnicas diagnósticas; el resultado de la aplicación de las técnicas en serie es un aumento de la especificidad epidemiológica obtenida en la investigación del brote. El cálculo de la sensibilidad y especificidad epidemiológicas se realiza de la manera que a continuación se describe (Tabla 5):

**Tabla 5. Cálculo de la sensibilidad y especificidad epidemiológicas mediante el uso de técnicas diagnósticas en serie y en paralelo**

	Paralelo	En serie
Sensibilidad epidemiológica	$1 - (1 - S_1) \cdot (1 - S_2)$	$S_1 \cdot S_2$
Especificidad epidemiológica	$E_1 \cdot E_2$	$1 - (1 - E_1) \cdot (1 - E_2)$

donde;  $S_1$  y  $E_1$  son las sensibilidad y especificidad epidemiológicas de la primer técnica de diagnóstico y,  $S_2$  y  $E_2$  son las sensibilidad y especificidad epidemiológicas de la segunda técnica de diagnóstico

Medidas de control

La implementación de las medidas de control adecuadas de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos se debe guiar mediante los

análisis epidemiológicos previos y el análisis de las muestras ambientales; sin embargo, este proceder puede retardar la prevención de exposiciones futuras a la fuente del brote. Al implementar las medidas de control necesarias, se debe tener en mente las repercusiones económicas a terceros que estas pueden ocasionar directa o indirectamente (cierre de establecimientos). Estas características son las que dificultan la toma de decisiones cuando aparece un brote de enfermedades transmitidas por alimentos, lo cual trae como consecuencia la correcta interacción que deben tener los responsables del control del brote con la opinión pública y los medios de comunicación.

Finalmente, una vez que se ha concluido la investigación de un brote de enfermedades transmitidas por alimentos, se debe tomar la decisión para interactuar de manera adecuada con la opinión pública y los medios de comunicación, en caso de ser necesario. Generalmente, este intercambio de información se hace necesario cuando los brotes han involucrado a una gran cantidad de individuos o se han presentado casos de fatalidad como consecuencia del mismo.

## **CONCLUSIONES**

El desarrollo del comercio internacional y la necesidad de producir no solo una mayor cantidad de alimentos, sino que estos sean además de bajo costo e inoctrinos, requiere de una atención inmediata por parte de los profesionales relacionados con la inocuidad de los alimentos, quienes requieren desarrollar habilidades relacionadas con la salud pública y legislación internacional (Lipman et al., 2002).

Cuando estas prácticas se han desarrollado de una manera inadecuada, la consecuencia inmediata es una pérdida de confianza por parte de los consumidores hacia los productores y las autoridades gubernamentales relacionadas con la producción de alimentos (Pettitt, 2001).

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Casas Olascoaga, R.; Rosenberg, F.J.; Astudillo, V.M. 1991. Animal production and animal health and their relationship with veterinary public health in Latin America and the Caribbean. *Rev Sci Tech.* 10, 1087-1100.

2. Contreras-Hinijo G.; Ramíerez, J.A.; Acosta-González, R.I.; de la Garza-Baroboza, M.; Flores-Gutiérrez, G.H. 2004. Microbiological quality of foods provided to industry-employees from Reynosa, Tamaulipas, Mexico. 2004 IFT Annual Meeting and Food Expo. Las Vegas, Nevada, Estados Unidos de Norteamérica
3. Elvbakken, K.T. 2001. Food control - between health and honest trade. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 121, 3613-3616.
4. FAO. 2001. La bioseguridad en los sectores de la alimentación y la agricultura. Comité de Agricultura. Roma; 7 pp.
5. Flores-Gutiérrez, G.H. 2002. Inocuidad de los alimentos: Una competencia más para el Médico Veterinario Zootecnista. I Congreso de Ciencias Veterinarias. Cd. Victoria, Tamaulipas, México
6. Held, J.R., Gregory, D.J. 1992. Organization of veterinary public health in the United States of America and Canada. *Rev Sci Tech.* 11, 147-167.
7. Lathers, C.M. 2002. Clinical pharmacology of antimicrobial use in humans and animals. *J Clin Pharmacol.* 42, 587-600.
8. Lipman, L.J., Bijker, P.G., Snijders, J.M., Sterneberg-van der Maaten, T., van Knapen F. 2002. *Tijdschr Diergeneeskd.* 127, 184-187.
9. Pettitt, R.G. 2001. Traceability in the food animal industry and supermarket chains. *Rev Sci Tech* 20, 584-597.
10. Reingold, A.L. 1998. Outbreak Investigations - A Perspective. *Emerg Infect Dis.* 4, 21-27.
11. Santellano-Estrada, E., Infante, F., Díaz-Aparicio, E., Flores-Gutiérrez, G.H. 2004. Development of an immunobinding test on nitrocellulose paper to diagnose caprine brucellosis. *Vet Res Commun.* 28, 27-31.
12. Schwabe, C.W. 1991. History of the scientific relationships of veterinary public health. *Rev Sci Tech.* 10, 933-949.

## Capítulo 14

### **Características fisicoquímicas y microbiológicas de la salmuera de congelación utilizada en barcos atuneros del pacífico mexicano**

Ramírez de León José Alberto<sup>1</sup>, Barba Quintero Guillermo<sup>2,3</sup>, González Murillo Alfredo<sup>2</sup>, Cortes Ruiz Juan Antonio<sup>2</sup>, Gallegos Infante José Alberto<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas. UAM Reynosa Aztlán.  
Depto. Tecnología de Alimentos

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico del Mar de Mazatlán,

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico de Durango,

E-mail: ramirez@uat.edu.mx

## **CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LA SALMUERA DE CONGELACIÓN UTILIZADA EN BARCOS ATUNEROS DEL PACÍFICO MEXICANO**

### **RESUMEN**

Existe un creciente interés en asegurar la inocuidad de los alimentos que consumimos. En el caso del atún, se presenta el riesgo de desarrollar altos contenido de histamina y otras aminas biogénicas, asociado con la contaminación microbiana del músculo durante el procesamiento. El objetivo de este trabajo, fue establecer las características de la salmuera de congelación y determinar la posibilidad de que ésta sea el vínculo contaminante de los atunes, previo a su procesamiento. Se trabajo con tres embarcaciones atuneras del Pacífico mexicano. A las salmueras se les determinó en forma periódica las características de pH, contenido proteico, contenido de cloruros, cuentas microbiana (psicrófilos y mesófilos), y niveles de histamina. Al músculo de atún se le determinó el contenido de cloruros y de histamina. La salmuera de congelación presentó un alto contenido de proteína (cercano a 1.2%) y un pH entre 5.5 y 6.8, que permitieron el crecimiento de microorganismos, especialmente psicrófilicos. El músculo de atún aleta amarilla, presentó valores de histamina inferiores a 50 mg/Kg de tejido. La salmuera presentó valores inferiores a 60 mg/Kg de histamina. Los resultados encontrados muestran que la salmuera no contamina con histamina el músculo de los atunes dañados, pero puede ser un vector para el crecimiento de microorganismos descarboxiladores generadores de histamina.



## ABSTRACT

There is a great concern from consumer about food inocuity. In tuna fish, there is a risk for forming histamine and other biogenic amines, by growing of microorganisms in flesh during processing. The objective of this work was to determine the characteristics of freezing brine and to determine the feasibility of brine as a contaminant agent of fish, before their processing. The freezing brine of three shipping boats of mexican pacfic sea were studied. The pH, content of protein, clorures, microbiological counts (mesofilic and piscrofilic), and histamine level were measured periodically. In tuna muscle, the level of clorures and histamine were measured too. Freezing brine showed a highlevel of protein (1.2%), and pH of 5.5-6.8. Such conditions were appropriated to let the growing of microorganisms, specially psicrofilics. The flesh of the yellowfine tuna, showed values for histamine lower than 50 mg/Kg of flesh. The freezing brine showed values of histamine lower than 60 mg/Kg. The results sugested that freezing brine was not a contaminating vector for histamine in the flesh of phisically damaged tuna fishes, but it could be a contaminant agent for decarboxilating microorganisms, responsables for histamine production.

## INTRODUCCIÓN

La pesca en México es una actividad eminentemente dinámica, la captura en el 2001 fue 1'325, 785 toneladas, con un consumo de 11.06 kg/persona por año, situando al país entre los 20 mayores en producción pesquera del mundo y décimo lugar en tñidos. En 2001, con 132 embarcaciones, se capturaron 133 000 toneladas (3.2 % de la captura mundial) de atún aleta amarilla entero, enlatando el 65.5 % y el resto se procesó congelado (SAGARPA/CONAPESCA, 2001).

El atún prefiere las aguas profundas y azules, además de las costeras, las cuales son consideradas como aguas templadas y tropicales, con temperaturas dentro de los límites de 17-28 °C. Son capturados por la flota mexicana en aguas del Pacífico, comprendidas entre los 32° a 16° latitud norte y entre los 120° a 93° latitud oeste. Cuando el barco está lo suficientemente próximo, las lanchas rápidas se adelantan y se aproximan al cardumen para concentrarlo y rodearlo con la red, se recobran las lanchas, dejando dos para ayudar en la maniobra de cerco y cobro de la red. Completado el círculo, se procede a cerrarla por debajo para evitar que el atún se escape (Burns F.D., 1985; Ruíz, 1990). Para recobrar la captura, ésta se sube a bordo con una red cuchara y se almacena en la bodega, donde el producto se conserva en salmuera al 18% de NaCl a -15 °C, utilizando agua de mar (con 3.5 % de NaCl). Antes de enfriarse, la salmuera se debe circular hasta que la salinidad se estabilice. La salmuera nueva se debe mantener arriba de su temperatura de congelación, mientras que la salmuera ya mezclada con sangre, proteína soluble y otros materiales, se debe mantener cercana a su punto de congelación, la cual a veces es guardada y usada en varios viajes debido a la poca existencia de sal o a su elevado precio (Burns F.D., 1985).

Los tejidos musculares del atún vivo y sano, son estériles, sin embargo, muchos tipos de bacterias habitan en la superficie de su piel, en las agallas y en el sistema digestivo. A su muerte, el atún pierde su mecanismo de defensa natural que limita el crecimiento de bacterias y éstas se incrementan rápidamente, llegando a duplicarse cada 30 minutos en temperatura de 24 °C. La celeridad a la cual ocurre este deterioro durante su manejo y almacenamiento, depende principalmente de las altas temperaturas y tiempos excesivos a los que se expone, además de la condición física del pescado, como son su edad, sexo, estado de nutrición, el tipo y concentración de sustancias químicas a su alrededor (Burns F.D., 1985). En todas las especies de atún, se encuentra presente el aminoácido histidina, que por

acción de microorganismos descarboxiladores, se transforma en histamina, sustancia tóxica para el ser humano. Se pueden generar otras aminas biogénicas a partir de diferentes aminoácidos (Antoine y col., 2001).

El atún y otras especies de escómbridos (bonito, macarela, etc.), además de las familias escomberesócidos (sardina, arenque), clupeidos, carangidos, corihaenidos, pomatomidos y engraulidos, tienen altas cantidades de aminas biogénicas (FDA, 2001, Kim y col., 2000; Ben-Gigirey y col., 1999; Pacheco-Aguilar y col., 1998; Soares y Gloria, 1994).

El envenenamiento por escómbrido es una de las tres enfermedades más frecuentemente reportadas, asociada con el consumo de productos del mar en Estados Unidos (Kim y col. 2000; Ben-Gigirey y col., 1999; Soares y Gloria, 1994). Se ha demostrado que la histamina es la causante del envenenamiento por escómbridos, y su toxicidad es aumentada por la presencia de otras aminas en el alimento (Kim y col. 2000; Gloria y col. 1999; Ben-Gigirey y col., 1999; Pacheco-Aguilar y col. 1998; Méndes y col., 1999). Varios brotes de intoxicación con histamina han sido reportados, sólo dos han sido asociados con atún albacora, uno en Francia y otro en California, debido principalmente a la calidad pobre del pescado crudo o al manejo o almacenamiento deficiente (Gloria y col., 1999; Veciana y col. 1997; Pacheco-Aguilar y col. 1998).

Los síntomas por histamina se manifiestan afectando la piel con la aparición de sarpullido, urticaria, edema e inflamaciones, problemas gastrointestinales como náuseas, vómito, diarrea y calambres abdominales, otros síntomas incluye hipertensión, dolor de cabeza, palpitación, enrojecimiento y picazón. En forma severa espasmos bronquiales, sofocación y fallas respiratorias (Valls y col., 1999; Pacheco-Aguilar y col. 1998; Shalaby 1997).

En algunos países los límites legales o contenido de histamina máximo tolerable han sido establecidos. Las regulaciones en España y la Comunidad Europea tienen un valor máximo promedio de 100 mg/kg (Veciana y col., 1997). La FDA ha definido un nuevo nivel de acción de riesgo de 50 mg de histamina por Kg de pescado. No existen límites reguladores para otras especies de pescado y otras aminas relacionadas con envenenamiento por histamina (FDA, 2001, Pacheco-Aguilar y col. 1998; Baixas-Nogueiras y col., 2001).

El objetivo de este estudio evaluar la calidad microbiológica y fisicoquímica de la salmuera de congelación empleadas para conservar el atún aleta amarilla a bordo de barcos pesqueros de la flota nacional.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Capacidad y tiempo de las salmueras de las embarcaciones atuneras estudiadas**

La capacidad de la embarcación 1 fue de 1,090 Ton, y su salmuera tenía un tiempo de 1 año 2 meses en el momento del estudio. Las embarcaciones 2 y 3 tienen 800 y 1,090 Ton de capacidad y sus salmueras tenían 1 año 8 meses y 8 meses respectivamente. Las salmueras se fortalecen con cloruro de sodio después de regresar de cada viaje, para mantener la concentración de 18% en cada embarcación,.

### **Manejo de muestras**

La salmuera de congelación los de tres barcos atuneros, fueron analizadas durante la temporada 2003. Se tomaron asépticamente dos muestras de un litro de cada una de las embarcaciones al arribar a puerto, de los tanques 7 babor y 7 estribor, teniendo temperaturas de  $-15^{\circ}\text{C}$ . También se muestrearon de manera aleatoria dos atunes aleta amarilla (*Thunnus albacares*) con una temperatura interna de  $-8^{\circ}\text{C}$ , capturados en el Pacífico Mexicano, talla 5/12 kg, conseguidos de los mismos tanques de donde se obtuvo la salmuera, evitando que presentaran daño físico. Cada muestra de 1 Kg de músculo fueron cortadas del lomo superior de cada atún estudiado, con una sierra eléctrica higienizada previamente con etanol al 70%, colocándose en bolsas estériles. Todas las muestras fueron trasladadas en una hielera, hasta el laboratorio de una empresa atunera de la localidad, en un tiempo de 5 minutos. En total fueron obtenidas 36 muestras de salmuera y 36 atunes durante el desembarque de las tres embarcaciones y almacenadas a  $-15^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis, los cuales se realizaron por duplicado.

### **Homogeneización de las muestras de salmuera y de músculo de atún**

Se empleó un mezclador Electrolux (D015136, Dito Sama Group, Francia) para homogeneizar las muestras de 500 g de músculo de atún y 500 g de salmuera.

### **Determinación de proteína en la salmuera**

El contenido de proteína se determinó, usando 10 g de las muestras homogeneizadas por duplicado, según Woyewoda y col. (1986).

### **Determinación de pH en la salmuera de las tres embarcaciones**

Del homogeneizado se tomaron alícuotas de 10 g por duplicado para evaluar el pH de acuerdo a la técnica establecida por la AOAC (981.12, 2000).

#### **Evaluación del contenido de cloruro de sodio en la salmuera y músculo de atún**

La evaluación se efectuó con 10 g del homogeneizado por duplicado, manejando la metodología propuesta por la AOAC (937.09, 2000).

#### **Presencia de microorganismos mesófilos y psicrófilos**

La determinación se desarrolló, utilizando 10 g del homogeneizado por duplicado, empleando el método de vaciado en placa (Harrigan, 1998; NOM-092-SSA1-1994).

#### **Determinación de histamina por cromatografía de intercambio iónico**

Se emplearon 10 mL de salmuera o 10 g de músculo de atún del homogeneizado, mezclándose con 100 mL de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 2.5% en una licuadora, enseguida se filtró con papel Whatman #2. Un gramo de resina de intercambio iónico (Amberlite CG-50 de malla 100 -200) se utilizó para la preparación de la columna y separación de la histamina. La resina se diluyó en 10 mL de amortiguador de acetato 0.2M con pH 4.63, se decantó en una bureta de 25 mL.

La resina se lavó con 150 ml de amortiguador de acetato. El filtrado de TCA con muestra, se neutralizó con KOH 1 N y se utilizaron 75 mL de la solución neutralizada (no debe de contener más de 2 mg de histamina), posteriormente se vertió a la columna, enseguida se agregaron 150 mL de amortiguador para remover sustancias que interfieran, después la histamina de la columna fue eluída con 25 ml de HCL 0.2 N.

Un volumen similar de TCA al 2.5 % fue tratado de la misma manera para actuar como blanco. Se mezcló 1 mL del extracto (conteniendo la histamina), con 15 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% en un tubo, el cual fue previamente enfriado en un baño de agua con hielo. 2 mL del reactivo diazo enfriado fueron añadidos a la mezcla, la cual se almacenó a 0°C durante 10 minutos para medir la absorción a 495 nm, usando agua destilada como referencia (Pan y James, 1985).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido de proteína en la salmuera de congelación

El contenido de proteína en la salmuera de las tres embarcaciones estudiadas, se muestra en la Figura 1. El barco 1, conteniendo salmuera con 14 meses de antigüedad al inicio del estudio, muestra un aumento en el contenido de proteína, pasando de 1 a 1.25% durante sus primeros cuatro viajes, momento en el que se renovó en un 80% la salmuera, por lo cual bajó el contenido de proteína a 1% después del quinto viaje, aumentando de nuevo posteriormente. El barco 2, conteniendo salmuera con 18 meses de antigüedad, la cual no se renovó durante este estudio, presentó los valores de proteína más altos, variando de 1.1 a 1.4%. La embarcación 3, conteniendo salmuera con el menor tiempo de antigüedad (8 meses), presentó valores iniciales de 0.9%, que incrementaron a 1.2%.

La salmuera de las embarcaciones atuneras contienen sangre y tejido muscular disuelto o suspendido, debido a los golpes entre los pescados durante su caída dentro de los tanques de almacenamiento, así como, por la presión ejercida sobre los atunes colocados en la parte inferior de los tanques durante su congelación. Los resultados encontrados en este estudio, muestran que la salmuera de congelación incrementó su contenido en proteínas durante el almacenamiento, lo que sugiere que podría ser un sustrato nitrogenado adecuado para el crecimiento de microorganismos.

### Variación del pH en la salmuera

La salmuera de la embarcación 1, presentó la mayor variación de pH (5.6-6.8), durante los primeros cuatro viajes. Después de renovarse un 80% de la salmuera, antes del quinto viaje, el pH se estabilizó permaneciendo en 6.3. Las salmueras de los barcos 2 y 3 mantuvieron un pH promedio de 6.2 con desviación estándar de 0.124. El pH de las salmueras de las tres embarcaciones, es adecuado para el desarrollo de microorganismos descarboxiladores. A este respecto, Ben-Gigirey et al. (1999), encontraron 25 cepas de bacterias descarboxiladoras de aminoácidos capaces de crecer en pH de 5.8 a 6.5. Por otra parte, Mavromatis y Quantick (2001), encontraron que estas bacterias pueden crecer en un rango de pH de 5.3 a 6.3. Niven y col. (1981), desarrollaron un método para determinar bacterias descarboxiladoras a pH de 5.3.

### Contenido de cloruro de sodio en salmuera y músculo de atún

El contenido de cloruro de sodio en las tres embarcaciones, varió entre 15.9 y 18.9% (Figura 2). Estos valores concuerdan con los valores esperados, ya que las embarcaciones toman medidas de control de calidad, para mantener sus salmueras cercanas a 18% NaCl peso/volumen. La cantidad de cloruro de sodio en el músculo de pescado fue de 0.86-1.55% (Figura 2), permaneciendo dentro del nivel aceptable para pescado, que debe ser menor al 1.5%. Estos resultados indican que la sal no se difunde desde la salmuera al interior del músculo, del pescado no dañado.

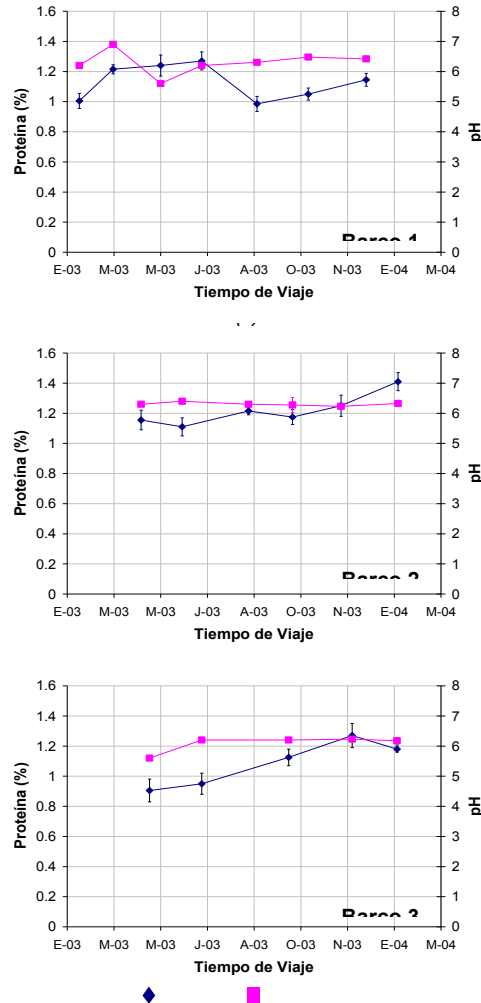


Figura 1. Comportamiento del contenido de proteína y el pH en la salmuera de las diferentes embarcaciones durante la temporada de pesca.

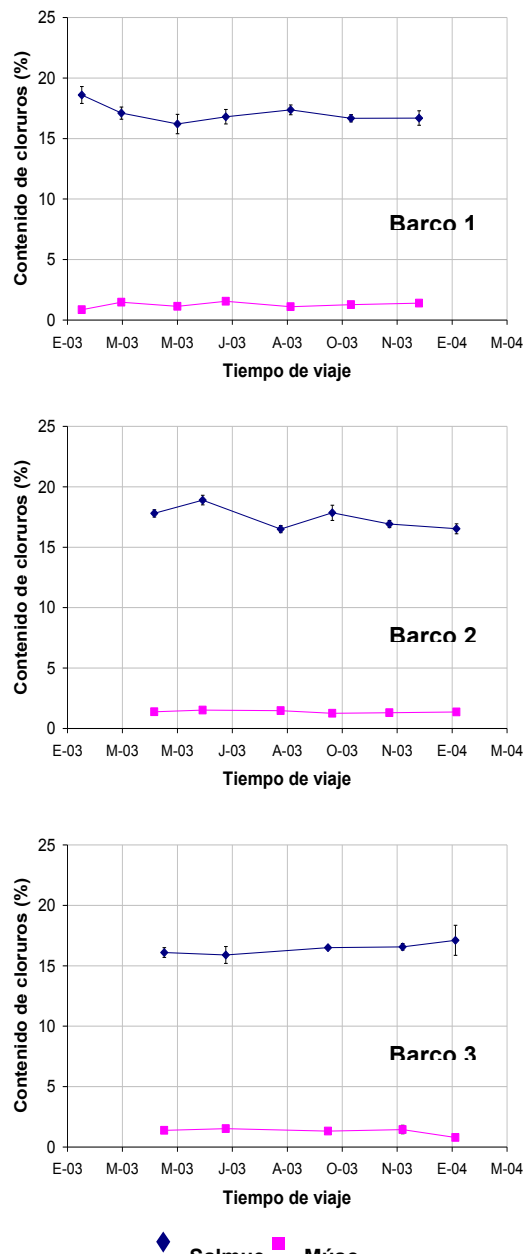
### **Desarrollo de microorganismos mesófilos y psicrófilos en la salmuera**

Las salmueras de todas las embarcaciones estudiadas mostraron un alto contenido de microorganismos psicrófilos ( $20.5 - 35 \times 10^4$ ), comparado con la cantidad de mesófilos ( $1.9 - 3.2 \times 10^4$ ) (Figura 3). Estos resultados indican que la salmuera de congelación representa un medio nutritivo adecuado, para que diferentes tipos de microorganismos pueden crecer. Estos microorganismos representan una fuente de contaminación para las superficies externas de los atunes, así como, para el músculo del pescado, en animales que presentan daño físico, ocasionado por el manejo durante la captura y el almacenamiento.

Los microorganismos presentes en la salmuera, pueden tener diferente origen: el agua de mar la cual se utiliza para amortiguar la caída de los atunes dentro de los tanques, además para la preparación de la salmuera, los intestinos de los atunes colocados en la parte inferior de los tanques, y generalmente sufren aplastamiento, la piel y las agallas de los atunes.

Durante el presente estudio, la salmuera de la embarcación uno, se reemplazó en un 80%. El 20% de la salmuera antigua permaneció en el tanque durante la preparación de la nueva. Esta práctica induce a la contaminación de la salmuera, ya que permite que en ella permanezcan microorganismos psicrófilos y halófilos, ya adaptados a este medio. Es conveniente tratar de reemplazar completamente la salmuera, para evitar el desarrollo de microorganismos descarboxiladores, capaces de crecer y reproducirse en salmueras de congelación.





**Figura 2. Comportamiento del contenido de cloruros en salmuera y músculo de atún de las diferentes embarcaciones durante la temporada de pesca.**

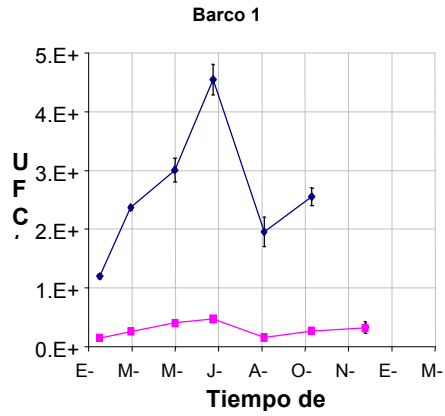
### **Determinación de histamina en la salmuera y músculo de atún**

Los músculos de atún estudiados, mostraron en promedio, mayor concentración de histamina ( $40 \pm 6.32$  mg/kg), en comparación a la salmuera ( $25.3 \pm 10.73$  mg/kg) (fig. 3), con excepción de la primera embarcación que fueron similares. Los valores de histamina encontrados en músculo, están por debajo del límite permitido por la norma de FDA (50 mg/kg). A este respecto, se ha reportado que el músculo de atún albacora fresco-congelado, presentó entre 1 y 5 mg de histamina/kg (López-Sabater y col., 1994; Veciana et al., 1997).

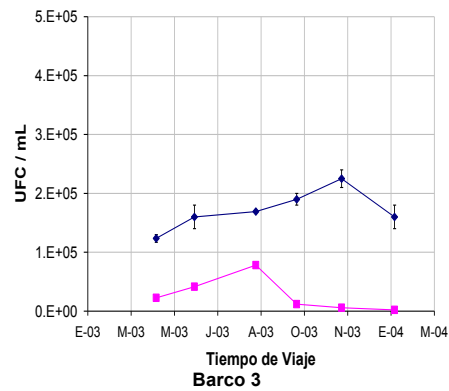
El nivel de histamina que presentan los filetes de pescados enteros, no golpeados, debe tener como origen, el metabolismo interno del animal, que produce histamina como respuesta al estrés de la captura. t

En el caso de la salmuera de congelación, la producción de histamina, debe estar asociada a la descarboxilación microbiana de la histidina presente en la salmuera. Los atunes al llegar a los tanques de conservación elevan la temperatura del agua de mar, la cuál pasa de  $-1$  °C hasta 6 o 10°C, y de acuerdo con las bitácoras de los barcos, tarda 6 a 12 horas en regresar a  $-1$ °C, esto se repite en 2 a 4 ocasiones por tanque, dependiendo del tamaño del lance, hasta su llenado, manteniendo a los primeros atunes que llegan al tanque con estas variaciones de tres a 5 días.

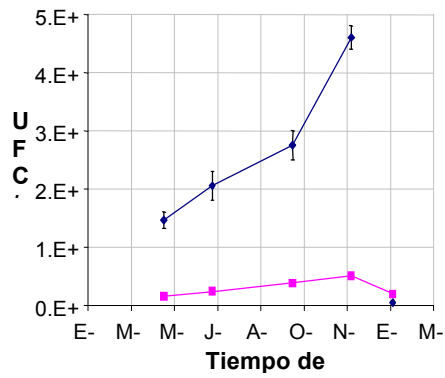
Por otra parte, el congelado de los atunes es un proceso lento, se requieren hasta 3 días para pasrlos de de  $-1$ °C hasta  $-15$ °C. Posteriormente, se extrae la salmuera del tanque y estos permanecen congelados.



**Barco 1**



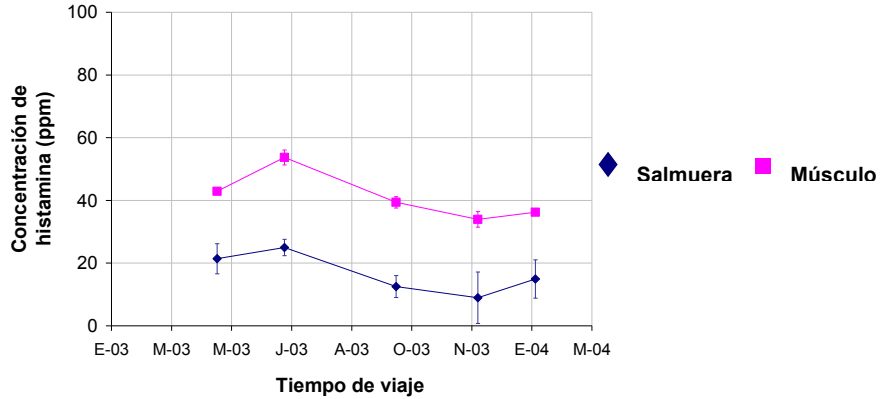
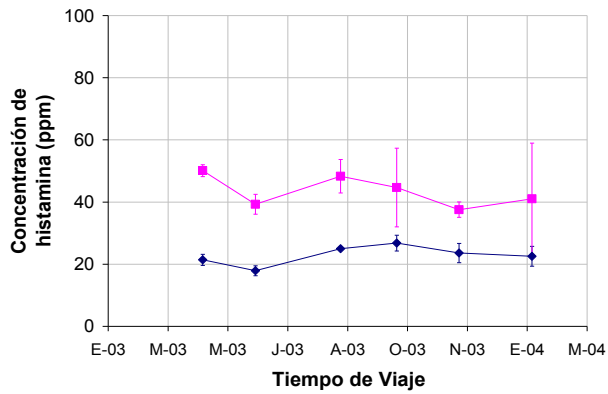
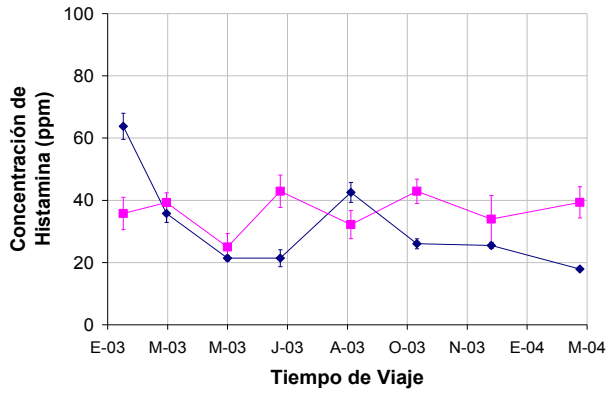
**Barco 2**



◆ Psicrófilos    ■ Mesófilos

**Barco 3**

**Figura 3. Comportamiento del contenido mesófilos y psicrófilos en la salmuera de las diferentes embarcaciones durante la temporada de pesca.**



**Figura 4. Comportamiento del contenido de histamina en salmuera y músculo de atún de las diferentes embarcaciones durante la temporada de pesca.**

## CONCLUSIONES

La salmuera de congelación presentó un alto contenido de proteína y un pH en tre 5.5 y 6.8. Estas condiciones fueron apropiadas para el crecimiento de microorganismos. Principalmente de organismos psicrófilos. Tanto la salmuera de congelación como los músculos del atún presentaron bajos niveles de histamina durante la temporada de captura. Los resultados encontrados, muestran que el músculo de atún aleta amarilla, presenta valores inferiores a 50 mg/Kg de tejido, lo que permite cumplir con la norma de calidad del FDA, si se siguen buenas prácticas de manejo, durante el procesamiento, evitando la contaminación y desarrollo de microorganismos descarboxiladores, productores de histamina.

La practica de no reemplazar totalmente la salmuera después de varios meses de uso, podría ser un factor importante para la presencia de microorganismos bien adaptados a las condiciones extremas de sal y temperatura de las salmueras de congelación, haciéndolas un vector de contaminación excelente para los atunes durante su procesamiento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Antoine, F. R., Wei, C. I., Otwell, W. S., Littell, R. C., Quinn, B. P., Hogle, A. D., Marshall, M. R. 2001. Free aminoacids in dark and white muscle fish as determined by o-phthalaldehyde precolumn derivatization. *Journal of Food Science*. 66 (1): 72-77.
2. Baixas-Nogueiras, S., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M. C., Veciena-Nogués, M. T. 2001. Volatile y amines no volatile in Mediterranean hake as a function of their storage temperature. *Journal of Food Science*. 66 (1): 83-87.
3. Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J. M., Villa, T. G., Barros-Velazquez, J. 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*. 61 (5): 608-615.
4. Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J. M., Villa, T. G., Barros-Velazquez J. 1999. Histamine and cadaverine production by bacteria isolated from fresh and frozen albacore (*Thunnus alalunga*). *Journal of Food Protection*. 62 (8): 933-939.
5. Ben-Gigirey, B., Vieites Baaptista de Sousa, J. M., Villa, T. G, Barros-Velazquez, J. 1999. Chemical changes and visual appearange of albacore tuna as related to frozen storage. *Journal of Food Protection*. 64 (1): 20-24.
6. Burns F.D. 1985. Manejo y refrigeración del atún en los buques de cerco. Living Marine Resourses Inc., National Marine Fisheries Service, southwest Region, National Oceanic Atmospheric Administration, U.S.A.
7. FDA/CFSAN. 2001. Food safety initiative three – year research plan. 1 – 4.

8. Gloria, M. B. A, Daeschel, M. A., Craven, C. and Hilderbrand, K. S. 1999. Histamine and other biogenic amines in albacore tuna. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 8 (4): 55-69.
9. Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory methods in food microbiology*. 3th Edition. Academic Press. San Diego Calif. U.S.A. 532 Pp.
10. Kim, S. H., Field, K. G., Chang, D. S., Wei, C.L., An. H. 2001. Identification of bacteria crucial to histamine accumulation pacific mackerel during storage. *Journal of Food Protection*. 64 (10): 1556-1564.
11. López-Sabater, E. I., Rodríguez Jerez, J. J., Roig Sagues, A. X., Mora Ventura., M. T. 1994. Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: Effect of tuna handling on presence of histidina decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection*. 57(4): 318-323.
12. Niven C. F. Jr., Jeffrey, M. B., Corlett, D. A. Jr. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 41 (1): 321-322.
13. Pan, B. S., James, D. 1985. Histamine in marine products: production by bacteria measurement and prediction of formation. Fisheries Technical Paper 252, Food and Agriculture Organization on the United Nations.1-15.
14. Pacheco-Aguilar R., Lugo-Sánchez M. E., Villegas-Ozuna, R. E., Robles-Burgueño, R. 1998. Histamine quantification in Monterey sardine muscle and canned products from northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*. 11 (2): 188-195, 198.
15. Ruíz Dura, F. 1990. *Recursos Pesqueros de las Costas de México*. Ed. LIMUSA, México. Segunda Edición.
16. Shalaby, A. R. 1996. Significance biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International*. 29 (7): 675 – 690
17. SAGARPA/CONAPESCA. 2001. *Anuario Estadístico de Pesca*. México.
18. Soares V. F. M. and Glória, M. B. A. 1994. Histamina levels in canned fish available in the retail market of Belohorizonte, Minas Gerais, Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 7: 102 – 109.
19. Valls J. E. Bello, R. A., Kodaira, M. S. 1999. Validation of liquid chromatography analysis of biogenic amines in canned fish products. *Journal of Aquatic Food Product Technologies*. 8 (3): 79 – 91.
20. Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou M. C. 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-Related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (6): 2036 – 2041.

## **Capítulo 15**

### **Las Buenas Prácticas Agrícolas y su impacto en la seguridad de frutas frescas**

Rafael Díaz Sobac

Instituto de Ciencias Básicas/Facultad de QFB  
Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz (México)

## **LAS BUENAS PRÁCTICAS DE AGRÍCOLAS Y SU IMPACTO EN LA SEGURIDAD DE FRUTAS FRESCAS**

### **RESUMEN**

La calidad de las frutas generalmente había estado determinada por parámetros físicos como aspecto, tamaño, firmeza y color; así como en la inspección fitosanitaria; no considerando la inocuidad y la seguridad alimentaria, que han adquirido importancia, debido a la gran cantidad de contaminantes que pueden incorporarse en la cadena productiva, poniendo en riesgo la salud del consumidor, así como el peligro latente que representa el bioterrorismo. Debido a lo anterior es necesario implementar sistemas integrales para garantizar la inocuidad y seguridad de frutas frescas, que comprenda el manejo integral de plagas, las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) o de cultivo y un eficiente plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) que permitan comercializar productos hortofrutícolas de calidad, inocuos y seguros.

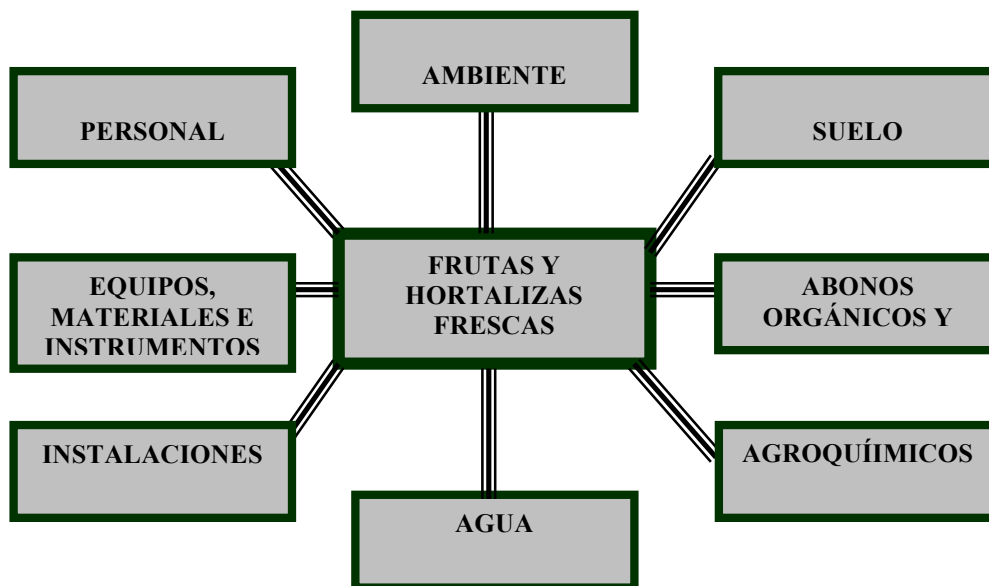


## I. Consideraciones generales

La producción y comercialización de frutas frescas es una de las principales actividades generadoras de ingresos para el sector agropecuario, y debe considerarse como un proceso de innovación constante y dinámica, que exige la profesionalización de las actividades productivas y de manejo poscosecha.

En las últimas dos décadas, se ha observado una creciente demanda por el consumo de frutas frescas, que junto con el aumento en la disponibilidad de las mismas, han contribuido al incremento en la comercialización a nivel mundial. Sin embargo con este crecimiento en la oferta y la demanda de frutas frescas, también se incrementaron los reportes de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas, que han generado una alerta tanto para autoridades sanitarias, como en consumidores respecto a la inocuidad y bioseguridad de estos alimentos lo que ha conducido al establecimiento de nuevos requerimientos en los procesos de cosecha

En México y en muchos países del mundo se produce una gran cantidad de productos hortifrutícolas, muchos de ellos con impacto tanto en el mercado nacional como en el internacional. Sin embargo, para incidir en estos mercados de manera eficiente se hace indispensable ofrecer en forma consistente y en los volúmenes adecuados la máxima calidad. Esto solo es posible solo mediante la aplicación de técnicas adecuadas durante la producción-recolección y con sistemas eficientes de manejo poscosecha. Durante la práctica de esta cadena de producción, cosecha, selección, almacenamiento y transporte de frutas frescas, pueden verse afectadas las condiciones fitosanitarias de estos productos, así como contaminarse, de manera accidental o intencional, con materiales biológicos, químicos y físicos. Este último aspecto ha tomado especial importancia y atención debido a los riesgos que implica para la salud y la seguridad de las naciones, los actos de bioterrorismo que a través de alimentos frescos se podrían llevar a cabo, afectando seriamente la seguridad alimentaria. Adicionalmente el uso no controlado de fertilizantes y plaguicidas, la deficiente calidad del agua de riego, así como las condiciones ambientales también representan un riesgo de estrés abiótico, que podría generar efectos sobre el metabolismo y biosíntesis química de los frutos, así como en la expresión genética de los mismos dando paso a nuevas biomoléculas de acción no conocida en los consumidores.



**Fig. 1 Posibles Fuentes de Contaminación de Frutas Frescas.**

## **II. Manejo integral de frutas para garantizar la seguridad e inocuidad**

Los sistemas para cuidar la calidad y la inocuidad de frutas frescas habían sido considerados en la poscosecha, y solo mediante sistemas de inspección final. El término poscosecha implica un conjunto de procesos integrados y secuenciados de las actividades que se que se realizan desde la cosecha en campo de un producto agrícola hasta que se ofrece al consumidor en los puntos de venta. El objetivo primordial de este proceso, es el de preservar en el nivel mas alto posible la calidad del producto. Para elegir el sistema de manejo poscosecha más adecuado para un producto se requiere conocer detalladamente la fisiología de maduración del fruto, de las características de presentación y tratamientos específicos para su comercialización en los mercados de destino.

Sin embargo en el concepto de manejo integral de frutas, y principalmente bajo el concepto de seguridad alimentaria, es necesario tomar en cuenta los sistemas de cultivo, el uso de fertilizantes, la calidad del agua de riego, así como la posibilidad de contaminación de los cultivares por

efectos ambientales o intencionales, e inclusive el efecto que esta tiene en la composición química, características sensoriales y expresión genética.

En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural emitió en el año 2000 la Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-034-FITO-2000) con el objetivo de establecer los requisitos y especificaciones para la aplicación y certificación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en los procesos de producción de frutas y hortalizas frescas, los cuales son de observancia obligatoria en todo el territorio nacional para las unidades de producción que pretendan obtener esta certificación y usar la contraseña oficial para la identificación sus productos.

Esta norma fue elaborado en respuesta a que el consumo de frutas y hortalizas frescas producidas sin BPA ha sido asociado con brotes de infecciones, enfermedades crónicas, reacciones temporales de intoxicación e inclusive reacciones alérgicas, por lo que se deben establecer medidas que tengan como propósito proteger y promover la salud de los vegetales y los consumidores de estos.

Esto puede ser posible a través de la aplicación de sistemas de cultivo, cosecha, selección, almacenamiento, transporte y distribución, basados en BPA, que al aplicarlas de manera integral y sistemática minimizan tanto los riesgos fitosanitarios, como la contaminación biológica, química y física.

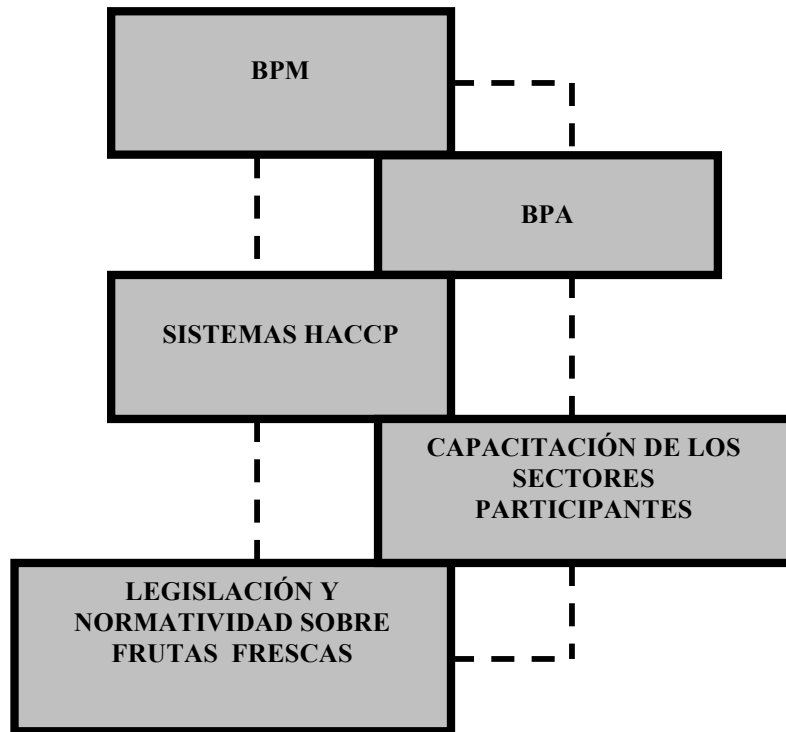
Los sistemas de control y aseguramiento de la calidad e inocuidad de las frutas frescas, son una excelente opción para cumplir con la normatividad de los mercados, en virtud de que consideran los siguientes aspectos sanitarios y de seguridad:

- a. Manejo integral de plagas
- b. minimizar el estrés ambiental;
- c. limitar el uso de agroquímicos;
- d. promover una actitud responsable de los trabajadores agrícolas con el objetivo de garantizar la salud de los consumidores

### **III. El plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control: Base para un sistema de BPA**

Aún cuando diversas normas han definido el problema de la inocuidad y seguridad alimentaria, así como han establecido una serie de recomendaciones muy valiosas, en pocos casos se considera que la implementación de **un sistema** de BPA, debe ser producto de **un plan** de

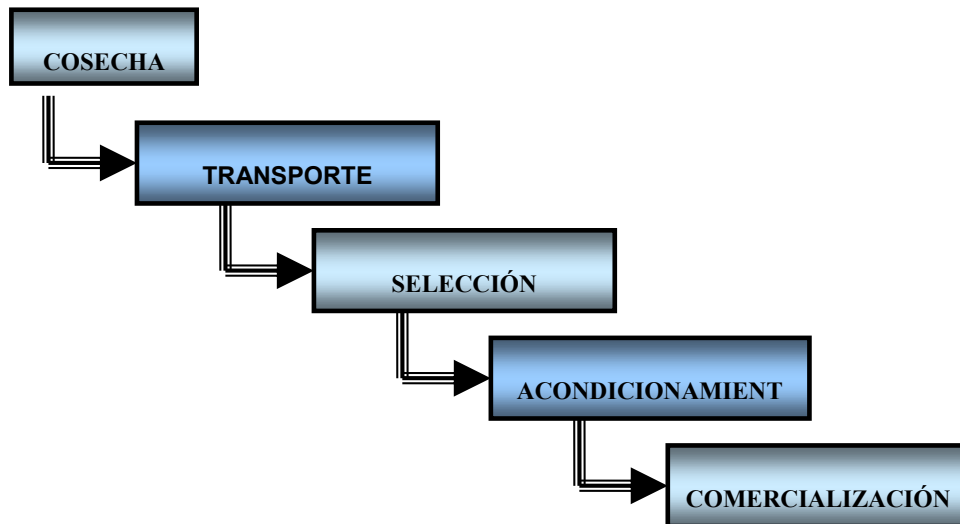
APPCC, el cual debe ser establecido previamente como una forma de autoevaluación a la cadena productiva, que permitirá detectar los puntos de mayor riesgo de daño fisiológico y de calidad sensorial de las frutas, así como de contaminación química y biológica que ponga en riesgo tanto la fitosanidad, la inocuidad y en su conjunto la seguridad alimentaria.



**Figura 2. Factores Involucrados en la el Aseguramiento de la Calidad e Inocuidad de Frutas Frescas.**

Durante la producción de cualquier producto hortofrutícola, existen puntos en los que éste puede ser contaminado con productos químicos, microorganismos patógenos para el consumidor y residuos de materiales sólidos. Esta contaminación puede deberse al contacto con superficies deficientemente sanitizadas, o a la manipulación directa que realizan trabajadores con malos hábitos de higiene. Mediante la aplicación de los

sistemas APPCC es posible localizar los puntos de la producción en los cuales el producto se encuentra susceptible a la contaminación y determinar cuáles son las medidas necesarias para prevenir, disminuir o eliminar dicha contaminación.



**Figura 3. Puntos Críticos durante la producción de Frutas Frescas.**

Para lograr su objetivo, el Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos se basa en siete principios básicos que son:

1. Análisis de riesgos.
2. Identificación de Puntos Críticos
3. Establecimiento de límites críticos
4. Establecimiento de procedimientos de monitoreo

5. Establecimiento de acciones correctivas
6. Establecimiento de procedimientos de verificación
7. Establecimiento de documentación

Un **plan** APPCC es el documento escrito basado en estos siete principios, mientras que un **sistema** de Buenas Prácticas Agrícolas será el resultado de la implementación en la producción de dicho plan.

### **III. Características principales de los siete principios básicos de un plan APPCC en la producción de frutas frescas**

#### **Principio 1: Análisis de Riesgos**

El objetivo del análisis de riesgos es identificar los contaminantes potenciales de la producción así como las medidas adecuadas para su control. Esto se logra mediante la elaboración de una lista que contenga a los agentes contaminantes que tienen importancia, ya que existe un riesgo considerable de contaminación y como consecuencia de ello un daño en la salud del consumidor cuando no son controlados de manera efectiva.

Para la realización del análisis debe considerarse todo el ciclo del producto hortofrutícola, cada paso desde el cultivo, cosecha, selección, acondicionamiento; así como su almacenamiento, distribución final antes del consumo.

Así, el análisis de riesgos cumple tres objetivos:

1. Identificación de los contaminantes físicos, químicos y microbiológicos; y sus medidas de control.
2. Identificación de las modificaciones necesarias que deben realizarse en el ciclo de producción para fomentar la inocuidad y seguridad alimentaria de las frutas.
3. Proporcionar las bases para la identificación de los Puntos Críticos de Control (PCC) en el principio 2.

#### **Principio 2: Determinación de los Puntos Críticos de Control PCC.**

Una vez que se ha realizado el listado de los riesgos relacionados con la producción, cosecha, almacenamiento y distribución, el siguiente paso es determinar en qué punto del proceso es más susceptible a la contaminación, y cuándo y cómo puede ser controlada.

Un Punto Crítico de Control es un paso de la producción en el que debe aplicarse un control para prevenir, eliminar o reducir uno o varios riesgos de contaminación hasta un nivel permisible, si este estuviera regulado.

Para la realización de este principio, generalmente se recurre al uso del “árbol de decisión”, que es un diagrama que permite la identificación precisa y completa de los Puntos Críticos.

### **Principio 3: Establecimiento de límites críticos**

Los límites críticos son valores máximos o mínimos de contaminantes biológicos, físicos o químicos, que no deben ser sobrepasados en un Punto Crítico de Control, con el fin de prevenir, eliminar o reducir a un nivel aceptable la existencia de un contaminante.

Cada PCC tendrá una o más medidas de control para asegurar que los riesgos de contaminación identificados sean previstos, eliminados o reducidos a niveles aceptables. De la misma manera, cada medida de control tiene uno o más límites críticos asociados. Estos límites deben derivarse de fuentes como regulaciones sanitarias, literatura técnica, así como resultados experimentales específicos para el producto

### **Principio 4: Establecimiento de procedimientos de monitoreo**

El monitoreo y análisis es una secuencia planeada de observaciones y mediciones que se utiliza para determinar si un PCC está bajo control. Además proporciona un registro preciso del historial de cada producción que puede ser útil en futuras verificaciones.

Los tres propósitos principales del monitoreo son:

- ❖ Realizar un seguimiento de las operaciones, para así por ejemplo si se presenta una tendencia a perder el control de un PCC se puede reaccionar oportunamente y retomarlo antes de que se sobrepase su límite crítico.
- ❖ Determinar cuando se está perdiendo el control de los PCC, al haber sido excedido alguno de los límites críticos establecidos, en este caso, deben realizarse las acciones correctivas necesarias (principio 5).
- ❖ Proveer una documentación escrita necesaria para la verificación del proceso (principio 6).

Idealmente el monitoreo debe ser continuo, lo cual es posible en la mayoría de los métodos microbiológicos, químicos y físicos utilizados. Además, los procedimientos necesitan ser rápidos, ya que sus resultados están relacionados con la producción en fresco y no hay tiempo para pruebas analíticas lentas. Algunas de las actividades de monitoreo que reúnen estas características son las mediciones como contaminantes químicos y biológicos, plaguicidas, contaminación con bacterias, presencia de insectos, hongos, y contaminantes físicos.

#### **Principio 5: Establecimiento de acciones correctivas**

El sistema APPCC está diseñado para identificar los riesgos de contaminación, así como establecer estrategias para prevenir, eliminar o reducir su presencia. Sin embargo, en circunstancias reales estas estrategias no siempre prevalecen y pueden ocurrir desviaciones en el proceso establecido. Estas desviaciones pueden ocasionar la producción de un producto inseguro para la salud del consumidor.

El principal propósito de las acciones correctivas es prevenir que estos productos potencialmente dañinos para el consumidor, lleguen hasta él. Para lograrlo, es necesario que al identificarse una desviación o alteración en la ruta crítica en el proceso, en la que se exceda algún límite crítico establecido para un PCC se realicen las acciones correctivas correspondientes, que pueden ser eliminar el o los frutos contaminados.



### **Principio 6: Establecimiento de procedimientos de verificación.**

La verificación es el procedimiento que, junto con el monitoreo, determina la validación de un plan APPCC; y de la misma manera asegura que el sistema opera de acuerdo al plan. Este procedimiento es indispensable para mantener la funcionalidad en un sistema APPCC. Para asegurar la eficiencia del plan APPCC debe verificarse que éste es seguido correctamente, y además debe realizarse una revisión del monitoreo de cada PCC y de los registros de sus acciones correctivas.

Otro aspecto importante de la verificación es la validación inicial del plan APPCC para determinar si está científicamente fundamentado, si todos los riesgos de contaminación han sido identificados y si las medidas de control de los riesgos son las adecuadas.

### **Principio 7: Establecimiento de documentación y de conservación de registros.**

Para mayor efectividad de un sistema APPCC es necesario elaborar y mantener al día un historial de la producción. Este historial debe incluir las principales características del plan APPCC original y de las modificaciones que ha sido necesario realizar al establecer el sistema. Además, debe llevarse un registro periódico de las operaciones realizadas en los puntos críticos establecidos por el plan, que incluyan las observaciones de los límites críticos, monitoreo y acciones correctivas realizadas.

Es recomendable el establecimiento de formatos específicos de observaciones en cada producción, para así lograr un seguimiento ordenado de sus características principales.

## **IV. Acciones preliminares a la implementación de un plan APPCC.**

Para poder desarrollar un plan APPCC, es necesario primero conocer las características de la producción, por lo cual debe realizarse una descripción del producto del producto hortofrutícola, de su proceso de cosecha, acondicionamiento, almacenamiento y distribución. Generalmente para lograr la especificación del producto se siguen los siguientes pasos:

- ❖ Descripción del producto, su proceso y distribución

- ❖ Desarrollo de un diagrama de flujo que describa el proceso
- ❖ Verificación *in situ* del diagrama de flujo

Tomando como base las características de la producción, puede iniciarse el diseño del plan, adaptando los siete principios básicos del APPCC al proceso, y una vez definido el plan puede procederse a la implementación del sistema de Buenas Prácticas de Agrícolas del mismo.

Como se mencionó antes, los sistemas APPCC tienen como objetivo la identificación y control de los puntos en el proceso en los cuales el producto se encuentra susceptible a la contaminación, sin embargo esta no es la única medida necesaria para el control de riesgos. La prevención de la contaminación durante todas las etapas de una producción es indispensable para la tener frutas inocuas y que garanticen la seguridad para el consumidor.

La inocuidad y seguridad de frutas por tanto, se logra mediante el uso de las Buenas Prácticas Agrícolas, ya que manteniendo controladas las técnicas de cosecha y manejo; y adecuadas condiciones de higiene en los trabajadores y en las instalaciones de acondicionamiento, empaque y almacenamiento, es posible reducir el riesgo de contaminación de las frutas frescas.

Dada la importancia de mantener estas condiciones en el entorno de la producción, debe establecerse previamente a la implementación de un plan APPCC, un programa de prevención de contaminación, el cual generalmente se denomina "*Requisitos preliminares a la implementación del plan APPCC*". El diseño de este programa, aunque depende del tipo de fruta producida, básicamente debe estar compuesto de las siguientes secciones:

- ❖ Área de cultivo
- ❖ Instalación
- ❖ Equipo
- ❖ Transporte
- ❖ Agua de proceso
- ❖ Limpieza y sanitización
- ❖ Control efectivo de plagas
- ❖ Higiene y salud de los trabajadores

Así, considerando lo anterior, el desarrollo de un sistema de Buenas Prácticas Agrícolas debe seguir los siguientes pasos:

1. Especificación del producto, su proceso y distribución.
2. Diseño del plan APPCC.
3. Diseño del programa “Requisitos previos a la implementación del plan APPCC”.
4. Implementación del programa de “Requisitos previos a la implementación del plan APPCC”.
5. Implementación del sistema de BPA en la producción.

#### **V. Conceptos de Buenas Prácticas Agrícolas.**

Se refiere a buenas prácticas generales usadas en la explotación del cultivo y cosecha de frutas, para reducir los riesgos de contaminación por agentes físicos, microbiológicos y químicos.

Es el conjunto de prácticas generales de producción de frutas frescas, empleadas en la precosecha, el cultivo, la cosecha, la selección, el empaque, el almacenaje y el transporte e higiene del trabajador, efectuadas en el campo, que previenen la ocurrencia de errores o, al menos su detección en cuanto se hagan evidentes, antes de representar mayores costos.

Las Buenas Prácticas Agrícolas son un conjunto de principios, normas y recomendaciones técnicas, aplicables a las diversas etapas de producción de productos frescos, con el fin de brindar un producto inocuo para el consumo directo o su proceso agroindustrial. Su aplicación tiene como objetivo ofrecer al mercado productos de elevada calidad e inocuidad, que generen un mínimo impacto ambiental.

Las BPA son el componente fundamental de inocuidad y corresponden a una serie de recomendaciones establecidas para asegurar un ambiente limpio y seguro para los trabajadores, así como para minimizar el potencial de contaminación de los productos alimenticios.

El programa de Buenas Prácticas Agrícolas considera durante la precosecha aspectos como: características del terreno; uso de fertilizantes, procedencia y manejo de aguas de riego; Manejo y uso de plaguicidas.



Figura 4. Etapas de la Producción de Frutas consideradas dentro de las BPA.

### 5.1 Objetivo de las BPA

*“El objetivo de las BPA consiste en reducir la probabilidad de contaminación del cultivo que pueda poner en riesgo la inocuidad de las hortalizas y frutas o su aptitud para el consumo en etapas posteriores de la cadena alimentaria”.*

### 5.2 Tipos de riesgos potenciales

#### Riesgos Físicos

- a) **Metal:** Objetos personales, Medallas, Aretes, Anillos, Alfileres, Utensilios, Maquinaria, Agrícola, Tornillos, Tuercas, Alambre
- b) **Vidrio:** Botellas, Frascos, Focos, Utensilios
- c) **Plástico:** Materiales de empaque tarimas, Bolsos, Botellas
- d) **Madera:** Tarimas, Cajas, Edificio
- e) **Otros:** Piedras, Hueso, Baterías

### **Riesgos Químicos**

**Naturales:** Toxinas de hongos

#### **Artificiales**

**Agrícolas:** Plaguicidas, Fertilizantes, Antibióticos, Hormonas

**Metales Pesados:** Plomo, Arsénico, Mercurio, Cadmio

### **Riesgos microbiológicos**

**Protozoarios,** fuente: Agua no tratada, excremento humano y animal

**Virus,** fuente: Agua y Hielo contaminados, personas enfermas y estiércol

**Bacterias,** fuente: Agua y hielo contaminados personas enfermas y estiércol de rumiantes.

## **5.3 Algunas buenas prácticas agrícolas en el terreno**

- Mantener alejados de las áreas de cultivo a los animales domésticos, especialmente en la temporada de cosecha.
- Mantener el ganado encerrado en corrales
- Construir barreras físicas para prevenir el acceso a las áreas de cultivo, como zanjas, terraplenes, bordos, acequias con mulch, pilas y franjas de vegetación para evitar que la materia fecal o cualquier otra fuente contamine las áreas de cultivo.
- Controlar la fauna silvestre (como ardillas, ratas, conejos y aves) hacia áreas de cultivo que no estén orientadas a mercados de productos frescos ni a otro de interés comercial.
- Destinar instalaciones o áreas específicas y adecuadas para la disposición de basura y otros desechos que son fuente de contaminación.
- Eliminar los residuos de la cosecha anterior.
- Elaborar un mapa del terreno que sirva posteriormente para la rotación de cultivos y elección de fechas de siembra.
- Adoptar técnicas de buen manejo que eviten o minimicen la erosión.
- Esterilizar el suelo mediante solarización.
- Evaluar la posibilidad de evitar la desinfección química del suelo, previniendo posibles contaminaciones que perjudican la estructura del mismo suelo, así como del ambiente.
- Selección de terrenos con condiciones beneficiosas en cuanto a suelo, agua, luz, viento y clima.

- Disponer de abonos orgánicos en un área alejada del campo de cultivo, para evitar la contaminación fecal u otros contaminantes.
- Construcción de cercas para evitar la entrada de animales.
- Destinar áreas específicas y adecuadas para la colocación de basura y otros desechos.

#### **5.4 Buenas Prácticas Agrícolas para el uso de abonos orgánicos**

- Los estercoleros deben tener una plataforma impermeable y bajo techo donde se almacenen los estiércoles frescos.
- Los sitios donde se realiza la preparación de abonos orgánicos, deben localizarse en un lugar aislado del sitio donde se produce el cultivo, así como de las áreas donde se manipulan o almacenan las cosechas.
- Aplicar los abonos orgánicos con la suficiente anticipación a la cosecha (3 meses) y de preferencia, incorporarlos al suelo.
- No aplicar abonos orgánicos durante el ciclo del cultivo de las hortalizas.
- No aplicar abonos orgánicos ante la presencia de viento o lluvia.
- Establecer un margen de seguridad de 2 - 10 mt. de la zona donde pasa el agua de riego o canales de drenaje.
- Lavar bien los equipos que hayan estado en contacto con los abonos orgánicos, antes de ser utilizados nuevamente.
- Evitar el tránsito de los trabajadores por lugares donde hay abono orgánico.

#### **5.5 Buenas Prácticas Agrícolas relacionadas con la fuente de agua**

- El área de protección entre el pozo y las fuentes de contaminación que no puedan ser eliminadas, deberá tener un radio mínimo de 30 metros.
- Utilizar filtros de agua (1 – 2 micras) para evitar la contaminación con microorganismos patógenos.
- Diseñar estructuras para detener las escorrentías superficiales provenientes de otros terrenos que pueden estar infectados.
- Descartar pozos poco profundos proclives a frecuentes contaminantes fecales.
- Usar técnicas de riego que minimicen el contacto entre el agua y la parte comestible de la hortaliza.

- Utilizar agua potable (0.5 ppm de cloro residual) para el lavado y enjuague de hortalizas.
- Cambiar el agua de lavado de hortalizas con una frecuencia tal que prevenga la acumulación de materia orgánica.
- Monitorear continuamente la concentración del cloro libre residual del agua.
- Suministrar agua potable a los trabajadores, para prevenir padecimientos de enfermedades gastrointestinales.
- Identificar fuentes potenciales de contaminación
- Considere prácticas que protejan la calidad de agua, tales como utilización de tuberías para conducción
- Mantener las acequias o canales por donde circula el agua, libre de basura
- Realizar análisis de agua frecuentemente

### **5.6 Algunas Buenas Prácticas Agrícolas en el uso de plaguicidas son las siguientes**

- Respetar los tiempos de carencias indicados.
- Seleccionar el uso de plaguicidas menos dañinos para el ambiente, así como para las poblaciones de organismos benéficos y enemigos naturales.
- Analizar la calidad del agua para las aspersiones, en especial el pH, ya que en medios alcalinos, los plaguicidas no funcionan.
- Colocar advertencias con la leyenda “PELIGRO”, en los terrenos donde se ha aplicado plaguicidas, y retirarlos al momento de cumplirse el período.
- Capacitar a los operarios en las técnicas y procedimientos apropiados de aplicación y manejo de plaguicidas.
- Almacenar los plaguicidas en lugares cerrados y con llave, y retirarlos de los terrenos de cultivo o lugares de manipulación y almacenamiento de cosechas, a fin de prevenir la contaminación.
- Conservar los plaguicidas en estantes de acuerdo a su tipo: insecticidas, nematocidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, etc., en sus recipientes o presentaciones originales y disponer de un inventario de los productos almacenados.
- Calibrar y revisar periódicamente el equipo de aspersión de plaguicidas, de tal manera que se pueda controlar las dosificaciones de los productos que se emplean.

## 5.7 Buenas Prácticas Agrícolas durante la cosecha

- Cosechar en el estado de madurez apropiado para cada producto; tomar una muestra del producto con el grado de madurez, tamaño y color aceptables para ser cosechados y dejarla como referencia a los trabajadores, dando indicaciones claras antes del inicio de la jornada de cosecha, comprobando que el personal ha comprendido su papel.
- Evitar realizar esta tarea en horas de alta temperatura o inmediatamente después de una lluvia.
- No dejar tirados en el campo restos de cosecha, pues éstas se pudrirán y contaminarán el lugar, manteniendo elevado los niveles de inóculo.
- Depositar cuidadosamente las hortalizas frescas en los recipientes de cosecha, evitando arrojarlos, golpearlos, presionarlos o frotarlos.
- Transportar los productos rápidamente al lugar de empaque.
- Mantener el producto a la sombra y cubrirlo adecuadamente en el caso que no sea empacado de inmediato.
- No almacenar hortalizas cosechadas cerca de productos tales como: fertilizantes, plaguicidas, gasolina, lubricantes, pescado, etc.
- Antes del empacado, se debe eliminar tierra u otros materiales extraños, utilizando agua limpia y tratada con productos recomendados para tal fin.
- La contaminación de las hortalizas y del medio ambiente por plaguicidas, es consecuencia del uso de los mismos en forma inadecuada, aplicación de concentraciones mayores a las necesarias, así como por utilizar formas de aplicación incorrectas.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- FAO/OMS, 1993. Directrices para la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de Control (HACCP). Comisión del Codex Alimentarius, FAO/OMS.
- FAO/OMS, 1998. Comisión del Codex Alimentarius. Código internacional Recomendado de prácticas principios generales, de Higiene de los Alimentos, Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, Organización Mundial de la Salud Codex Alimentarius, 2da. Ed. 1998.
- FAO/OMS, 1998. Documento de debate relativo al anteproyecto del código de prácticas de higiene para la producción primaria, la recolección y el envasado de productos frescos. Comisión del Codex Alimentarius, FAO/OMS. CX/FH 98/7. 1998.
- FAO/OMS, 2000. Anteproyecto de Código de prácticas de higiene para el cultivo, la cosecha y



el empaqueo de las frutas y hortalizas frescas.

- FAO/OMS. 2000. Documento de trabajo sobre la utilización del sistema de HACCP en las pequeñas empresas y/o las empresas menos desarrolladas (PEMD) (preparado por los países bajos). Comisión del Codex Alimentarius, FAO/OMS, 2000.
- FAO/OMS. 2000. Anteproyecto de código de higiene para frutas y hortalizas precortadas (en el trámite 3). Comisión del Codex Alimentarius, FAO/OMS; octubre de 2000.
- FAO/OMS. 2000. Anteproyecto de Directrices para la reutilización higiénica del agua utilizada para la elaboración en las fábricas de alimentos. Comisión del Codex Alimentarius, FAO/OMS; octubre de 2000.
- MARTÍNEZ TELLEZ, 2002. Guía Mexicana de Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura. SAGARPA (México)
- SAGARPA, 2002. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. Guía para el agricultor, Buenas Prácticas Agrícolas para frutas y hortalizas frescas. Unidad Inocuidad de Alimentos, Comisión Mexicana para la cooperación con Centroamérica.(México)ISBN970-18-7941-4.
- SAGARPA (2002) Manual de Calidad. Verificación Interna, POES y Registros para unidades de producción y empaque de frutas y hortalizas, unidad de Inocuidad de Alimentos Comisión Mexicana para la Cooperación con Centroamérica(México).ISBN970-18-7942-2.
- USFDA, 1998. Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y hortalizas. Abril 1998.
- VIFINEX-OIRSA. 1999. Manual para el aseguramiento de la calidad en la producción de frutas y hortalizas, Ministerio Agropecuario y Forestal MAGFOR, Proyecto VIFINEX Managua Nicaragua 1999.
- VIFINEX-OIRSA. 2002. Buenas Prácticas Agrícolas en papaya. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. 50 p.
- VIFINEX-OIRSA. 2000. Buenas Prácticas de Manufactura en Limón pérsico. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. 15 p.

**Agradecimiento**  
**Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y**  
**Tecnológica CONACyT - Gobierno del Estado de Tamaulipas**  
**por el apoyo brindado para la realización de este libro.**

En todo el orbe, los países desarrollados y en desarrollo, afrontan desafíos inéditos para establecer sistemas que garanticen la inocuidad de los alimentos. Estos desafíos surgen de la acelerada urbanización, la globalización del comercio de alimentos, el cambio en los hábitos de consumo y las técnicas más intensivas de producción de alimentos. En este contexto, la FAO está creando una amplia estrategia que permita a los países miembros, responder a estos desafíos, lo que les permitirá asegurar un suministro de alimentos con carácter de "INOCUO Y NUTRITIVO" a sus poblaciones.

Para asegurar que un alimento sea inocuo, es necesario detectar, controlar o eliminar todo tipo de contaminación, en cualquiera de las etapas de la cadena de producción, incluidos los piensos, los tratamientos químicos en las fases de producción y poscosecha, e incluso la tierra o el agua que tienen interacción con los alimentos. Para reducir los riesgos alimentarios se necesitan sistemas jurídicos, técnicos y administrativos eficaces. Hasta ahora, la inocuidad de los alimentos depende de la aplicación de medidas como retirar del mercado alimentos nocivos "después de los hechos", en vez de prevenir que surjan problemas de inocuidad de los alimentos a través de actividades concertadas. Esto ha dado como resultado, que la orientación de muchos sistemas de reglamentación de la inocuidad de los alimentos sean una reacción a las circunstancias y se rijan por criterios de aplicación, en lugar de recurrir a un método preventivo para evaluar y reducir los riesgos.

La INOCUIDAD ALIMENTARIA preocupa por igual a los consumidores, los agricultores, la industria alimentaria, la industria restaurantera, la industria pesquera, áreas de salud, los gobiernos y toda empresa que tenga algún nexo con los alimentos. Particularmente preocupa y ocupa a los académicos e investigadores quienes buscan con sus descubrimientos alcanzar mejores estándares de calidad en los alimentos.

Los descubrimientos relacionados con la Alimentación y la Salud, se basan en la complementariedad de diversas disciplinas, que aúnan estudios experimentales, estudios clínicos, bioquímicos, biológicos y epidemiológicos junto con el análisis de las condiciones culturales, sociales, económicas, agrícolas y tecnológicas que constituyen los recursos de las poblaciones. Por este motivo muchos profesionales de diferente perfil se aproximan desde sus respectivos campos a esta compleja disciplina que es la alimentación y la nutrición.

El objetivo de este libro es aportar nuevas perspectivas sobre temas relacionados a la Inocuidad Alimentaria para el beneficio público y el desarrollo de las Ciencias de los Alimentos, especialmente en lo que se refiere al fomento de áreas de trabajo como la investigación, la formación y la educación, así como la práctica clínica y comunitaria, junto a todos aquellos aspectos que supongan un avance científico en estos campos.

#### Agradecimiento

Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACyT - Gobierno del Estado de Tamaulipas  
por el apoyo brindado para la  
la publicación de este libro

Ciencia/tecnología

ISBN: 978-970-722-783-5



9789707227835

