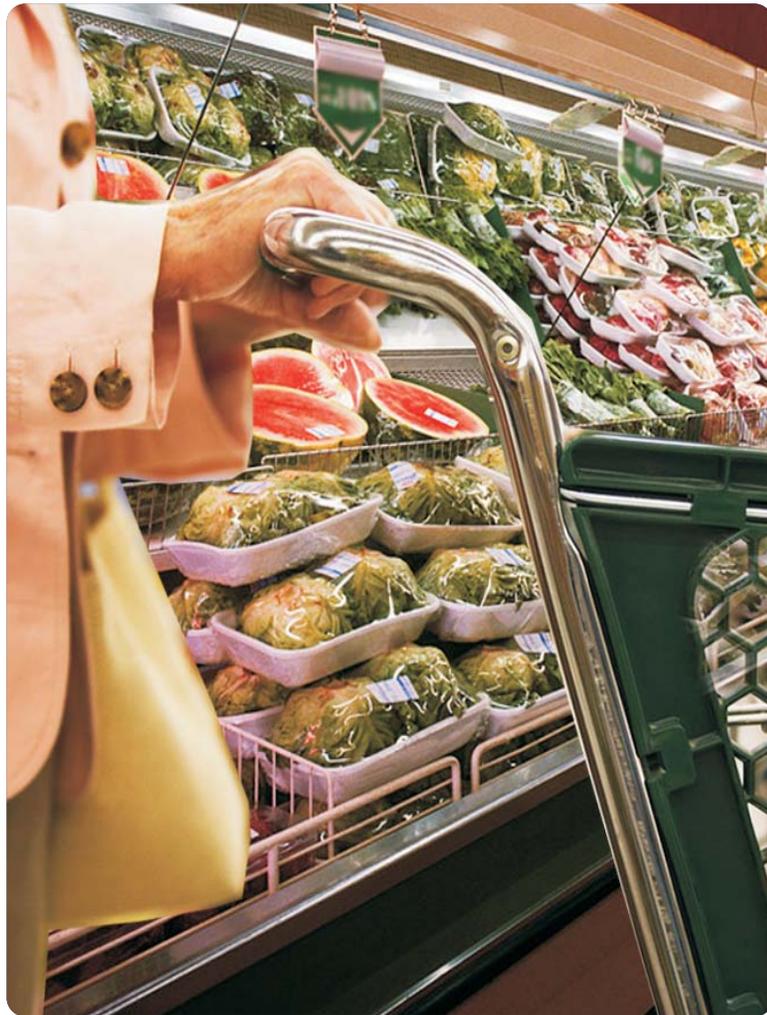




# Revista de la Facultad de Ingeniería Química





### Directorio

M. Phil. Alfredo F. J. Dájer Abimerhi  
Rector

Dr. Carlos Echazarreta González.  
Director General de Desarrollo Académico

Dr. Francisco Fernández Repetto  
Coordinador General de Extensión

### Facultad de Ingeniería Química

I.Q.I. Carlos Alberto Estrada Pinto, M. en C.  
Director

I.I.Q. Luis Alberto Flores Prén  
Secretario Administrativo

Dra. Alma Irene Corona Cruz  
Secretaria Académica

Dra. Marcela Zamudio Maya  
Coordinadora de Posgrado e Investigación

### Consejo Editorial

Dr. Luis Antonio Chel Guerrero  
Editor Técnico

M en C. Enrique Gonzalez Fajardo

M en C. Angel Torreblanca Roldan

Dr. Arturo Castellanos Ruelas

Dr. Jose I. Rivas Burgos

Dr. Rafael Rojas Herrera

Dr. David Betancur Ancona

M.en EIA. Lilia Madariaga Salazar

### Edición y Diseño Gráfico

QI. Miriam Chan Pavón, M. en C.  
LDGP Luis Enrique Flores Rivero



Premio  
Nacional  
de Tecnología  
2 0 0 2

## BIOCONSERVACIÓN DE CARNE MOLIDA DE RES Y CERDO 3

Artículo Científico

*A. López-López y R. Jiménez-Vera*

## EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA 10 ENZIMA POLIFENOLOXIDASA DEL AGUACATE (*Persea americana* MILLER) VAR. HASS

Nota de Investigación

*E. Amaya-Paredes, R. Tarkus-Patiño, M. Dominguez-Magaña.*

## CADUCIDAD DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS: IMPLI- 17 CACIONES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS

Revisión Bibliográfica

*J. Ruiz-Ruiz, M. Segura-Campos, L. Chel-Guerrero y D. Betancur-Ancona.*

## PERSPECTIVAS DE LA INMOVILIZACIÓN DE INGRE- 25 DIENTES ACTIVOS POR MICROENCAPSULACIÓN.

Revisión Bibliográfica

*J. Pacheco-Aguirre, G. Rosado-Rubio, D. Betancur-Ancona  
y L. Chel-Guerrero.*

## USO DE UNA PLATAFORMA DE EDUCACIÓN EN LÍNEA 34 COMO COMPLEMENTO DIDÁCTICO DE UN CURSO PRESENCIAL DE FÍSICA PARA ESTUDIANTES DE INGE- NIERÍA QUÍMICA.

Avance de Investigación

*M. Rodríguez-Martín, M. Chan-Pavón y A. Medina-Lara.*

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES 39

La Revista de la Facultad de Ingeniería Química es una publicación semestral relacionada con la Ingeniería Química, la Química Industrial, la Ingeniería Industrial Logística, los Alimentos y la Administración de la Tecnología, vinculada con su enseñanza, investigación y aplicación en el sector productivo. Número 47. Todo material impreso puede reproducirse mencionando la fuente. Los artículos firmados expresan la opinión del autor y no necesariamente el de la dependencia. La correspondencia dirigirla a: Facultad de Ingeniería Química. Periférico Nte. Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, Mérida, Yuc., Méx. C. P. 97203. Tels.+52 (999) 946-09-56, 946-09-93. Responsable de Edición: QI. Miriam Chan Pavón, M. en C. Correo electrónico: revista@fiq.uady.mx ISSN 0188-5006.

# BIOCONSERVACIÓN DE CARNE MOLIDA DE RES Y CERDO

A. López López y R. Jiménez-Vera

## RESUMEN

La carne molida puede ser un vehículo para la transmisión de microorganismos patógenos debido a la inadecuada manipulación durante su proceso. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* (NRRL-1445) y *Leuconostoc mesenteroides* en el crecimiento de grupos bacterianos indicadores de carne molida. Se utilizaron 250 g de carne molida de res y de cerdo, se homogenizaron con la biomasa centrifugada de 25 mL de cultivo de *L. casei* Shirota o *L. mesenteroides* y se mantuvieron en refrigeración ( $6.88 \pm 0.22$ ) durante cuatro días. Se evaluó el crecimiento de bacterias lácticas (agar MRS), mesófilos aerobios (agar para cuenta estándar), coliformes totales (agar de bilis y rojo violeta) y *Staphylococcus aureus* (agar de sal y manitol). La acidez se cuantificó empleando un método volumétrico. En carne de cerdo se observó mayor crecimiento de *L. mesenteroides* (Log 8.00 UFC/g), mientras que en carne de res, de *L. casei* Shirota (Log 9.20 UFC/g). La acidez fue mayor con el uso de *L. casei* Shirota en carne de cerdo (0.9%). A los cuatro días, la concentración de coliformes y *S. aureus* en carne de cerdo disminuyó hasta valores permitidos por la NOM-034-SSA1-1993 y la NOM-194-SSA1-2004. En carne de res, se observó un efecto bacteriostático en todas las bacterias evaluadas. La adición de bacterias lácticas es una opción para mejorar la calidad microbiológica de la carne molida mantenida en refrigeración.

**Palabras clave:** biopreservación, carne molida, bacterias lácticas.

## Introducción

La carne ha formado parte de la dieta humana desde la prehistoria y en la actualidad su consumo sigue siendo importante, sin embargo, puede ser el vehículo en la transmisión de microorganismos patógenos debido a la inadecuada manipulación durante las diferentes etapas de su proceso como la matanza, transporte y venta. La carne molida es una de las carnes que se puede calificar de consumo medio o por la población de ingresos medios (Gallardo et al, 2006); sin embargo, constituye un medio ideal para el crecimiento de microorganismos debido a sus características de pH, humedad y nutrientes (Bello, 2000)

Por otra parte, dependiendo del origen, la carne puede estar asociada a diferentes grupos bacterianos patógenos, como la presencia de *E. coli* O157:H7 la cual se ha relacionado con la carne de res (Cliver, 1993), mientras que la contaminación por *Salmonella* está relacionada con carne de pollo (Prändl et al, 1994), pescado (Zamudio et al, 2002) y cerdo (Bello-Pérez et al, 1990; Noël et al, 2006). En carne de res se ha reportado la presencia de bacterias patógenas como *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens*, que pueden estar presentes en la superficie (Varnam y Sutherland, 1995). En carne de cerdo se ha reportado la presencia de *Yersinia enterocolitica* en una frecuencia de 20% (Elizalde et al, 2001) y *Brucella* sp. (Farro et al, 2002).

Durante los últimos años la calidad microbiológica de los productos cárnicos se ha mejorado mediante el uso de conservadores (Bello, 2000), sin embargo, estos compuestos pueden ser tóxicos para el humano. Una opción para inhibir el crecimiento de la flora patógena en productos cárnicos es la acidificación por medio de bacterias lácticas. En estudios realizados por Guerrero et al (1995) y Montel y Talon (1993) sobre producción in situ de ácido láctico en filetes de carne de cerdo se encontró que es posible inhibir el crecimiento de la flora patógena y de descomposición como *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Serratia* sp., *Brochotrix thermosphacta* y *Pseudomonas putida*. Por otra parte, Woolthius et al (1984), Smulders et al (1986) y Ogden et al (1995) reportaron que es posible evitar efectos negativos en la carne, como color, textura y sabor mediante el empleo de bacterias lácticas. La bioconservación se refiere un aumento en la vida de almacenaje y a la seguridad realizada de alimentos usando la microflora natural o sus productos antibacterianos. Las bacterias ácido lácticas tienen un potencial importante para el uso en la biopreservación porque son seguras de consumir y durante su almacenamiento dominan naturalmente la microflora de muchos alimentos (Stiles, 1996).

En este trabajo se comparó el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* Shirota y *Leuconostoc mesenteroides* en el crecimiento de grupos bacterianos indicadores en carne molida de res y cerdo.

## Materiales y Métodos

### Sustratos

Se utilizó carne de res y cerdo molidas, de calidad estándar, adquiridas en carnicerías locales. Fueron trasladadas y mantenidas en refrigeración hasta el momento de ser inoculadas con las bacterias lácticas.

### Microorganismos

Se utilizaron cepas de *Lactobacillus casei* (NRRL-1445) y *Leuconostoc mesenteroides* adquiridas por donación del cepario del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán. Las cepas fueron propagadas en 25 mL de caldo MRS a 37°C durante 24 h y centrifugadas a 1056 x g durante 5 min en centrífuga clínica (SOL-BAT, J-600). Para la elaboración del inóculo se eliminó el sobrenadante por decantación y la biomasa centrifugada se mantuvo en refrigeración hasta el momento de ser inoculada en las carnes (Jiménez-Vera et al, 2006).

### Condiciones de almacenamiento

Se utilizaron 250 g de carne molida de res y de cerdo, se homogenizaron con la biomasa centrifugada de 25 mL de cultivo de *L. casei* Shirota o *L. mesenteroides* y se mantuvieron en refrigeración ( $6.88 \pm 0.22$ ) durante cuatro días. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento, las cuales se mantuvieron en refrigeración ( $6.88 \pm 0.22$ ) durante los cuatro días en que se realizó el estudio; se tomaron 10 g de muestra cada 24 h.

### Cuantificación bacteriana

El crecimiento de los microorganismos se cuantificó por siembra en superficie (Corona y Jiménez, 2004). Se inocularon 5 µl de cada dilución en una caja de Petri. Para el recuento de UFC/g se multiplicó el total de colonias de la dilución mayor por 200 y por el inverso de la dilución. Para bacterias lácticas totales se utilizó agar MRS (Difco) y se incubó a 37°C en bolsa anaerobia durante 48 h (Rosenblatt y Stewards, 1975). Los mesófilos aerobios (Agar para cuenta estándar, Bioxon), coliformes totales (Agar de bilis y rojo violeta, Dibico) y *Staphylococcus aureus* (Agar de sal y manitol, Bioxon) se incubaron durante 24 h a 37°C en condiciones aerobias.

### Acidez

La acidez se cuantificó empleando un método volumétrico (Yanes, 1985). Se pesaron 10 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se adicionaron 20 mL de agua destilada libre de bióxido de carbono y tres

gotas del indicador fenolftaleína al 1%. Se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N hasta obtener una coloración rosa permanente

### Análisis estadístico

La variable de respuesta analizada fue la concentración bacteriana por gramo expresada en logaritmo base 10. Los resultados fueron presentados como media  $\pm$  desviación estándar y se analizaron mediante Análisis de Varianza con el procedimiento estadístico del programa Statgraphics Plus, versión 6.1. La diferencia entre medias fue considerada estadísticamente significativa a un nivel de probabilidad de  $P < 0.05$ .

### Resultados y Discusión

En el la Figura 1 se muestra el crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Leuconostoc mesenteroides* en ambas carnes. En carne de cerdo adicionada con *L. mesenteroides* se obtuvo la mayor concentración de bacterias lácticas a los cuatro días de almacenamiento; se presentó un crecimiento de Log 4.77 UFC/g hasta Log 8.00 UFC/g. En estudios realizados por Martínez y Martinis (2006), se reportó que el mejor crecimiento de *L. mesenteroides* ocurrió a temperaturas cercanas a la de refrigeración (8°C). En este estudio, la temperatura de almacenamiento pudo ser el factor que estimuló su crecimiento. Además, se ha reportado que la adición de pequeñas cantidades de Mn<sup>2+</sup> suprime el efecto inhibitorio de la aireación en el crecimiento de *L. mesenteroides* UD23 en leche, lo que sugiere un papel protector de Mn<sup>2+</sup> contra la toxicidad producida por O<sub>2</sub> (Bellengier et al, 1997a). Debido al buen crecimiento de esta bacteria en carne de cerdo, se puede suponer la presencia de este catión en la carne de cerdo. En un estudio realizado por Bellengier et al (1997b) sobre el cultivo mixto de *L. mesenteroides* con *Lactococcus lactis* se encontró que el crecimiento de *L. mesenteroides* UM10 fue menor en el cultivo mixto que en cultivo puro y el máximo de población fue 10 veces menor que el otro cultivo. Sin embargo, en la carne molida de cerdo, su crecimiento no estuvo influenciado negativamente por la microflora contenida en la carne.

La concentración de bacterias lácticas alcanzada en la carne de cerdo adicionada con *L. casei* Shirota (Log 5.70 UFC/g) fue menor ( $p < 0.05$ ) a la concentración alcanzada en la carne de cerdo testigo. En la carne molida testigo, aunque no se adicionaron bacterias lácticas, se obtuvo crecimiento de este tipo de bacterias (Log 6.10 UFC/g), probablemente inoculadas durante el proceso de elaboración de la carne. Entre los factores que influyen en el crecimiento bacteriano se encuentra la composición de los aminoácidos de las fuentes proteicas y las cadenas laterales de los aminoácidos, como la lactoferrina, que favorece el desarrollo de microflora con propiedades protectoras (Jiménez-Guzmán y García Garibay, 2006).

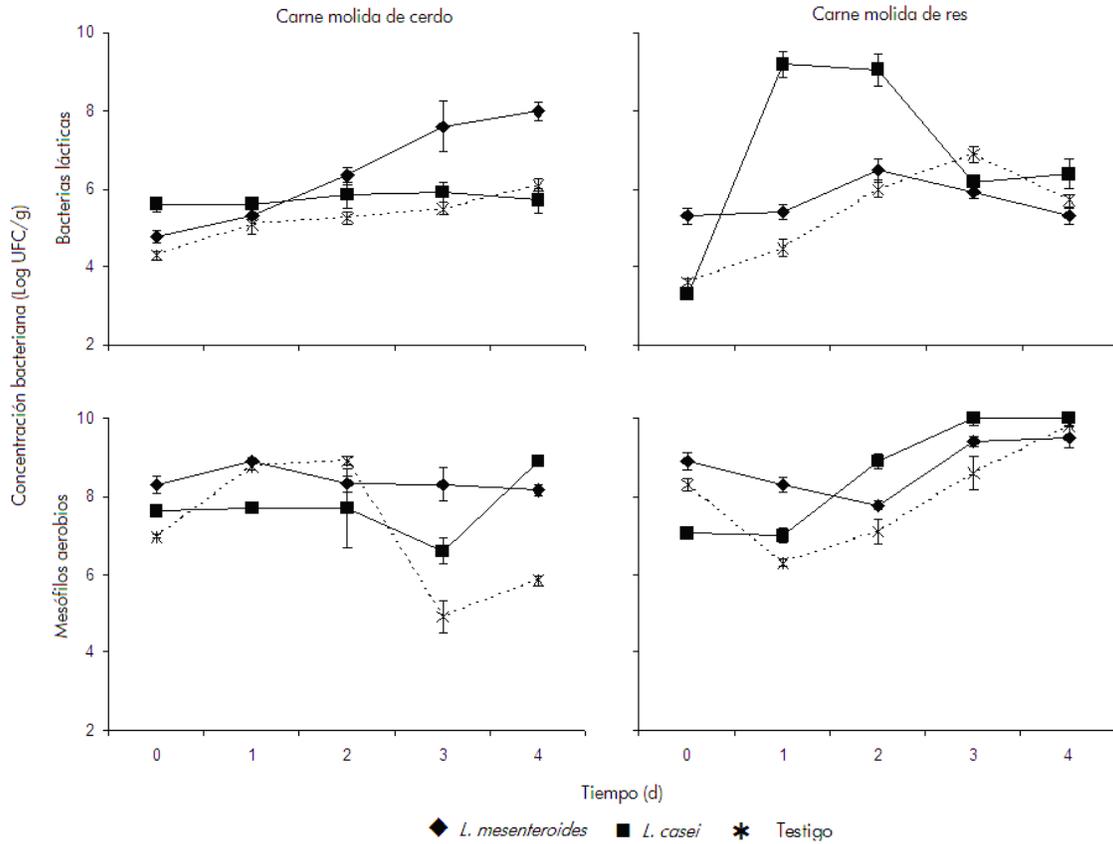


Figura 1. Crecimiento de bacterias lácticas y mesófilas aerobias en carne molida de res y cerdo.

A diferencia de la carne de cerdo, en carne molida de res el mayor crecimiento se obtuvo en la carne adicionada con *Lactobacillus casei* (Log 9.20 UFC/g) durante el segundo y tercer día de almacenamiento. Se ha reportado el crecimiento de *L. casei* en sustratos diferentes a la leche de vaca. En suero de leche, queso de leche de búfala y leche de soya se evaluó el crecimiento de un cultivo mixto de *Lactobacillus casei* Shirota y *Bifidobacterium adolescentis* a 37°C durante 8 h en una proporción de 1:1.5 y 5% (v/v) de tamaño del inóculo. Se obtuvieron concentraciones de Log 8.83 UFC/g para *L. casei* y Log 6.36 UFC/g para *Bifidobacterium* (Macedo et al, 1999).

Entre los principales sustratos empleados como fuente de carbono por las bacterias heterótrofas se encuentra la glucosa (Ingraham e Ingraham, 1998), sin embargo, en carne, se considera que este sustrato está presente en muy pequeñas cantidades. La carne fresca que no ha sufrido el *rigor mortis* contiene una pequeña cantidad de glucógeno y glucosa, que en su mayor parte se convertirá en ácido láctico durante el *rigor mortis*, de manera que la carne comercial no posee esencialmente ningún carbohidrato, o menos del 1% (Price y Schweigert, 1994), por lo que, el sustrato que indujo el crecimiento de *L. casei* Shirota en carne molida de res pudo estar en pequeñas concentraciones y terminarse para el

tercer día de almacenamiento en refrigeración. Por otra parte, es importante considerar la composición de aminoácidos de las proteínas, por ejemplo, en la lactoferrina del suero de leche se han reportado efectos prebióticos (Jiménez-Guzmán y García Garibay, 2006), lo que puede influir en el crecimiento de una bacteria probiótica.

En la Figura 1 se muestra el crecimiento de bacterias mesófilas. En la carne testigo fue donde se obtuvo la menor concentración de bacterias mesófilas mientras que en la carne adicionada con bacterias lácticas, se mantuvo la concentración inicial de mesófilos. Se ha reportado que en alimentos fermentados, el recuento de mesófilos aerobios incluye a las bacterias lácticas, las cuales pueden sobrevivir en ambiente microaerófilico, y su recuento se debe principalmente a las bacterias lácticas, razón por la cual en la carne testigo se obtuvieron valores más bajos. En la carne de res, en todos los tratamientos la tendencia de crecimiento fue similar, produciéndose un aumento en la concentración a partir del segundo día de almacenamiento. En los tres tratamientos, la mayor concentración se obtuvo a los cuatro días y no se obtuvo diferencia significativa en las concentraciones ( $p > 0.05$ ). El crecimiento de mesófilos se puede correlacionar con el buen crecimiento de *L. casei*, por lo que el incremento en mesófilos aerobios puede deberse al crecimiento de esta bacteria láctica.

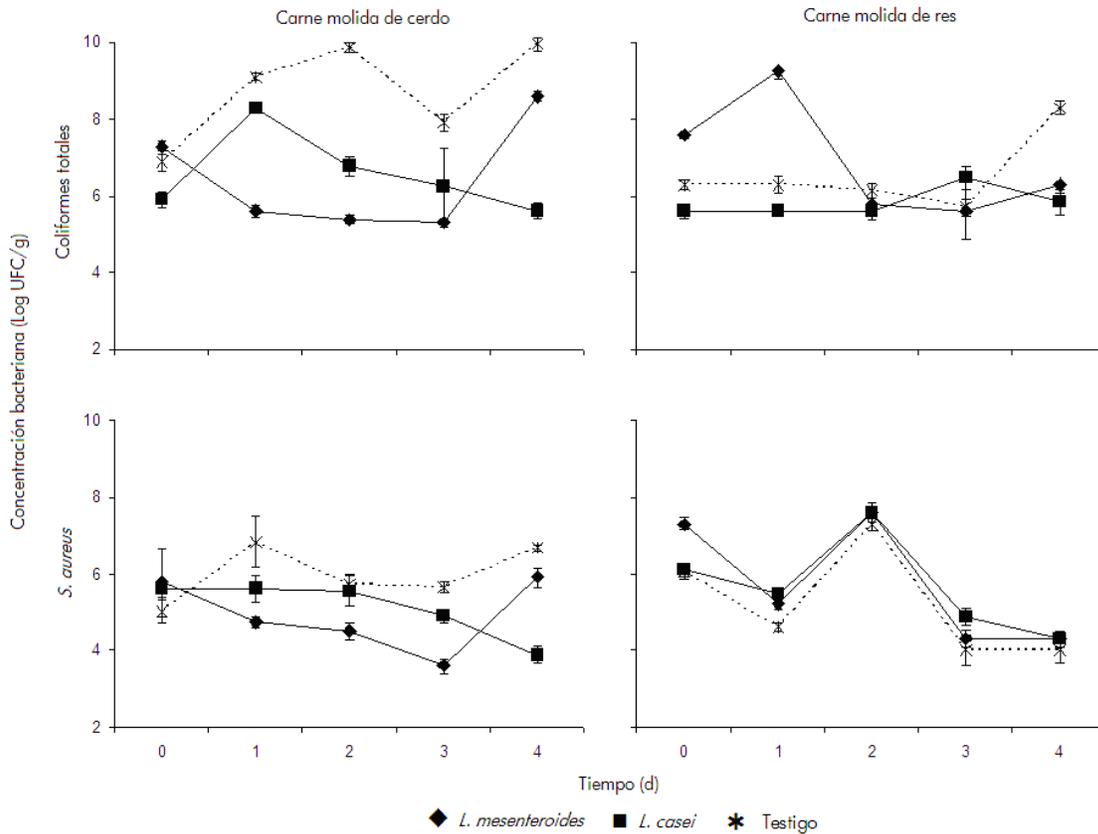


Figura 2. Crecimiento de coliformes totales y *S. aureus* en carne molida de cerdo y res.

El efecto de las bacterias lácticas sobre los coliformes se muestra en la Figura 2. En la carne de cerdo adicionada con bacterias lácticas se observó una disminución en la concentración de coliformes. Sin embargo, con *Leuconostoc mesenteroides*, la inhibición de coliformes sólo fue posible durante los tres primeros días de almacenamiento, mientras que con *L. casei* dicha inhibición se mantuvo todo el tiempo de la evaluación, y para el cuarto día, se registró la concentración más baja de coliformes (Log 5.60 UFC/g), valor por debajo de la concentración inicial. La diferencia en la concentración de coliformes entre el tratamiento con *L. casei* y el testigo a los cuatro días de almacenamiento en refrigeración fue significativa ( $p < 0.05$ ). En la carne de res adicionada con bacterias lácticas se mantuvo la concentración inicial de coliformes, mientras que en la carne testigo, a los cuatro días se obtuvo una concentración mayor a la inicial (Log 8.30 UFC/g). Estos valores, reflejan la inhibición del crecimiento de coliformes por bacterias lácticas.

El deterioro causado por microorganismos es resultado de las relaciones ecológicas entre el alimento y el microorganismo. En carne molida refrigerada, la Secretaría de Salud mediante la norma NOM-194-SSA1-2004, permite la presencia de coliformes hasta Log 3.70 UFC/g. En ninguno de los tratamientos evaluados fue posible estar dentro de los valores marcados como seguros debido

a que la carga bacteriana inicial estuvo por arriba de los parámetros permitidos, sin embargo, con la aplicación de bacterias lácticas, pudo detenerse el crecimiento de coliformes. Esta alta concentración de la flora en productos cárnicos se debe principalmente al proceso de molienda, ya que los molinos generalmente se mantienen en uso a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, esto genera la multiplicación bacteriana que se inocula a la carne cuando ésta es sometida a la molienda. Es importante aprovechar las propiedades de las bacterias lácticas para la conservación de la carne molida. Las propiedades antimicrobianas de algunas bacterias ofrecen diversas estrategias de biocontrol para su aplicación en productos cárnicos ya que no es necesario el lavado posterior. Si las condiciones de conservación no son las adecuadas, sólo se producirá multiplicación del microorganismo inoculado; esto alterará el producto y se evitará el consumo. Si la alerta es eficaz, el riesgo de brotes de toxoinfección alimentaria se verá minimizado.

Diversos estudios han demostrado la propiedad antibacteriana de las bacterias lácticas en relación a las bacterias coliformes. De acuerdo a un estudio realizado para evaluar la actividad antibacteriana de *Lactobacillus casei* (Yakult®) contra cuatro microorganismos patógenos: *E. coli* enterohemorrágica, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae*, se demostró la

actividad antibacteriana de *L. casei* contra estos patógenos (Consignado et al, 1993). Aunque a los cuatro días, el crecimiento de *L. casei* en carne de cerdo fue el menor, se obtuvo una buena inhibición del crecimiento de coliformes. La actividad antibacteriana de este probiótico se ha relacionado con la capacidad de acidificar el medio mediante la producción de ácido láctico (González et al, 2006).

En *Staphylococcus aureus*, sólo se obtuvo efecto inhibitor en la carne molida de cerdo adicionada con *L. casei*. Hay evidencia de que *Staphylococcus aureus* puede colonizar el tracto intestinal, especialmente en los pacientes hospitalizados. En un estudio in vitro se reportó que ciertas bacterias ácido lácticas, principalmente cultivos comerciales probióticos, son capaces de reducir la adhesión y la viabilidad de esta bacteria. Este efecto se debe probablemente a la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno (Vesterlund et al, 2006). En un estudio realizado por Arihara et al (1998) se reportó que la inoculación de *Lactobacillus acidophilus* disminuyó la propagación de *S. aureus*, así como su producción de enterotoxinas durante la fermentación de la carne. Los resultados sugieren que las bacterias lácticas probióticas pueden ser utilizadas para elaborar productos cárnicos seguros (Arihara et al, 1998). En este estudio, el efecto probiótico de las bacterias lácticas sólo se presentó en carne molida de cerdo.

En las Figura 3 se muestra la producción de ácido láctico en ambos tipos de carne. Se observó una mayor producción de acidez en la carne de cerdo adicionada con *L. casei* (0.9% como ácido láctico), lo que se relacionó con una mayor inhibición del crecimiento de coliformes y *S. aureus*. En la carne adicionada con *L. mesenteroides*, se mantuvo la concentración de ácido láctico hasta el segundo día, disminuyendo al tercero y cuarto. Si se compara la producción de ácido con el crecimiento, esta bacteria fue la que presentó el mayor crecimiento en carne, sin embargo, su producción de acidez fue muy baja, probablemente debido a que la producción de ácido se presenta en este microorganismo como metabolito secundario, asociado a la fase estacionaria. En un estudio realizado por Bellengier et al (1997b) sobre el cultivo mixto de *L. mesenteroides* con *Lactococcus lactis* se encontró que la acidificación se debió esencialmente a la acción de *L. lactis* CNRZ 1076. La tasa de acidificación en el cultivo mixto y en las cepas puras son similares, excepto cuando el porcentaje de *L. Lactis* fue inferior al 12% (Bellengier et al, 1997b). Esto demuestra la baja producción de acidez por *L. mesenteroides*. En carne de res, los valores iniciales de acidez fueron menores a los obtenidos en carne molida de cerdo. En todos los tratamientos la concentración de ácido láctico disminuyó conforme avanzó el tiempo de almacenamiento. Estos resultados se relacionan con el mínimo efecto en la inhibición de los grupos bacterianos indicadores.

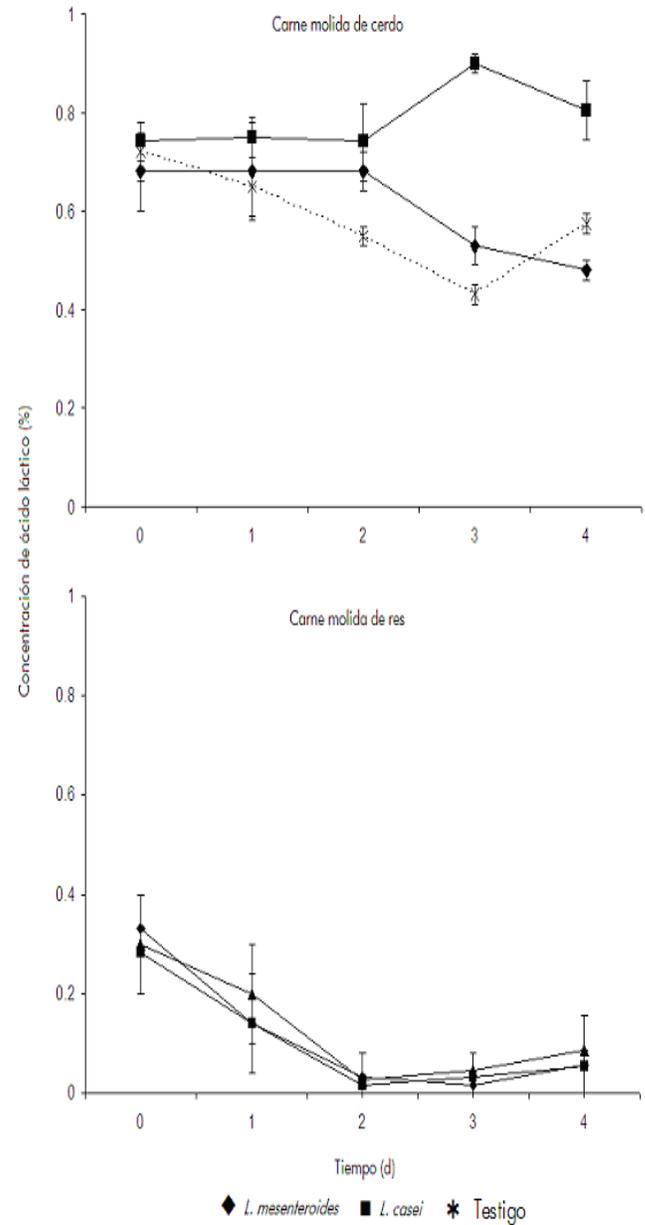


Figura 3. Porcentaje de acidez producido durante la fermentación en carne molida de cerdo y res.

### Conclusiones

La carne molida de cerdo fue el sustrato donde se obtuvo el mayor crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, mientras que en la carne de res se obtuvo mayor crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota. Sin embargo, con *L. casei* Shirota en carne de cerdo se obtuvo la mayor acidez. La adición de *L. casei* disminuyó la concentración bacteriana de coliformes y *Staphylococcus aureus* en carne molida de cerdo a los cuatro días en refrigeración, mientras que en carne de res, se obtuvo un efecto bacteriostático. El efecto inhibitor de *L. mesenteroides* en carne de cerdo fue a corto plazo. Las bacterias

lácticas son una opción para mejorar la calidad microbiológica de la carne molida mantenida en refrigeración.

## Referencias Bibliográficas

- Arihara K., Ota H., Itoh M., Kondo Y., Sameshima T., Yamanaka H., Akimoto M., Kanai S., y Miki T., 1998. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science*. 63(3):544-547.
- Bellengier P., Richard J. y Foucaud C., 1997a. Nutritional requirements of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and subsp. *dextranicum* for growth in milk. *Journal of Dairy Research*. 64(1):95-103.
- Bellengier P., Richard J. y Foucaud C., 1997b. Associative Growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* Strains in Milk. *Journal of Dairy Science*. 80(8):1520-1527.
- Bello G., 2000. *Ciencia Bromatológica. Principios generales de alimentos*. Díaz de Santos. Madrid. p. 123.
- Bello-Pérez J., Ortiz-Dillanes D., Pérez-Memije E. y Castro-Domínguez V., 1990. Salmonella en carnes crudas: un estudio en localidades del estado de Guerrero. *Salud Pública de México*. 32(1):74-79.
- Cliver, D., 1993. *Eating Safely: Avoiding Foodborne Illness*, ed. A. Golaine, American Council on Science and Health, New York. p 33.
- Consignado G., Peña A., y Jacalne A., 1993. In Vitro study on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei* (commercial Yakult drink) against four diarrhea-causing organisms. *Phil J Microbiol Infect Dis*. 22(2):50-55.
- Corona, A. y Jiménez R., 2004. Comparación de dos métodos de siembra para el recuento de microorganismos en muestras con alta concentración microbiana. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*. (40):3-7
- Elizalde P., Díaz E., Hernández L. y Jaramillo C., 2001. Identificación y tipificación de biotipos y serotipos de *Yersinia enterocolitica*. *Revista Saúde Pública*. 35(4):380-384.
- Farro D., Falcón N., Manchego A., Rivera H., 2002. Frecuencia de *Brucella* sp. en porcinos, procedentes de granjas tecnificadas y no tecnificadas, beneficiados en dos mataderos de Lima. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*. 13(2):72-77.
- Gallardo, J., Villamar L., Barrera M., 2006. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de porcino en México 2006. *Coordinación General de Ganadería, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. [En línea]: México <<http://www.oncvp.org/movilizacion/sitpor06d.pdf>> [Consulta: 30 de Octubre de 2008]
- González B., Jiménez Z., Heredia N., Villarreal L., García G. y Gómez M., 2006. Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. *Thyphimurium*. *Ciencia UANL*. 9(4):365-374.
- Guerrero I., Mendiola R., Ponce E. y Prado A. 1995. Inoculation of lactic acid bacteria on meat substrates as a means of decontamination. *Meat Science* 40:397-411.
- Ingraham J. e Ingraham C., 1998. *Introducción a la Microbiología*. Reverté. Barcelona, España. p. 328.
- Jiménez-Guzmán, J. y García-Garibay M., 2006. Propiedades nutracéuticas de las proteínas del suero de leche. *Carnilac Industrial*. Octubre-Noviembre:22-27.
- Jiménez-Vera R., García-Garibay M. y Corona-Cruz A., 2006. Propagation of fecal microflora for in Vitro study of human intestinal ecosystem. *Cuarto Simposio Internacional de Probióticos*. Ciudad de México. P16.
- Macedo R., Freitas R., Pandey A., Soccol C., 1999. Production and shelf-life studies of low cost beverage with soymilk, buffalo cheese whey and cow milk fermented by mixed cultures of *Lactobacillus casei* ssp. *shirota* and *Bi-fidobacterium adolescentis*. *Journal of Basic Microbiology*. 39(4):243-251.
- Martínez R. y Martinis E., Effect of *Leuconostoc mesenteroides* 11 bacteriocin in the multiplication control of *Listeria monocytogenes* 4b1. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 26(1):52-55.
- Montel M. y Talon R., 1993. Factors affecting growth and lipase production by meat *Lactobacilli* strains and *Brochotrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology* 64, 229-240.
- Noël H., Dominguez M., Weill F., Brisabois A., Duchazeaubeneix C., Kerouanton A., Delmas G., Pihier N. y Couturier E., 2006. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Manhattan infections associated with meat products, France, 2005. *Eurosurveillance*. 11(10-12):270-273.
- NOM-034-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de la carne. Carne molida y carne molida moldeada. Envasadas. Especificaciones sanitarias.
- NOM-194-SSA1-1994. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
- Ogden S., Taylor A., Guerrero I., Escalona H. y Gallardo F., 1995. Changes in odour, colour and texture during the storage of acid preserved meat. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28:521-527.
- Pérez D. y Andújar G., 2000. Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Rev Cubana Aliment Nutr*. 14(2):114-123
- Prandl O., Fischer A., Schmidhofer T. y Sinell Hans-Jurgen, 1994. *Tecnología e higiene de la Carne*. Editorial Acribia S.A. España. p 5.
- Price J. y Schweigert B., 1994. *Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos*. Acribia. Zaragoza,

España. pp 338-341.

Rosenblatt J. E. y Stewards P. R. 1975. Anaerobic bag culture method. *Journal of Clinical Microbiology*. 1(6):527:530.

Smulders F., Barendsen P., Van Logtestun J., Mossel D. y Van Der Marel, G., 1986. Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *Journal of Food Technology*. 21:419-436.

Stiles M., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70(2-4):331-345.

Varnam H. y Sutheland P., 1995. *Carne y Productos Carnicos*. Acribia S.A., España, pag. 1-9.

Vesterlund S., Karp M., Salminen S., y Ouwehand A., 2006. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology*. 152:1819-1826.

Woolthuis H., Mossel D., Van Logtestijn J. y Smulders F., 1984. Microbial decontamination of porcine liver with lactic acid and hot water. *Journal of Food Protection*. 47:221-226.

Yanes M., 1985. *Manual de Procedimientos Químicos Analíticos*. Ciencias Agropecuarias. Gobierno del estado de Tabasco, Secretaría de Educación, Cultura y Recreación, Dirección de Educación Superior e Investigación Científica, Centro de Investigaciones y Enseñanza en Ecosistemas Tropicales. Emiliano Zapata. p 23.

Zamudio M., Jiménez R. y García A., 2002. Evaluación de la calidad sanitaria microbiológica de productos pesqueros de importancia para el estado de Yucatán. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*. 37:17-21.

## EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA ENZIMA POLIFENOLOXIDASA DEL AGUACATE (*Persea americana* MILLER) VAR. HASS

E. Amaya-Paredes<sup>1</sup>, R. Tarkus-Patiño<sup>2</sup>, M. Domínguez-Magaña<sup>3</sup>

### RESUMEN

El consumo de aguacate se ha incrementado a nivel mundial, sin embargo el principal problema que presenta es el desarrollo de oscurecimiento durante su procesamiento y almacenamiento, fenómeno causado por enzimas como la polifenoloxidasa (PPO), que están presentes en el mismo fruto. Por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó el efecto de dos sustratos (4-metilcatecol (Catecol) y 3,4-dihidroxifenil L-alanina (DL-Dopa)), en la cinética de reacción en extractos de la enzima PPO presente en el aguacate Hass, con la finalidad de realizar una caracterización preliminar del extracto de PPO. Los valores de  $K_m$  fueron de 1.38 mM para el Catecol<sup>m</sup> y 78.03 mM para DL-dopa. Los valores de la  $V_m^{max}$  fueron 0.074 UE / ml\*min y 0.142 UE / ml\*min respectivamente. La enzima presentó una mayor afinidad por el sustrato Catecol ya que su valor de  $K_m$  fue menor, por lo que se utilizó éste sustrato para estudiar el efecto del pH y la temperatura sobre la cinética de reacción en los extractos de la PPO. Se hallaron dos valores de pH (5.5 y 7.0) a los cuales se manifestaron valores máximos en la velocidad de reacción. La mayor actividad enzimática se obtuvo a una temperatura de 20 °C.

**Palabras clave:** PPO, Cinética enzimática, Catecol.

### Introducción

El Aguacate (*Persea americana* Miller) es uno de los frutales nativos de mayor popularidad en la dieta alimenticia de los mexicanos, ya que se desarrolla en diferentes ambientes y esta disponible la mayor parte del año. Este fruto ha incrementado su consumo a nivel mundial, especialmente en países como Estados Unidos, Francia, Alemania y España, por este motivo su industrialización se torna como una alternativa cada vez más importante (Bower y Cutting, 1998)

La elaboración de productos industriales que incluyen productos del aguacate como guacamole, pasta, porciones congeladas y aceite crudo, que equivalen a unas 150,000 ton de aguacate fresco se estima en 75 mil toneladas, con un valor aproximado de 73.7 millones de US dólares. Las exportaciones se incrementaron en un 440 % entre 1990 a 2002 (de 17,427 a 94,243 ton). El consumo aparente nacional alcanzó las 80,6832 toneladas en 2002 (Sánchez, 2004).

La problemática primordial en la industrialización del aguacate es el deterioro que se manifiesta en un rápido oscurecimiento durante el procesamiento y almacenamiento, fenómeno de oxidación bioquímica catalizada por enzimas específicas (fenolasas o polifenoloxidasas) que están presentes en la misma pulpa (Corrales, 1991).

Las polifenoloxidasas (PPOs) (EC 1.14.18.1 o EC 1.10.3.2) son enzimas endógenas en plantas que catalizan reacciones dependientes de oxígeno que transforman los o-difenoles en o-quinonas. Estas quinonas son especies muy reactivas y se pueden polimerizar con otros compuestos o consigo mismas siendo capaces además, de modificar covalentemente un amplio intervalo de especies nucleófilas del interior de las células que conduce a la formación de polímeros de coloración negra y/o oscuros (marrón, azul, etc) de alto peso molecular (melaninas o melanoidinas), siendo éstos los responsables de importantes pérdidas económicas en el mercado de frutas y vegetales (Gacche et al, 2003; Richard-Forget et al, 1998, Lee et al, 1990).

Aunado a lo anterior, se ha comprobado también que la desorganización de la integridad de las células sucede de forma natural durante procesos de senescencia, pero también como consecuencia de daños mecánicos, que pueden originar rupturas celulares, exponiendo la PPO con algunos componentes fenólicos, generando reacciones de pardeamiento enzimático propias de frutos maduros, tejidos dañados y/o procesados y también en tejidos afectados por fisiopatías (Martínez y Whitaker, 1995).

Esta es la razón fundamental por la que el contenido en fenoles y la actividad de la PPO se consideran determinantes en la calidad de frutos y vegetales (Lee et al, 1990). Las reacciones de deterioro catalizadas por PPOs pueden ser inhibidas utilizando antioxidantes sintéticos y altas temperaturas; sin embargo, se ha demostrado que el empleo de altas temperaturas durante el procesamiento de vegetales y frutos afecta la calidad final del producto (Arturo et al, 1990).

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería Química-Uady, <sup>2</sup>Cinvestav, Unidad Merida, <sup>3</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. Autor al quien debe dirigirse la correspondencia. e-mail: amaya\_1618@hotmail.com

La presencia de PPO se ha podido determinar y caracterizar utilizando hojas y frutos de numerosas especies vegetales como fuente enzimática. Los niveles de PPO varían dependiendo de la especie, estado de maduración y estado fenológico (Soliva y Belloso, 2003). En tejidos vegetales intactos las PPO y sus sustratos fenólicos permanecen en compartimientos separados, cloroplastos y vacuolas respectivamente, por lo que no tiene lugar reacción alguna en dichos compartimientos (Bower y Cutting, 1998).

Para poder identificar la cinética de reacción de la PPO presente en el fruto del aguacate Hass es necesario determinar sus características físicas, químicas y bioquímicas ya que, dichas características se verán afectadas dependiendo de la fuente de donde es extraída la PPO. En el presente estudio de investigación se establecieron las condiciones de mayor velocidad de reacción de la PPO presente en el fruto de aguacate, para evaluar, en un estudio posterior, la efectividad de su inhibidor natural en comparación con los ya empleados en la industria como son el bisulfito de sodio, el ácido ascórbico, ácido isoascórbico y ácido cítrico.

## Materiales y Métodos

Las muestras de aguacate Hass utilizadas en este estudio, en estado maduro, se obtuvieron del mercado local y se mantuvieron en refrigeración a 15 °C durante 24 horas antes de obtener el extracto acuoso de la PPO. Los sustratos estudiados (Catecol y DL-Dopa) fueron adquiridos de Sigma.

**Extracción enzimática:** El procedimiento de extracción para obtener el extracto enzimático se realizó a 4°C. A los frutos de aguacate se les retiró la cáscara, después fueron cortados y homogeneizados con una licuadora (Osterizer). Posteriormente se pesó 20g de muestra en una balanza analítica (OHAUS AR2140) y se mezcló con 100 ml de regulador de fluoruro de sodio 0.1 M (0.1M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.1M de NaF, pH=7), esta mezcla fue licuada durante aproximadamente 1 min., y se centrifugó a 4500 rpm, 4 °C durante 10min en una centrifuga Beckman GS-15R. El precipitado resultante se filtró a través de un algodón estéril y posteriormente se efectuó una segunda filtración con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  (millipore) para eliminar la turbidez del extracto.

**Estudio cinético:** La actividad enzimática en la PPO se determinó mediante espectrofotometría, analizando el efecto de dos sustratos sobre la PPO en dicha reacción, seleccionando aquel con mayor afinidad para continuar con las demás pruebas cinéticas (efecto de pH y temperatura). Se realizaron lecturas a 410 nm para el Catecol y a 475 nm para el DL-Dopa, en intervalos de 15 segundos durante 10 minutos en un espectrofotómetro (Genesys 10)

El blanco se preparó con 2.5 ml del regulador antes mencionado y 0.5 ml de extracto enzimático. La actividad enzimática se calculó de la porción lineal de la curva. La unidad de actividad de la PPO fue definida como la cantidad de enzima necesaria para generar un incremento en la absorbancia de 0.001 de densidad óptica por minuto (DO/min.)

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), se determinaron usando los dos sustratos estudiados (Catecol y DL-Dopa) a diferentes concentraciones; la reacción se midió a la longitud de onda antes mencionadas. Los datos fueron analizados de acuerdo al método de Lineweaver y Burk (Mathews *et al*, 2002).

**Evaluación del sustrato:** Se comparó la actividad enzimática de la PPO utilizando los sustratos mencionados, los ensayos se realizaron de la siguiente manera:

Se prepararon tubos para el ensayo a partir de una solución de Catecol de 33 mM (33 mM Catecol, 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7), con las soluciones y cantidades que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 1.- Condiciones para el estudio de la actividad de la PPO a 25 °C y pH 7.0, empleando Catecol como sustrato.

Tubo	Buffer fosfato de sodio 0.2M (ml)	Catecol (ml)	Concentración Catecol (mg/ml)	Extracto enzimático (ml)
Blanco	2.5	0	0	0.5
1	1.2	1.3	4.29	0.5
2	1	1.5	4.95	0.5
3	0.9	1.6	5.28	0.5
4	0.7	1.8	5.94	0.5
5	0.6	1.9	6.27	0.5
6	0.4	2.1	6.93	0.5
7	0.2	2.3	7.59	0.5
8	0	2.5	8.25	0.5

Se preparó el espectrofotómetro a 410 nm y se blanqueó con la solución mencionada en la tabla. Se inició la reacción adicionando el extracto enzimático al tubo que contenía el regulador de fosfato de sodio y el Catecol, se mezcló y se realizó la lectura inmediatamente a intervalos de 15 segundos durante 10 minutos para cada tubo.

Para evaluar la cinética de reacción empleando DL-Dopa como sustrato se realizó lo siguiente: Se prepararon tubos para el ensayo a partir de una solución de DL-Dopa de 30 mM (30 mM DL-Dopa, 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1N HCL, 1.0 N KOH, pH= 7), con las soluciones y cantidades que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 2.- Condiciones para el estudio de la actividad de la PPO a 25 °C y pH 7, empleando DL-Dopa como sustrato.

Tubo	Buffer fosfato de sodio 0.2M (mL)	DL-Dopa (ml)	Concentración DL-Dopa (mg/ml)	Extracto enzimático (mL)
Blanco	2.5	0	0	0.5
1	1.8	0.7	8	0.5
2	1.5	1.0	12	0.5
3	1.3	1.3	15	0.5
4	1.1	1.4	17	0.5
5	1.0	1.5	18	0.5
6	0.9	1.6	19	0.5
7	0.8	1.7	20	0.5
8	0	2.5	30	0.5

Se preparó el espectrofotómetro a 475 nm y se blanqueó con la solución mencionada en la tabla 2. Se inició la reacción adicionando el extracto enzimático al tubo que contenía el buffer de fosfato de sodio y el DL-Dopa, se mezcló y se realizó la lectura inmediatamente a intervalos de 15 segundos durante 10 minutos para cada tubo.

**Efecto del pH:** La actividad de la enzima se determinó en una escala de pH entre 5.0-8.0 con intervalos de 0.5, utilizando regulador de fosfato de sodio 0.2 M, ajustando con soluciones de fosfato de sodio monobásico 0.2 M y fosfato de sodio dibásico 0.2 M. El ensayo se realizó utilizando Catecol como sustrato.

**Efecto de la temperatura:** Para conocer el efecto de la temperatura sobre la actividad de la PPO se evaluó la cinética de reacción entre 3 °C y 85 °C, con intervalos de 5 °C. Para esto se incubó la reacción enzimática (a las condiciones de concentración de sustrato y pH de mayor actividad específica) en un tubo de ensayo durante 5 minutos, utilizando una incubadora refrigerada (Lab-Line PW-15V) y un termoblock (Fisher 25H). Transcurrido el tiempo de incubación se tomó la lectura

espectrofotométrica.

**Análisis estadístico:** Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados se presentan como media. Para cada concentración de sustrato, el efecto en la actividad enzimática se evaluó con un análisis de varianza de una vía, y las diferencias entre tratamientos se analizaron a través de comparativo de medias, de acuerdo de Montgomery (1991). Los análisis se realizaron con el paquete estadístico stathgraphics versión 5.0 plus.

## Resultados y Discusión

### Estudio cinético:

La reacción enzimática de la PPO del fruto de aguacate Hass se evaluó en función del tiempo. Las absorbancias del extracto enzimático se relacionaron con la concentración del sustrato y se determinó el valor de la velocidad de reacción en cada intervalo de tiempo y concentración, con tendencia creciente hasta alcanzar el equilibrio. Las gráficas de las figuras 1 y 2, muestran la cinética enzimática descrita por Michaelis-Menten para cada sustrato evaluado respectivamente; aunque la ecuación que más se emplea en cinética enzimática relaciona la concentración del sustrato a tiempo constante, en esta investigación se estudió el incremento de la absorbancia en la reacción enzimática en función del tiempo, a una concentración de sustrato constante. Se puede observar que las cinéticas fueron diferentes entre ambos sustratos y entre las concentraciones estudiadas. Para el catecol como sustrato, se pudo apreciar que a partir de la concentración 4.95 mg/ml hubieron cambios significativos en el perfil cinético, es decir, en concentraciones inferiores a este valor, la cinética fue la misma. Con valores superiores a 4.95 mg/ml de concentración los valores de absorbancias se incrementaron de forma significativa, hallándose la mejor actividad enzimática a la concentración de 8.25 mg/ml.

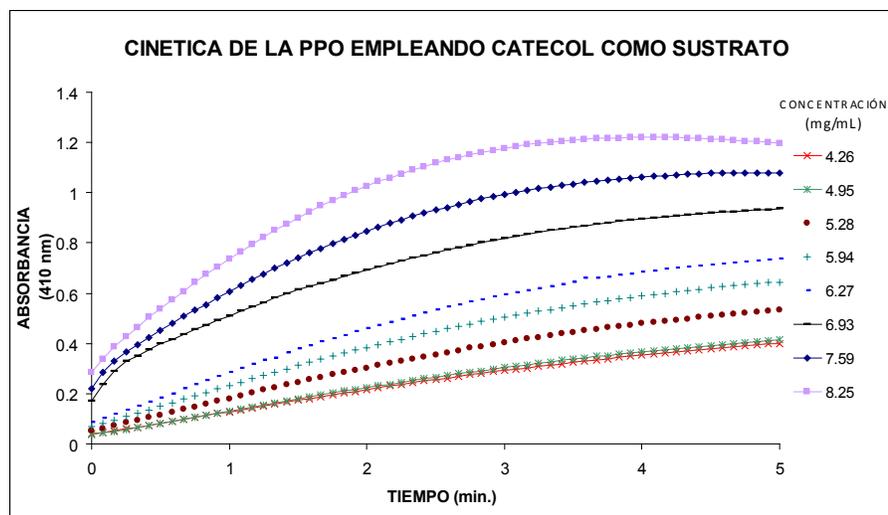


Figura 1.- Cinética enzimática de la PPO presente en el fruto del aguacate Hass, a diferentes concentraciones del sustrato Catecol.

En la figura 2 se representa la cinética al emplear el segundo sustrato (DL-Dopa), en la cual no se observaron cambios significativos en la reacción con las diferentes concentraciones analizadas; incluso los valores de absorbancia fueron menores que las obtenidas con catecol, a pesar de que se empleó una mayor concentración de sustrato.

Los valores de  $K_m$  a partir de la grafica Lineweaver-Burk (Figura 3), fueron de 1.38 mM para el Catecol y 78.03 mM para DL-dopa, con diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), lo cual indicó una mejor afinidad del extracto enzimático de PPO con el catecol. Los valores de la  $V_{max}$  fueron 0.074 UE / ml\*min y 0.142

UE / ml\*min respectivamente, empleando la concentración de 8.25 mg/ml para el Catecol y de 30mg/ml para el DL-Dopa.

Los valores de  $K_m$  hallados en este estudio fueron muy similares a los obtenidos en cinéticas de PPO en manzana (0.263 mM)(Gacche *et al*,2003) y en tomate(1.64mM)(Casado,2004) y esta variación pudo deberse a la fuente de donde se extrae la enzima (Park y Luh, 1985). Por todo lo anterior, en la evaluación del efecto del pH y la temperatura, únicamente se empleó Catecol como sustrato.

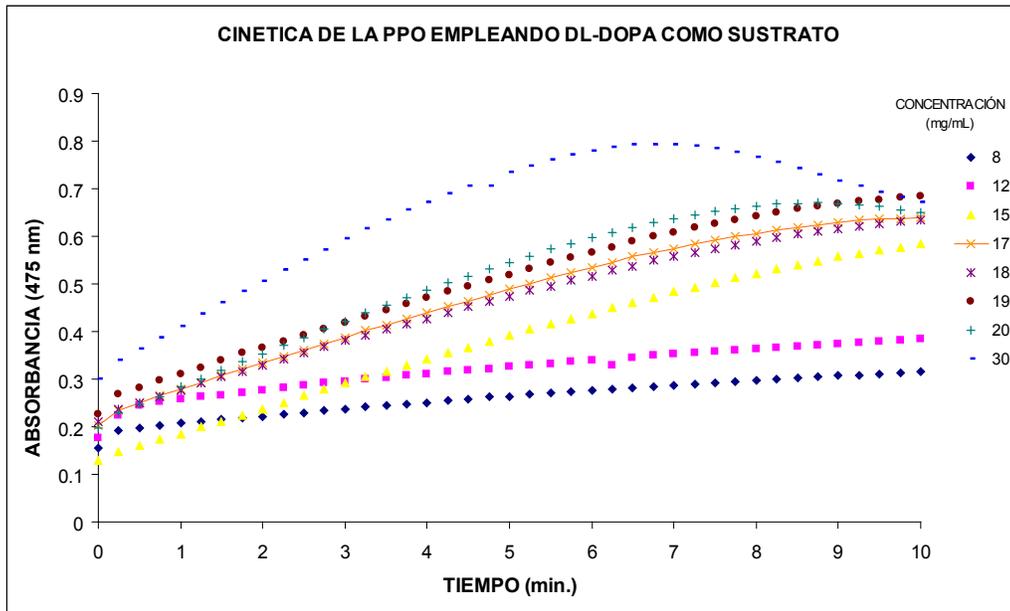


Figura 2.- Cinética enzimática de la PPO presente en el fruto del aguacate Hass, a diferentes concentraciones del sustrato DL-Dopa.

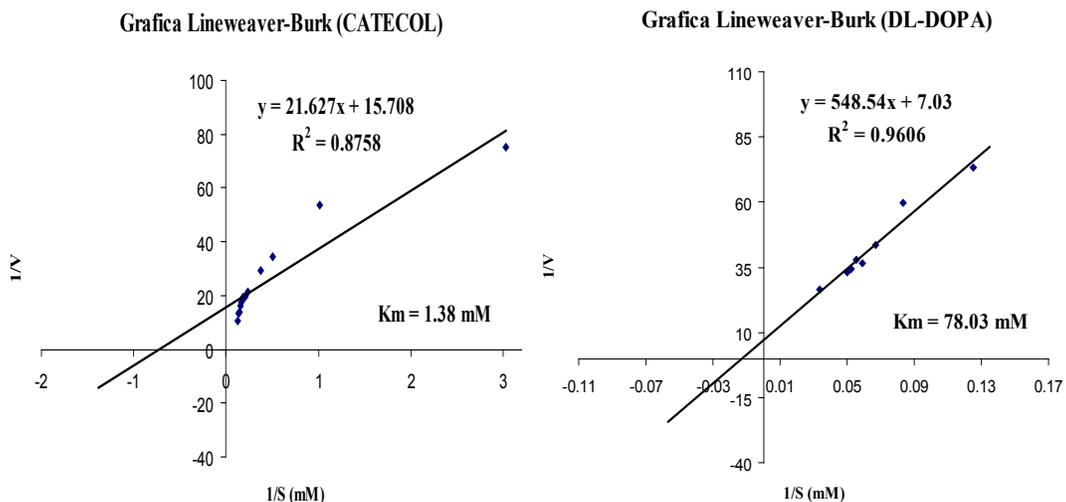


Figura 3.- Gráficas Lineweaver-Burk de la enzima PPO presente en el fruto del aguacate Hass, para los sustratos Catecol y DL-Dopa, con valores respectivos de  $K_m$  1.38 mM y 78.08 mM.

### Efecto del pH:

La influencia del pH sobre la velocidad de reacción en la cinética de la PPO permitió la identificación de dos picos: el primero a pH 5.5 y el segundo a pH 7.0; se ha demostrado que existen 2 tipos de PPOs dependiendo de su pH de mayor actividad específica, el primer tipo son PPOs ácidas con pH óptimo entorno a 4.5 unidades como las descritas en fresa (4.2) (Wesche y Montgomery, 1990) y en tomate (4.6) (Casado, 2004) y un segundo grupo con pH óptimo ligeramente superior a 7 como los reportados en peras (7.0) y alcachofas (7.8) (Zhon y Feng, 1991; Aydemir *et al.*, 2003). En general, la mayoría de los frutos muestran una actividad máxima a valores cercanos a pH neutro (Mathews *et al.*, 2002), pero para el caso de la PPO del aguacate, la actividad enzimática se presenta tanto a pH ácido, como a pH neutro. Sin embargo, se hallaron igual dos picos de pH (6.5 y 7.5) en

*Allium sp.*, que es una variedad de hojas muy usado en la manufactura de un queso típico en Turquía para desarrollar olores característicos del producto final., (Arslan *et al.*, 1997).

La presencia de ambos picos de pH hallados en el fruto de aguacate Hass hace suponer la existencia de los dos tipos de PPOs mencionados con anterioridad, lo cual representa un mayor riesgo de deterioro del fruto; esta podría ser la razón primordial en la dificultad de elaborar y preservar productos derivados de aguacate ya que, como es sabido, los antioxidantes sintéticos (sulfitos y nitritos) solamente actúan a intervalos de pH específicos, normalmente a pH inferiores a 6.0, por lo que la capacidad de inhibición enzimática de los mismos, se ve reducida o inactivada en el segundo pico de pH hallado en este experimento (pH=7.0).

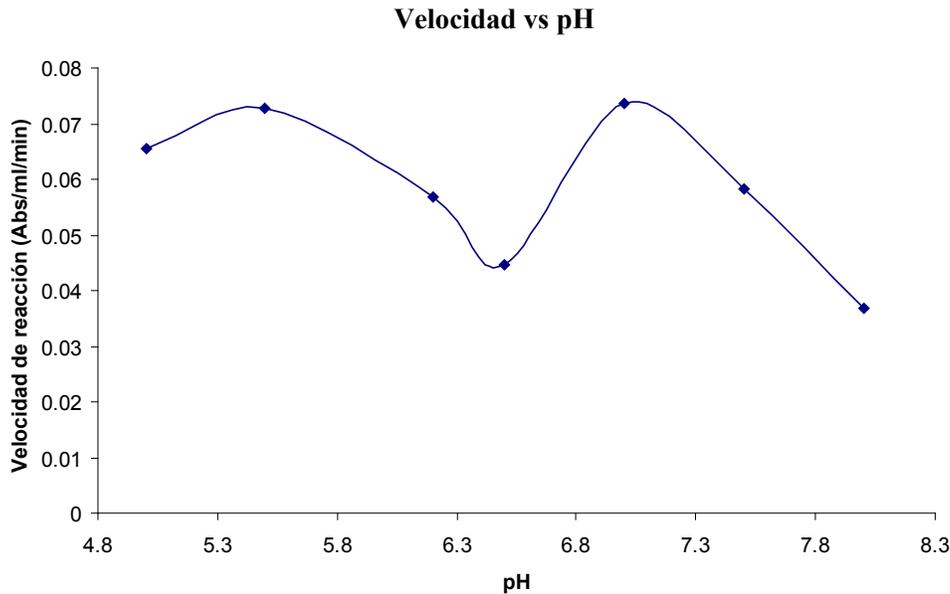


Figura 4.- Efecto del pH en la velocidad de reacción de la PPO, utilizando catecol como sustrato

### Efecto de la temperatura:

La figura 5 muestra el perfil de velocidades de la actividad enzimática de la PPO a diferentes temperaturas, en la que fue notoria dicha actividad aún a temperaturas cercanas a 0°C; la máxima velocidad de acción en la PPO se halló a 20°C; a temperaturas mayores se observó un descenso paulatino en esta actividad enzimática. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados en pera (22 °C) (Zhon y Feng, 1991), pero difieren con los estudios realizados en uva (45°C) (Cash *et al.*, 1997) y melocotón (37°C) (Brandelli y Lopes, 2005), en muchos casos la estabilidad térmica de las enzimas está relacionada con la madurez de los frutos

y en ocasiones también es dependiente del pH (Zhon y Feng, 1991)

Estos resultados demostraron que el fruto de aguacate Hass es muy susceptible a reacciones de oscurecimiento y deterioro, debido al tipo y naturaleza de sus PPOs endógenas, representando un reto para su procesamiento y conservación. Vale la pena señalar, a manera de recomendación, seguir caracterizando al extracto de PPO de este fruto con estudios simultáneos de temperatura y pH para ver el comportamiento enzimático.

### Velocidad vs Temperatura

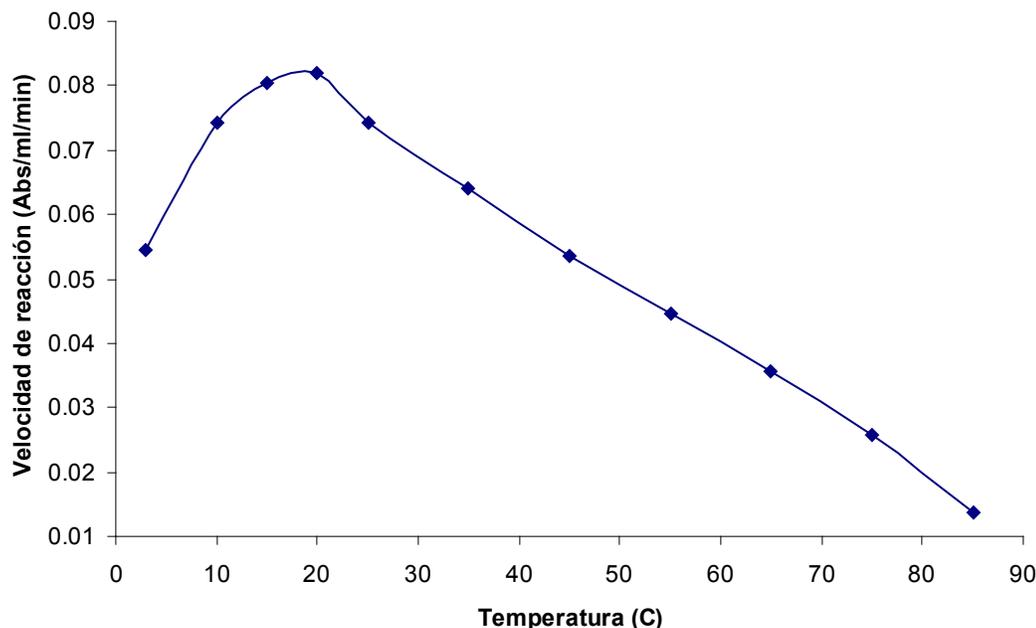


Figura 5.- Perfil de temperatura de la actividad de la PPO, empelando catecol como sustrato.

### Conclusiones

La PPO extraída de aguacate Hass presentó una mayor afinidad por el catecol en comparación con el DL-dopa, ya que su valor de  $K_m$  fue menor. Las concentraciones de saturación para el Catecol y DL-Dopa, fueron de 8.25 mg/ml y 30 mg/ml, respectivamente. La PPO presentó actividad específica a dos valores de pH (5.5 y 7) y a una temperatura de 20 °C empleando catecol como sustrato.

### Agradecimientos

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida, por el apoyo proporcionado durante la realización de este trabajo, así como a la Facultad de Ingeniería química de la Universidad Autónoma de Yucatán.

### Referencias Bibliográficas

Arturo, H., Janovitz-Klapp, Florence, C., Richard, Pascale M. Goupy, y Jacques J. Nicolas.(1990). Inhibition Studies on Apple Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(21):926-931.

Arslan, O., Temur, A., y Tozlu, I. (1997). Polyphenol Oxidase from *Allium* sp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(8):2861-2863.

Brandelli A. y Lopes C. (2005). Polyphenoloxidase Activity, Browning Potential And Phenolic Content Of

Peaches During Postharvest Ripening. *Journal of Food Biochemistry*. 29(16):624–637.

Bower, J. P. and J. G. Cutting. (1988). Avocado fruit development and ripening physiology. In: J. Janick (ed.). *Horticultural Reviews*. 10(4):229-271.

Casado J.(2004). Purificación Y Caracterización Cinética De Polifenoloxidasas De Tomate. *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica de Colombia*. 13(2):13-19

Cash, H.T., Sistrunk, W.A., and Stutte, C.A. (1997). Characteristics of Concord Grape polyphenoloxidase involved in juice color loss. *J. Food Sci.* 41(26): 1398-1426

Corrales, G. J. (1991). Experiencias y problemática de la industrialización del aguacate. *Memorias del Seminario Internacional del Aguacate. Poscosecha y Comercialización*. México. pp 64-71.

Florence, C., Richard-Forget, Marie-Aude Rouet-Mayer, Pascale, M. G., Philippon, J., y Jacques J. N. (1998). Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:2114-2122.

Gacche, R. N, Zore, G. B. and Ghole, V. S. (2003). Kinetics of Inhibition of Polyphenol Oxidase Mediated Browning in Apple Juice by  $\beta$ -Cyclodextrin y L-Ascorbate-2-triphosphate. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 18(1):1–5.

Lee, C.Y., Kagan, V., Jaworski, A.W. and Brown,

S.K. (1990). Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 38, 99–101.

Martínez, M. V. y Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology.* 6:195-200.

Mathews, C. K., van Holden, K. E. y Ahern, K.G. (2002). *Bioquímica*. 1a. edición. Pearson Educación, S. A., Madrid. pp 420-429

Montgomery, C. D. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica. México pp. 101-115.

Oktay, M., Küfreviölu, I., Kocaçalışkan, I. y Şakırolu, H. (1997). Polyphenoloxidase From Amasya Apple. *Journal of Food Science.* 60(15):495-499.

Park, E. y., Luh, B. S. (1985). Polyphenoloxidase of kiwifruit. *Journal of Food Science.* 50:679-684.

Richard-Forget, F., Cerny, M., Fayard, N., Saunier, T. y Varoquax, P. (1998) Isolation and characterization of o-quinone-trapping substance from a crude carica papaya protein preparation. *International journal of food science and technology.* 33:285-296.

Sánchez R. G. (2004). *Tendencias de la Cadena de Valor del Aguacate en Michoacán*. Memorias del seminario internacional del aguacate. Michoacán, México. pp. 55-62.

Soliva-Fortuny, R. C. y Martín-Belloso, O.(2003). New advances in extending the shelf life of fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology.* 14:341-353.

Tülin Aydemir, Demet Kavrayan y Seda Cinar. (2003). Isolation and Characterisation of Polyphenoloxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Journal of Food Science.* 43:115-125.

Wesche-Ebeling P. y Montgomery M. (1990). Strawberry Polyphenoloxidase: Extraction and Partial Characterization. *Journal of Food Science,* 55:1320-1351

Zhon H.; Feng X. (1991). Polyphenoloxidase from Yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *Journal of Food Science.* 57:307-313.

# CADUCIDAD DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS: IMPLICACIONES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS.

*J. Ruiz-Ruiz, M. Segura-Campos, L. Chel-Guerrero, D. Betancur-Ancona*

## Introducción.

La caducidad se define como el período de tiempo, después del envasado o elaboración y cumpliendo determinadas condiciones de almacenamiento, en el que un alimento sigue siendo seguro y apropiado para su consumo. En otras palabras, durante ese tiempo el alimento debe conservar sus características sensoriales, químicas, físicas, funcionales o microbiológicas y en caso necesario cumplir con la información nutricional indicada en la etiqueta cuando se almacena correctamente. Cada alimento tiene una caducidad microbiológica, una química y una sensorial, en condiciones ideales de almacenamiento; las cuales influyen de manera significativa en su calidad (IFST, 1993). La caducidad y la seguridad alimentaria están estrechamente relacionadas, de esta forma al establecer la caducidad de un alimento hay que garantizar su seguridad. Por lo regular los factores que controlan la seguridad y el deterioro de los alimentos, sobre todo los relacionados con el crecimiento microbiano son idénticos. Actualmente la manera más eficaz de garantizar la seguridad de un alimento es el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP). En la figura 1 se presentan los principios básicos para el establecimiento de un sistema HACCP (IFST, 1999).

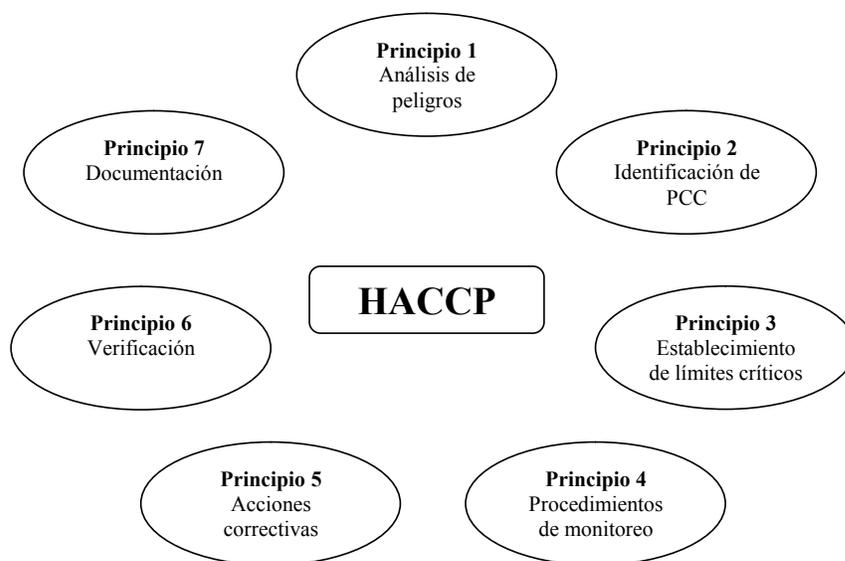


Figura 1. Principios para el establecimiento de un sistema de HACCP.

## Caducidad de productos alimenticios

La responsabilidad del establecimiento de la caducidad recae en el productor o elaborador; en este aspecto la evaluación y análisis de la caducidad están integrados en el proceso de desarrollo de cada alimento por ello los principios de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) son una herramienta útil que permite evaluar la caducidad (Blanchfield, 1998). Todo alimento que pueda ser distribuido a un consumidor final debe marcarse o etiquetarse indicando cuál es su apropiada caducidad (FSA, 2000).

- Los alimentos muy perecederos desde el punto de vista microbiológico, que se deterioran rápidamente, deben etiquetarse con la leyenda “consúmase antes del”.
- Para el resto de los alimentos, la caducidad se indicará usando la expresión “consúmase preferentemente antes de”.

Las etiquetas también deben complementarse con indicaciones acerca de la conservación del alimento tales como “mantener en refrigeración” o “mantener en un lugar fresco y seco”.

En cualquier caso, corresponde al productor o elaborador establecer en que categoría debe incluir sus productos. Como norma general la fecha se debe indicar en la secuencia “día, mes y año”. Para la categoría “consúmase preferentemente antes de” se permiten las siguientes opciones (Mrohs, 2000):

- Los alimentos que no se puedan conservar más de tres meses “consúmase preferentemente antes de” seguido del día y mes.
- Los alimentos que se puedan conservar más de tres meses “consúmase preferentemente antes de” seguido del mes y año.
- Los alimentos que no se puedan conservar más de 18 meses “consúmase preferentemente antes de” seguido del mes y año o sólo del año.

### Determinación rápida de la caducidad de productos alimenticios

La determinación rápida de la caducidad (Accelerated shelf life determination, ASLD) se utiliza para disminuir el tiempo necesario para estimar la caducidad que de otro modo sería excesivamente largo; esto resulta aun más relevante cuando un alimento se desarrolla para tener una caducidad larga (meses o años). Se conocen bien los efectos que causa el aumento de la temperatura en muchas reacciones químicas junto con los cambios negativos que tienen lugar durante el almacenamiento. Por lo tanto, la manera más común de realizar la determinación rápida de la caducidad consiste en almacenar el producto a temperaturas elevadas (Man, 2002). Un producto que quiera tener éxito comercial debe tener una caducidad aceptable y consistente, en cierto modo el hecho de conseguir esa caducidad es un reflejo de la calidad y seguridad del alimento. El establecimiento de la calidad

requiere recursos significativos (IFST, 1999):

- Personal altamente capacitado y con experiencia.
- Herramientas e instalaciones adecuadas.
- Un sistema de gestión de calidad que garantice que cada estudio de caducidad realizado se efectúe de manera sistemática y programada.

### ¿Cómo garantizar que la caducidad de los productos es correcta y reproducible?

La caducidad de los alimentos raramente se determina y confirma con una sola prueba, como norma general cuantas más pruebas se realicen más precisa será la caducidad asignada. Por lo menos hay cuatro tipos de pruebas de caducidad (IFST, 1993):

- Estudio de caducidad inicial.
- Estudio de caducidad preliminar.
- Estudio de confirmación de la caducidad.
- Estudio rutinario de caducidad.

Sin embargo, una determinación de caducidad de muestras elaboradas a nivel laboratorio, por personal altamente calificado y utilizando ingredientes de alta calidad; difícilmente será un reflejo de lo que ocurre en condiciones normales de producción. Por tal motivo, los siguientes factores deben ser tomados en cuenta cuando se interpreten los datos generados en las diferentes pruebas de caducidad realizadas (IFST, 1993):

- Las cantidades utilizadas en las pruebas y en la producción normal, así como su variación de calidad.
- La frescura de los materiales utilizados en las pruebas y en la producción normal.
- Las variaciones en pesado de ingredientes en plena producción.
- La influencia del volumen de producción
- La elaboración por lotes en comparación con la elaboración continua.

Por lo tanto, siempre es aconsejable basar la caducidad definitiva de un producto en los datos obtenidos que hagan referencia al “peor caso” posible en la elaboración y almacenamiento y añadir un margen de seguridad. Para que una caducidad sea aceptable por los consumidores y el productor deben aplicarse los principios de las buenas prácticas de fabricación; cuando estas se implementan completa y eficazmente garantizarán la elaboración consistente de productos seguros que cumplan las especificaciones de calidad previamente establecidas para su uso esperado (Blanchfield, 1998).

### Pruebas de almacenamiento para establecer la caducidad.

La manera más habitual y directa de establecer la caducidad de un producto es realizar pruebas de almacenamiento en condiciones similares a las que probablemente tengan lugar durante el almacenamiento, distribución, exposición para la venta y uso por el consumidor. Para alimentos de caducidad larga se emplean técnicas como el ASLD (Man, 2002). Las características

del almacenamiento pueden ser fijas o variables, en condiciones ideales para cada grupo de características del almacenamiento deben estar disponibles las siguientes variaciones:

- Condiciones óptimas.
- Condiciones medias o típicas.
- Peores condiciones posibles.

Las pruebas de caducidad suelen ser específicas para cada producto y pueden incluir alguno o todos los elementos siguientes:

- Análisis microbiológicos
- Análisis químicos
- Análisis físicos
- Evaluación sensorial.

### Mecanismos de deterioro de los alimentos

El conocimiento y comprensión de los mecanismos implicados en el deterioro de un alimento, permite al que ha desarrollado el producto, al encargado de calidad, al comercializador y al consumidor; identificar los factores que tienen una mayor influencia en la misma. A pesar de que no es posible evitar completamente el deterioro de un producto se pueden encontrar soluciones

para retrasar o minimizar su impacto, de manera que el producto tenga un período de caducidad aceptable comercialmente (Man, 2002). Entre los mecanismos por los que se deterioran los alimentos, destacan:

### Transferencia de humedad.

En muchos alimentos el agua es uno de los componentes más importantes. El agua no sólo es un medio para reacciones químicas y bioquímicas, sino que también participa en algunas de ellas. Desde el punto de vista microbiológico, el agua es uno de los factores más críticos. De igual importancia es el hecho de que el agua afecta las propiedades sensoriales de los alimentos, por ello muchos alimentos tienen la capacidad de aumentar o disminuir su contenido de humedad, dependiendo del sentido en el que se realice la transferencia, en el cuadro 1 se presentan cambios de calidad de algunos productos debidos a este proceso de deterioro. La transferencia de humedad ocurre entre los elementos adyacentes al producto durante el almacenamiento en la medida en la que exista un gradiente de humedad; la magnitud de ese gradiente influirá en el ritmo de transferencia (Man, 2002).

Cuadro 1. Ejemplos de cambios en la calidad de algunos alimentos debidos a transferencia de humedad.

Producto	Cambio en la calidad	Mecanismo de deterioro
Vegetales frescos	Marchitado	Pérdida de humedad
Frutas frescas	Aspecto seco y poco atractivo	Pérdida de humedad
Ensaladas listas para comer	Pérdida de textura y brillo	Pérdida de humedad
Galletas	Reblandecimiento, pérdida de textura	Ganancia de humedad
Cereales para desayuno	Pérdida de textura, dejar de ser crujientes	Ganancia de humedad
Aperitivos envasados	Pérdida de textura	Ganancia de humedad
Bebidas en polvo	Apelmazamiento	Ganancia de humedad
Cárnicos	Quemaduras por frío	Pérdida de humedad

Fuente: Man, 2002.

### Transferencia física de sustancias diferentes a la humedad.

La transferencia desde o al alimento de sustancias diferentes a la humedad que afecten a la seguridad y/o calidad del producto tendrán un efecto en su caducidad. A continuación se indican algunos ejemplos de cambios en la calidad debidos a este mecanismo de deterioro.

- Cambios en la calidad debidos a transferencia desde el producto:
  1. La pérdida de dióxido de carbono de las bebidas refrescantes carbonatadas envasadas en botellas de polietileno, causa la pérdida de una de sus características sensoriales. Hasta un 60% del contenido inicial de dióxido de carbono se puede perder en las botellas por mal almacenamiento (Matthews, 1995).
  2. Adsorción de los aromas por parte del material de envasado de los jugos de naranja enbotellados en po-

litileno, lo que disminuye la intensidad del aroma a cítricos de la bebida (Nielsen y Jagerstad, 1994).

- Cambios en la calidad debidos a transferencias al producto:
  3. Desarrollo de aromas extraños o desagradables que el alimento adquiere del material de envasado o del ambiente. Entre los alimentos susceptibles a este mecanismo se encuentran los derivados del chocolate, ya que su alto contenido en grasa favorece la absorción de aromas (Man, 2002).

### Cambios químicos y bioquímicos.

Los alimentos están compuestos por productos químicos y la mayoría de las materias primas utilizadas en la elaboración de productos alimenticios son de origen biológico. Por tal motivo es inevitable que ocurran ciertos cambios químicos y bioquímicos, los cambios más importantes son la oxidación, hidrólisis, pardeamiento

no enzimático, pardeamiento enzimático y las interacciones entre el alimento y su envase.

- **Oxidación de grasas y aceites.** La oxidación de grasas y aceites provoca el desarrollo de olores y aromas no deseables (rancio) en los alimentos y debido a ello el rechazo o menor aceptación por parte del consumidor. Puede tener lugar mediante dos mecanismos: el mecanismo que implica radicales libres y precisa de un catalizador y el mecanismo de fotooxidación (Hamilton, 1994).
- **Oxidación de los pigmentos alimentarios.** Todos los pigmentos alimentarios son inestables, a pesar de que la pérdida o cambio de color natural de un alimento no significa, necesariamente que su valor nutritivo se vea reducido, las variaciones en el color hacen que el alimento sea más o menos aceptable. La pérdida de color de los cárnicos, a menudo, se toma como indicador de la caducidad y frescura del producto (Sanders, 1994).
- **Oxidación de las vitaminas.** Las vitaminas son uno de los pocos componentes de los alimentos en los que es posible demostrar cuantitativamente una reducción del contenido de las mismas durante un período de tiempo. Son un grupo heterogéneo de sustancias sin estructura común presentando diversos mecanismos de destrucción; destacan por su sensibilidad al oxígeno las vitaminas C, B<sub>1</sub>, A y E (Berry-Ottaway, 1993).
- **Hidrólisis de grasas y aceites.** La hidrólisis de los triglicéridos (grasas y aceites) en presencia de humedad y una enzima, libera ácidos grasos de cadena corta que tienen olores desagradables (rancidez). La enzima habitualmente implicada es una lipasa o esterasa libre. La rancidez hidrolítica afecta principalmente a productos que tengan aceites como el de palma y coco. Las lipasas también se encuentran en cereales y productos de molienda como el trigo integral, salvado de trigo, arroz integral y avena (Man, 2002).
- **Pardeamiento no enzimático.** Uno de los mecanismos de este tipo más conocidos es la reacción de Maillard, la cual implica la reacción de un aldehído (azúcar reductor) y una amina (proteína o aminoácido). La intensidad de la reacción aumenta con la temperatura, el tiempo del tratamiento térmico y las aminas y grupos aldehídos libres. Esta reacción se caracteriza por el pardeamiento y la disminución del valor nutritivo del alimento, especialmente por pérdidas de lisina que es un aminoácido esencial (Painter, 1998).
- **Pardeamiento enzimático.** Causado por la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos, la enzima implicada en este tipo de deterioro es la polifenoloxidasas. El deterioro que causa esta reacción en las frutas y vegetales es visto por la mayoría de los consumidores como indeseable y puede limitar la ca-

dad. Los factores más importantes que afectan la velocidad de esta reacción, son las concentraciones tanto de la polifenoloxidasas activa y de los compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (Martínez y Whitaker, 1995).

- **Interacciones entre el alimento y el envase.** Una de las interacciones entre los alimentos y su envase más ampliamente estudiada es la existente entre los alimentos y las latas de hojalata. En este caso, las interacciones son reacciones electroquímicas entre electrodos (la lata y su cierre) y electrolitos (los alimentos). La reacción esta influenciada por diferentes factores como el número y tipo de metales presentes, el tipo de alimento y la presencia o ausencia de aire en el envase (Turner, 1998).
- **Hidrólisis del aspartame.** El aspartame es un edulcorante de gran intensidad utilizado en las bebidas "Light" y otros productos bajos en calorías. Bajo ciertas condiciones de temperatura y pH se hidroliza lo que hace que el producto sea cada vez menos dulce, esta pérdida de dulzor puede ser un factor limitante de la caducidad (Man, 2002).

### Cambios inducidos por la luz.

Los siguientes cambios inducidos o acelerados por la luz son bien conocidos (IFST, 1993):

- Fotooxidación de vitaminas.
- Fotooxidación de los pigmentos óxido nítricos de las carnes frías.
- Rancidez oxidativa de los alimentos.
- Fotodescomposición del aspartame.
- Decoloración de pigmentos.

### Cambios microbiológicos.

Todos los alimentos en particular los que tienen más humedad son sustratos ideales para el crecimiento bacteriano, el cual si es permitido será causa de intoxicaciones alimentarias o deterioro del alimento. La mayoría de las enfermedades de origen alimentario son causadas por bacterias que han contaminado el alimento durante su manipulación. La primera prioridad de un estudio de caducidad es garantizar la seguridad del alimento evaluado, en especial desde el punto de vista microbiológico y biológico (ICMSF, 1998).

### Factores que influyen en la calidad de los alimentos.

Existe una relación directa entre los factores que influyen en la caducidad de los alimentos y los mecanismos por los que se alteran. Conocer los mecanismos por los que se alteran los alimentos ayudará a identificar correctamente los factores que limitan su caducidad. Una vez identificados éstos y sus parámetros asociados, deberán ser controlados y vigilados, en muchos casos de manera similar a lo establecido en el HACCP, si lo que se quiere es que la caducidad se mantenga de manera

consistente en el tiempo (Man, 2002).

**Factores intrínsecos.**

- **Materias primas.** La calidad del producto final es el reflejo de la calidad de sus materias primas. No todas las características y parámetros de una materia prima afectarán a la caducidad. Por ello hay que identificar aquellas que si le afectan y conocer su efecto (Betts y Everis, 2000).
- **Composición y formulación del producto.** La composición de un alimento es el factor individual más importante para establecer la caducidad de un alimento. Se ha demostrado que además de un tratamiento térmico adecuado y un control del almacenamiento y distribución posterior; la formulación del producto (pH, contenido de sal, etc.) es un factor crítico en el establecimiento de la caducidad (Gould, 1999).
- **Estructura del alimento.** La mayoría de los alimentos sólidos y semisólidos no poseen una estructura homogénea y uniforme. Por ello los factores químicos y físicos que afectan al crecimiento microbiano y a las reacciones químicas o bioquímicas pueden variar según su localización en el alimento (Katsaras y Leistener, 1991).
- **Macroestructura del producto.** En los productos compuestos o con varios elementos puede existir contacto entre los mismos que resultan en migraciones del contenido de humedad, color, aromas o aceites de un elemento a otro del producto (Howart, 2000).
- **Actividad de agua.** La actividad de agua expresa la disponibilidad del agua en un alimento. Cuando este alimento y la atmósfera con la que esta en contacto están en equilibrio, la humedad relativa de esa atmósfera se denomina humedad relativa equilibrada. Los valores de la actividad de agua como los que se presentan en el cuadro 2, se han usado tradicionalmente como indicador de la estabilidad de los alimentos con respecto a su potencial para el crecimiento bacteriano, cambios químicos y bioquímicos y transferencias físicas como migraciones del contenido de humedad (Labuza y Hyman, 1998).

**Cuadro 2. Valores típicos de actividad de agua (a<sub>w</sub>) de algunos alimentos**

a <sub>w</sub>	Alimento
> 0.98	Carnes frescas, pescado, fruta fresca, vegetales, natillas, jugos de frutas.
0.98-0.93	Embutidos cocidos, quesos, carnes curadas, leche evaporada.
0.85-0.60	Embutidos ahumados, carne seca, jamón curdo, quesos curados, leche condensada.
<0.60	Pastas para sopa, bollería, galletas, cereales para desayuno, aperitivos, frutas y vegetales deshidratados.

Fuente: Man, 2002.

- **pH y acidez.** El hecho de que los microorganismos sólo pueden crecer y multiplicarse a determinados valores de pH es bien conocido y documentado, en el cuadro 3 se presentan valores típicos de pH de algunos alimentos. En el caso de las bacterias, estas se desarrollan generalmente a pH entre 6 y 6.5, inhibiéndose su crecimiento a pH inferior a 4.5. Los hongos y levaduras resisten un pH menor (2-3). Por eso los alimentos ácidos como el yogur o con ingredientes como el vinagre, son más estables porque tienen un pH algo superior a 4.5, mientras que la leche, carnes y pescados, con un pH mayor, se deterioran con mucha facilidad (Wilson y Hibberd, 2000).

**Cuadro 3. Valores típicos de pH de algunos alimentos**

Rango del pH	Alimento	pH
Acidez baja (pH 7.0-5.5)	Leche	6.3-6.5
	Quesos	5.9
	Tocino	5.6-6.6
	Carne roja	5.4-6.2
	Vegetales enlatados	5.4-6.4
	Pollo	5.6-6.4
	Pescado	6.6-6.8
	Crustáceos	6.8-7.0
	Mantequilla	6.1-6.4
	Acidez media (pH 5.5-4.5)	Vegetales fermentados
Algunos quesos		4.5
Plátanos		4.5-5.2
Ácidos (4.5-3.7)	Vainas	4.6-5.5
	Mayonesa	3.0-4.1
Alta acidez (pH < 3.7)	Tomates	4.0
	Encurtidos envasados	3.5-3.9
	Jugos de frutas	3.1-3.3
	Cítricos	3.0-3.5
	Manzanas	2.9-3.3

Fuente: ICMSF, 1988.

**Factores extrínsecos.**

Entre los factores extrínsecos que influyen en la caducidad del alimento se encuentran aquellos relacionados con su proceso:

- Elaboración.
- Preparación de materias primas.
- Separación.
- Operaciones realizadas a temperatura ambiente.
- Operaciones que necesitan vapor o agua caliente.
- Operaciones que extraen calor de los alimentos.
- Operaciones auxiliares y posteriores a la elaboración.
- Higiene y sistemas y materiales de envasado.
- Almacenamiento, distribución y exposición para la venta (Man, 2002).

## Manipulación y uso por el consumidor.

La manipulación y uso por parte del consumidor puede ser un elemento importante a la hora de establecer la caducidad, aun estando fuera del control del productor en su mayor parte y poder ser muy variable. Una de las formas de controlarlo es mediante las indicaciones en el etiquetado a cerca de las condiciones de almacenamiento, conservación y uso (Evans, 1998).

## Modelo para un producto de caducidad corta

Actualmente existe una creciente demanda de productos listos para consumir, por lo general este tipo de productos conservan características muy similares al producto original ya que son sometidos a tratamientos físicos simples de preparación y para su conservación y distribución se emplea únicamente la refrigeración. Entre este tipo de productos se encuentran los hortofrutícolas, los cuales durante su procesamiento sólo son modificados ligeramente en su apariencia original, mostrando un aspecto fresco tanto en sus características como en su calidad y mantienen sus tejidos vivos, aunque estos no presenten las mismas respuestas fisiológicas que los tejidos sin tratar. Sin embargo el rechazo por parte del consumidor esta determinado fundamentalmente por variaciones en su aspecto ya que son un indicador de pérdida de frescura, así como una corta vida útil (Shewfelt, 1987).

## Descripción del producto.

Desarrollo de un producto listo para ser consumido a base de ajo blanco picado (Pérez y col., 2007).

## Descripción del proceso.

Los ajos fueron pelados manualmente y picados mecánicamente, posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm) durante 1 min a 4°C. Se probaron tres soluciones antipardeantes de impregnación: Citrato de sodio 2%, Ascorbato de sodio 2% y las combinaciones de ambos con Lactato de calcio 2%. Las condiciones de impregnación al vacío fueron: inicialmente 15 min a 50 cmHg y posteriormente 15 min a presión atmosférica. Como control se empleo agua destilada sin tratamiento de impregnación (Pérez y col., 2007).

## Seguridad del alimento.

Para garantizar la seguridad del producto, se realizó un análisis de riesgos basado en los principios del HACCP, considerando los siguientes elementos:

- Identificación de peligros más relevantes: en este caso un peligro consiste en la posibilidad que existe de la pérdida de caducidad del producto.
- Establecimiento de los puntos de control crítico (PCC), sus límites críticos y sus procedimientos de vigilancia. Por ejemplo:

- El suministro de materias primas: los ajos deben comprarse cumpliendo una especificación apropiada (peso, tamaño, variedad, estado de madurez, ausencia de daños, infecciones o pudrición, etc.). Se deben especificar el tiempo máximo y las condiciones de almacenamiento antes de uso.
- Los procesos de pelado, picado y desinfección con hipoclorito de sodio deben controlarse y vigilarse porque puede afectar la calidad y caducidad del producto.
- Tratamiento de impregnación al vacío: las condiciones de tiempo y presión deben controlarse y vigilarse.
- Proceso de envasado: debe controlarse y vigilarse para garantizar que posterior al envasado el producto se enfrie lo más rápido posible a 4 °C.

## Mecanismos de pérdida de caducidad.

Es un alimento elaborado con alto contenido de humedad, si bien recibe un tratamiento de impregnación al vacío que permite conservar las principales características del producto, este no es estéril por lo que si se contamina después del tratamiento de impregnación y envasado puede permitir un crecimiento microbiano que deteriore el producto o sea capaz de producir una intoxicación alimentaria. El sistema de conservación del alimento es básicamente, la manipulación higiénica posterior al tratamiento y el control de temperaturas a lo largo de su distribución y del uso por el consumidor.

## Pruebas de almacenamiento.

Consistió en someter al producto terminado a las condiciones de almacenamiento a las que estaría expuesto durante su transporte, distribución y antes del consumo.

## Condiciones de almacenamiento

- Producto control: sin solución antipardeante y sin tratamiento de impregnación.
- Productos evaluados: con soluciones antipardeantes y tratamiento de impregnación al vacío.
- Temperatura de almacenamiento: 4 °C
- Tiempo de almacenamiento: 25 días.

## Plan de muestro: calendario, análisis y número de muestras.

- Se evaluaron los productos y el control los días 0, 5, 10, 15, 20 y 25.
- Tasa de respiración de CO<sub>2</sub> (TR), se utilizó un método estático en un detector de CO<sub>2</sub>.
- Textura, se midió la resistencia a la penetración de los tejidos.
- Determinación de color, se utilizó un espectrocolorímetro empleando el sistema de coordenadas L\*a\*b\*.

- Análisis microbiológicos. Recuento de microorganismos mesófilos y psicrófilos aerobios de acuerdo a los métodos reportados por la APHA, 1992.
- Evaluación sensorial. Se determinó en forma subjetiva empleando un panel de catadores semi entrenados utilizando la siguiente escala 1: no deseable, 3: pobre, 5: indiferente, 7: aceptable, 9: excelente.
- Considerando las determinaciones realizadas por duplicado y los días de muestreo el requerimiento de muestras por tratamiento fue de 12, tomando en cuenta que se tienen cuatro tratamientos y dos controles el número total de muestras fue de 72.

**Predicción de la caducidad.**

Se observo que la impregnación al vacío aumento significativamente la tasa de respiración de CO<sub>2</sub>, incremento asociado al estrés celular ocasionado por las operaciones de manipulación que provocan alteraciones en la fisiología del tejido, potenciándose tanto la cadena de transporte de electrones como el ciclo de os ácidos tricarbóxicos. El estrés de los tejidos daño las uniones celulares y provocó su separación en los tejidos, afectando el comportamiento mecánico y disminuyendo la fuerza requerida para su penetración. En cuanto al color se observaron cambios significativos debido a que la impregnación homogeniza el índice de refracción de las muestras incrementando su translucidez y disminuyendo su luminosidad. Los resultados obtenidos para los parámetros se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4. Efecto de la impregnación al vacío (IV) sobre la tasa respiratoria de CO<sub>2</sub> (TR-CO<sub>2</sub>), la resistencia a la penetración (RP) y el color del producto al concluir los 25 días de almacenamiento a 4°C.**

Parámetro	Producto	
	Fresco	IV
TR (ml/kg h)	17.5	46.3
RP (kg/m <sup>2</sup> )	8.5	6.4
Color (L*b*)	70, 14	82, 18

Fuente: Pérez y col., 2007.

Los resultados obtenidos para los parámetros microbiológicos y la evaluación sensorial se presentan en el cuadro 5. Con respecto a los recuentos de mesófilos y psicrófilos aerobios, los tratamientos sin lactato de calcio mostraron crecimiento microbiano significativamente mayor a lo largo del almacenamiento. La calidad

visual determinada por el panel de catadores semientrenados, permitió determinar que las muestras tratadas con antipardeantes y lactato de calcio recibieron mejor puntuación y mantuvieron una mayor aceptación.

**Cuadro 5. Valores medios de crecimiento de microorganismos (CM) y de puntuación de calidad visual (CV) al concluir los 25 días de almacenamiento a 4°C.**

Tratamiento	CM (log <sub>10</sub> UFC/g)		CV
	Mesófilos	Psicrófilos	
Ascorbato	1.7	1.4	7.6
Ascorbato-Ca <sup>++</sup>	1.0	1.1	8.0
Citrato	1.6	2.1	5.7
Citrato-Ca <sup>++</sup>	1.0	1.0	6.9
Control	3.3	3.0	2.1
Control-Ca <sup>++</sup>	2.3	1.5	4.7

Fuente: Pérez y col., 2007.

**Conclusiones para el modelo de caducidad corta**

Del estudio se concluyó que si bien la impregnación al vacío modificó algunas de las características de calidad del producto como la TR-CO<sub>2</sub> y la textura debido al estrés que causa en el tejido; tambien favorece la impregnación del lactato de calcio y los antipardeantes (Ascorbato y Citrato de sodio). El ión calcio contribuyó a reforzar la estructura celular de los tejidos y los antipardeantes aumentaron notablemente la calidad visual del producto, lo anterior incremento significativamente la aceptación y la vida útil del producto de una semana a 25 días, conservando durante ese tiempo sus características sensoriales y de calidad.

**Referencias Bibliográficas**

APHA. (1992). American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18<sup>th</sup> edition. USA

Berry-Ottaway, P. (1993). Stbility in commercially sterilized flavored dairy beverages. *Journal of Dairy Sceince*, 77, 34-38.

Betts, G. and Everis, L. (2000). Shelf-life determination and challenge testing. In: *Chilled Foods. A Comprehensive Guide*, 2<sup>nd</sup> edn, pp. 259-285. Woodhead Publishing. Cambridge, UK.

Blanchfield, J. R. (1998). Food and drink good manufacturing practice. A guide to its responsible management, 4<sup>th</sup> edn, *Institute of Food Science and Technolo-*

- gy (UK), London.
- Evans, J. A. (1998). Consumer perceptions and practice in the handling of chilled foods. In: *Sous Vide and Cook-chill Processing for the Food Industry*, pp. 312-360. Aspen publishers, Gaithersburg, MD.
- FSA. (2000). Food law guide. *Food standards agency* (UK), London.
- Gould, G. W. (1999). Sous vide foods: conclusions of an ECFF botulism working party. *Food control*, 10, 137-150.
- Hamilton, R. J. (1994). The chemistry of rancidity in foods. In: *Rancidity in Foods*, 3rd edn, pp. 1-21, Blackie Academic and Professional, London.
- Howarth, J. A. K. (2000). Ready-to-eat breakfast cereals. In: *Shelf-life Evaluation of Foods*, 2nd edn, pp. 182-196. Aspen publishers, Gaithersburg, MD.
- ICMSF, (1998). *Microorganisms in Foods 6*. Microbial Ecology of Food Commodities. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, Blackie Academic and Professional, London.
- IFST. (1993). Shelf life of foods. Guidelines for its determination and prediction. *Institute of Food Science and Technology* (UK), London.
- IFST. (1999). Development and use of microbiological criteria for foods. *Institute of Food Science and Technology* (UK), London.
- Katsaras, K. and Leistener, L. (1991). Distribution and development of bacterial colonies in fermented sausages. *Biofouling*, 5, 115-124.
- Labuza, T. P. and Hyman, C. R. (1998). Moisture migration and control in multidomain foods. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 47-55.
- Man, D. (2002). Shelf life, 1st edn, Blackwell publishing, Oxford, UK.
- Martínez, M. V. and Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 195-200.
- Matthews, A. C. (1995). Managing stability in the beverage industry. *Food Technology International Europe*, 77-81
- Mrohs, A. (2000). Durability indication: European Union. In: *Food Labeling*, pp. 101-109. Woodhead Publishing. Cambridge, UK.
- Nielsen, T. and Jagerstad, M. (1994). Flavour scalping by food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 353-356.
- Painter, T. J. (1998). Carbohydrate polymers in food preservation: an integrated view of the Maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in sphagnum-dominated peat bogs. *Carbohydrate polymers*, 36(4), 335-347.
- Pérez, L. A., Ramírez, M. M., Ramírez, R. E. (2007). Conservación de ajo (*Allium sativum* L) mínimamente procesado mediante técnicas de impregnación al vacío. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 16(3): 265-266.
- Sanders, T. A. B. (1994). Nutritional aspects of rancidity. In: *Rancidity in Foods*, 3rd edn, pp. 128-140, Blackie Academic and Professional, London.
- Tunner, T. A. (1998). Canmaking. The technology of metal protection and decoration. Blackie Academic and Professional, London.
- Shewfelt, R. L. (1987). Quality of minimally processed refrigerated fruits and vegetables. *Journal of Food Quality*, 10(3): 143-156.
- Wilson, P. D. G. and Hibberd, D. J. (2000). The prediction of pH in complex foods. *Food Science and Technology Today*, 14(2), 72-75.

# PERSPECTIVAS DE LA INMOVILIZACIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS POR MICROENCAPSULACION

J. Pacheco-Aguirre, G. Rosado-Rubio, D. Betancur-Ancona, L. Chel-Guerrero

## RESUMEN.

*La microencapsulación, desde el punto de vista tecnológico, puede definirse como el proceso de recubrimiento de sustancias activas, bajo la forma de moléculas, sustancias sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. Este proceso depende de diversos factores y a pesar de existir métodos alternativos para su preparación (aspersión, gelificación, coacervación, etc.), el principio básicamente se fundamenta en la deposición por etapas del material de recubrimiento (matriz) sobre el agente a ser encapsulado (núcleo). Las matrices utilizadas en los procesos de microencapsulación se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros (Naturales, semisintéticos y sintéticos). Asimismo, los métodos de microencapsulación pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza del proceso en: físicos, químicos y fisicoquímicos. Las aplicaciones de estos métodos han ido incrementándose en la industria de los alimentos debido a que proporcionan protección contra el calor y la humedad a los materiales encapsulados, permitiendo mantener la estabilidad y viabilidad de la sustancia activa. En la industria de los alimentos las matrices y los métodos de formación de microcápsulas se han utilizado para proteger aromas, sabores, colores, sustancias nutracéuticas y probióticos, entre muchas otras aplicaciones. Aunado a lo anterior, estas matrices pueden ser incorporadas en derivados lácteos, bebidas y alimentos funcionales.*

## Antecedentes.

La microencapsulación, desde el punto de vista tecnológico, podría definirse como el proceso de recubrimiento de sustancias activas, bajo la forma de moléculas, ingredientes sólidos o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de “micropartículas”, “microcápsulas” o “microesferas”, sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna, si bien todos ellos presentan como característica común su tamaño de partícula, el cual es siempre inferior a 1 mm. Cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , el producto resultante del proceso de microencapsulación recibe la denominación de “nanoesferas”, “nanopartículas” o “nanocápsulas” (Pedroza-Islas, 2002).

Un hecho destacable del proceso de microencapsulación radica en que su aplicación no se limita únicamente al campo de los medicamentos o sustancias biológicas, sino que se extiende a campos tan diversos como la agricultura, la cosmética, petroquímica, insecticidas, alimentación, etc. De hecho, el origen de la microencapsulación data del año 1931 por la National Cash Register, en el que se publicó un trabajo que describía la formación de microcápsulas de gelatina según un procedimiento que en aquel momento recibió la denominación de “coacervación” (Fanger, 1974). Esta técnica fue objeto de múltiples variaciones durante los años 40, y su aplicación más importante fue dirigida a la encapsulación de colorantes para la elaboración del papel de calca. Este consistía, en una fina película de microcápsulas adherida a una hoja de papel, de tal modo que la presión ejercida por el bolígrafo sobre el papel provocaba la fractura de las microcápsulas y la consiguiente liberación del marcador, dejando patente la impresión en la hoja de copia. Años más tarde, la microencapsulación encontró aplicaciones interesantes en el campo de la alimentación, por ejemplo para la encapsulación de aromas, vitaminas, etc., y de la agricultura, especialmente para la encapsulación de plaguicidas y fertilizantes (Yáñez y col., 2002).

## ¿Qué es una microcápsula?

Una microcápsula es una estructura morfológica relativamente simple compuesta por dos elementos claramente diferenciados, el núcleo activo y un delgado armazón polimérico que envuelve al primero. El proceso de obtención es un procedimiento complejo por el cual ciertas sustancias activas (olores, bactericidas, etc.) son introducidas en la matriz, llamadas también sistema pared o cobertura de naturaleza polimérica (acarreador) lográndose, por las propiedades del polímero, una liberación gradual de estos agentes activos, insertados en función de los requerimientos concretos de aplicación del substrato en el que se depositen las microcápsulas (AITEK, 2003).

El núcleo puede estar compuesto por sustancias tanto de naturaleza líquida como sólida. En el primer caso se trata de una pequeña gota que contiene a un agente activo de naturaleza soluble. Si, por el contrario, el agente es insoluble, el núcleo está compuesto por una suspensión, ya sea

por emulsión o por dispersión del mismo en el líquido portador. Esta suspensión puede modificarse o formularse en función del uso al que vaya a ser destinada. En cuanto al recubrimiento del núcleo o matriz, el polímero utilizado para la constitución de su armazón puede ser tanto de origen natural como sintético. Para la formación de las microcápsulas existen diferentes técnicas tanto físicas como químicas, pero siempre el resultado final es una suspensión de microcápsulas con tamaños que oscilan entre uno y varios cientos de micrómetros (AITEK, 2003).

### Proceso de microencapsulación.

El proceso de microencapsulación depende de diversos factores y a pesar de existir diversos métodos, el principio básicamente se fundamenta en la deposición por etapas del material de recubrimiento (matriz) sobre el agente a ser encapsulado (núcleo). En una primera fase el material de recubrimiento se presenta en estado líquido por efecto de haber sido sometido a una fusión o disolución en un disolvente. Por su parte, la sustancia a encapsular se encuentra en este momento en forma de pequeñas partículas (en el caso de agentes de naturaleza sólida) o gotas (en caso de líquido) en el medio apropiado, que puede estar en fase líquida o gaseosa, atendiendo a las propiedades del agente a encapsular. En una fase posterior, y por diversas técnicas, la matriz se deposita sobre la sustancia a encapsular y finalmente se produce su solidificación (AITEK, 2003).

### Materiales utilizados en la microencapsulación.

La variedad de materiales que pueden emplearse en la microencapsulación ha ido en aumento, en la medida en que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones de la microencapsulación. De un modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros.

**Grasas:** La cera de carnauba, el alcohol estearílico, el ácido esteárico y los gelucires® (Excipiente anfílico: mono y diésteres de polietilenglicol con ácidos grasos) son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por acción de las lipasas que existen a nivel gástrico (Jato, 2003).

**Proteínas:** La gelatina fue el primer material utilizado en microencapsulación y sigue siendo, en la actualidad, un material con un importante potencial. La albúmina es un ejemplo de proteína que se aplica en microencapsulación (Jato, 2003).

**Polímeros:** Debido a su gran versatilidad, ésta es la familia de materiales más utilizada en la microencapsulación. Dentro de esta gran familia se distingue entre polímeros *naturales*, *semisintéticos* y *sintéticos*. Los polímeros *naturales* son principalmente de naturaleza polisacárida, de origen animal y vegetal; destacan el alginato, el dextrano, la goma arábica (goma acacia)

y el quitosano. Los polímeros *semisintéticos* engloban los derivados celulósicos, de los cuales existen una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad; la etilcelulosa y el acetobutirato de celulosa, por ejemplo, son polímeros insolubles, mientras que el acetofalato de celulosa presenta una solubilidad dependiente del pH. Los polímeros *sintéticos* más destacables son los derivados acrílicos y los poliésteres. Dentro de los derivados acrílicos existen polímeros insolubles con diferente grado de permeabilidad y también variedades con solubilidad dependiente del pH, ofreciendo de este modo amplias posibilidades para controlar la liberación del material encapsulado. Por último los poliésteres son polímeros de carácter biodegradable, lo que permite su administración por una vía parenteral. Dentro de ellos los más conocidos son la poliepsilon-caprolactona, el poli(ácido láctico), y los copolímeros del ácido láctico y del ácido glicólico. Estos polímeros son hidrofóbicos, mientras que sus productos de degradación, el ácido láctico y el ácido glicólico son hidrofílicos y fácilmente eliminables del organismo por filtración glomerular. La velocidad de liberación del principio activo encapsulado puede controlarse en virtud de la selección del polímero que presente una adecuada velocidad de degradación (Jato, 2003).

### Métodos de microencapsulación.

Existe una gran cantidad de métodos para microencapsular, y aun basándose en el principio anterior, muy diferentes entre ellos. En general estos métodos pueden ser agrupados atendiendo a su naturaleza, en tres grupos, a continuación se enuncian las técnicas más representativas de cada uno (AITEK, 2003) (Cuadro 1):

Cuadro 1. Técnicas representativas de la microencapsulación.

Procesos físicos	Procesos químicos	Procesos físico-químicos
Secado por aspersión.	Polimerización interfacial	Coacervación simple.
Extrusión	Inclusión molecular	Coacervación compleja
Recubrimiento por aspersión.		Atrapamiento en liposomas.
		Gelificación iónica

### Secado por aspersión.

El secado por aspersión es ampliamente usado en la industria de los alimentos debido a que es un método económico y efectivo en la conservación de ellos, en particular empleado en la deshidratación de leche (Ré, 1998). Los almidones modificados, las maltodextrinas y las gomas son empleados como matriz polimérica. El material a encapsular es homogenizado con el acarreador; la mezcla es alimentada al secador por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco; las cápsulas son colectadas posteriormente. Desarrollos recientes se han hecho con nuevos acarreadores, incluyendo

coloides y gomas naturales, para la obtención de mezclas que permitan incrementar la retención de compuestos volátiles y la vida de anaquel de las microcápsulas. Se ha conseguido la retención de aceites esenciales de naranja y disminuido su oxidación al usar goma arábiga (Risch, y Reineccius, 1998).

### **Aspersión por enfriamiento o congelamiento**

Una variante del secado por aspersión consiste en enfriamiento o congelamiento, donde el material a encapsular es mezclado con el acarreador y es atomizado por medio de aire frío. Las microcápsulas son producidas por nebulización de la emulsión o suspensión que contiene el material de la matriz polimérica y la sustancia activa sólida o líquida. Las matrices poliméricas empleadas usualmente son aceites vegetales en el caso de aspersión por enfriamiento o aceite vegetal hidrogenado para la aspersión por congelamiento; así pueden encapsularse líquidos sensibles al calor y materiales que no son solubles en disolventes convencionales. La reducción de la temperatura produce una solidificación del lípido matriz y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula. La aspersión por enfriamiento es usualmente empleada para encapsular sulfato ferroso, vitaminas, minerales o acidulantes. Las aplicaciones más comunes de la aspersión por congelamiento incluye el secado de sopas y los alimentos con altos contenidos de grasa. Las microcápsulas producidas por enfriamiento o congelamiento son insolubles en agua debido a su matriz de lípidos por lo que se encapsulan materiales solubles como enzimas, vitaminas solubles en agua y acidulantes (Jackson, y Lee, 1991).

### **Extrusión.**

La microencapsulación por extrusión involucra el paso de una emulsión del material activo y la matriz polimérica a través de un dado a alta presión. La extrusión constituye el segundo proceso más usado, después del secado por aspersión, para la encapsulación de sabores. Un proceso típico involucra la mezcla de sabores con jarabe de maíz o almidón modificado caliente, la cual se hace pasar por el extrusor, resultando en vida de almacenamiento mayor comparados con los que no son encapsulados. La vitamina C y los colorantes pueden tener una vida de almacenamiento superior a dos años. Además, la forma sólida de los sabores es más conveniente para su uso. La aplicación de este método en el procesamiento de alimentos incluye bebidas, pasteles, gelatinas, postres, así como numerosos sabores (Risch, y Reineccius, 1998).

### **Suspensión en aire o recubrimiento en lecho fluidizado.**

Esta técnica consiste en suspender partículas sólidas en aire a alta velocidad dentro de una cámara con temperatura y humedad controlada, donde la matriz

polimérica es atomizada, lo que da lugar a estructuras tipo reservorio. El proceso transcurre en unos aparatos denominados "de recubrimiento en lecho fluidizado" de los cuales el más difundido es el sistema *Wurster*. Este sistema consta de una malla metálica en la que se colocan las partículas de sustancia que se desean recubrir. Las mismas se mantienen en suspensión gracias a la circulación de una corriente de aire en sentido ascendente a través de la malla metálica. A su vez, desde la parte inferior del sistema se introduce la solución del material de recubrimiento dispersada bajo la forma de muy finas gotas, las cuales se depositan sobre las partículas de la sustancia núcleo. La corriente de aire desplaza a las partículas recubiertas hacia la parte superior del sistema donde se produce la solidificación de la cubierta y, finalmente, caen de nuevo en la malla metálica del sistema, pudiendo repetirse sucesivas veces este ciclo de recubrimiento. La cantidad de partículas cubiertas depende de la longitud de la cámara y del tiempo de residencia dentro de ésta. La técnica es aplicable a matrices poliméricas que funden fácilmente (como aceites vegetales hidrogenados, estearinas, ácidos grasos, emulsificantes, ceras) o matrices solubles (como almidones, gomas y maltodextrinas). Para matrices poliméricas fundibles se usa aire frío para endurecer el acarreador, mientras que para las matrices poliméricas solubles se usa aire caliente para evaporar el disolvente. Los ingredientes con facilidad de fundir son liberados al incrementar la temperatura o por ruptura física, mientras que las matrices poliméricas solubles liberan su contenido al adicionar agua. Alimentos fortificados y mezclas nutrimentales contienen ingredientes encapsulados por lecho fluidizado; algunos ejemplos son: ácidos cítrico, láctico, sórbico y bicarbonato de sodio utilizado en productos de panificación (Yañez y col., 2002).

### **Polimerización interfacial.**

Este método involucra la disolución de un monómero hidrofóbico polimerizable en un material activo hidrofóbico. La mezcla es dispersada en una fase polar y un catalizador provoca la polimerización del monómero; el polímero es insoluble en la sustancia activa hidrofóbica y depositado como matriz alrededor de la sustancia activa. Los polímeros que forman matrices adecuadas son poliéster, poliamidas, poliuretanos y poliureas. La polimerización interfacial ocurre entre monómeros disueltos en sus respectivas fases inmiscibles; los monómeros solubles son dispersados en la fase acuosa por medio de agitación, la membrana de la cápsula es formada por la adición de un monómero orgánico soluble en la fase continua u orgánica. Las membranas poliméricas de poliaminas, nylon, poliéster o polifeniléster son producidas por la reacción entre el monómero soluble en agua, como poliamina, L-lisina, 1,6-hexametilendiamina, piperidina, o polifenol y un monómero soluble en medio orgánico como sebacoil cloro, 2,2-dicloroéter.

Para llevar a cabo una polimerización en emulsión, se disuelve un agente tensoactivo en agua, el cual forma estructuras esféricas llamadas micelas, posteriormente se introduce el monómero, el cual interacciona con las micelas y el agua. Luego se agrega un iniciador de polimerización (peróxidos cíclicos) soluble en agua, el cual empieza a descomponerse y genera radicales libres, los cuales entran a las micelas hinchadas para reaccionar con el monómero que está dentro de ellas y así iniciar la reacción de polimerización dando lugar a que estas micelas se transformen en partículas. Una vez iniciada la reacción, el monómero dentro de las partículas es rápidamente consumido, pero el monómero de las gotas es transferido hacia las partículas para mantener la reacción. La reacción de polimerización termina dentro de una partícula cuando entra otro radical o cuando se transfiere la cadena a un monómero y el nuevo radical generado sale de la partícula (Figura 1). Esta técnica recientemente ha sido empleada para encapsular una bacteria ácido láctica para obtener una mayor productividad en las fermentaciones con bastante éxito (Onwulata y col. 1994; Rosenberg y Young, 1993).

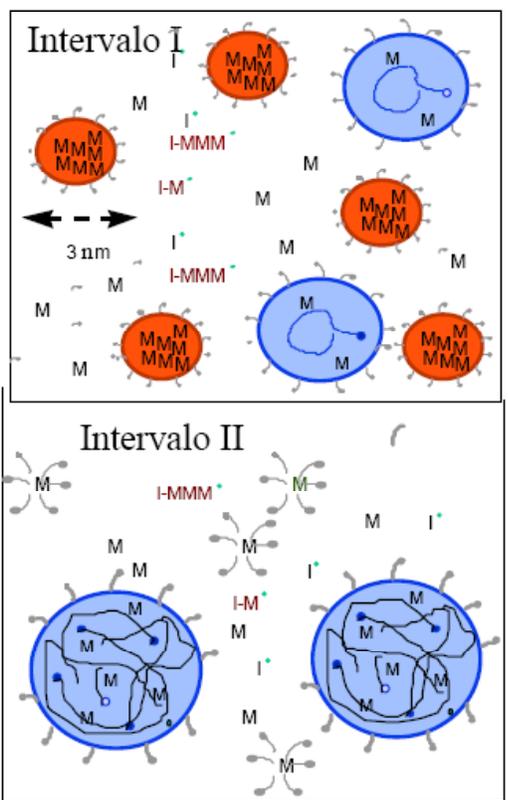


Figura 1. Etapas de una polimerización interfacial. Etapa o intervalo I iniciación de la polimerización. Etapa o intervalo 2 terminación de la reacción.

### Inclusión de complejos.

La inclusión de complejos, también conocida como encapsulación molecular, utiliza  $\beta$ -ciclodextrinas (CD) para el atrapamiento de moléculas. Estas CD tienen

un centro hidrofóbico mientras que la superficie exterior es hidrofílica. Las CD forman complejos por inclusión o por un tipo huésped-anfitrión. El principal mecanismo involucra la formación de complejos por inclusión de analitos o sustancia activa en la CD permitiendo un equilibrio dinámico en el cual el agua u otro compuesto, es reemplazado en la cavidad de la molécula de CD (Qi y Romberger, 1998). La estabilidad de estos complejos depende de la estructura, hidrofobicidad de la molécula, pH, disolvente orgánico, temperatura y concentración de la CD. La preparación de complejos se realiza por dos métodos: en el primero la molécula huésped y la CD son cristalizadas, un disolvente menos hidrofóbico que la molécula huésped se mezcla con los componentes dando una acomplejación de la molécula huésped hacia el centro de la CD. Esta y la molécula huésped son mezcladas en agua durante un tiempo hasta conseguir el equilibrio. El segundo método involucra la forma gaseosa de la molécula huésped en una solución de CD. Los complejos de inclusión obtenidos son sólidos cristalinos y pueden adicionarse a alimentos secos con un mínimo de degradación o pérdida del compuesto huésped durante el almacenamiento. Las CD protegen sabores y otros ingredientes sensibles al calor que son adicionados en alimentos extrudidos. Aceite de ajo, cebolla y vitaminas A, E y K han sido acomplejados con CD (Qi y Romberger, 1998; Pszczola, 1998).

### Coacervación o separación de fases.

Bajo la denominación de “coacervación” o “separación” de fases se agrupa una serie de técnicas de microencapsulación que se basan en la inducción por algún procedimiento de la desolvatación del polímero que, a continuación, se deposita en forma de pequeñas gotas de coacervado alrededor de la sustancia que se va a encapsular. El término “coacervación” fue introducido en la química de los coloides para describir el fenómeno de agregación macromolecular o separación de fases líquidas que tenía lugar en el seno de un sistema coloidal. Se obtienen dos fases líquidas, una rica (coacervado) y otra pobre en coloides (sobrenadante). La coacervación es una etapa intermedia entre disolución y precipitado; es decir, conlleva una desolvatación parcial en contraposición a la desolvatación exhaustiva asociada al proceso de precipitación. Cualquier factor que induzca la desolvatación del polímero producirá el fenómeno de coacervación. Entre los procedimientos inductores de la coacervación se puede destacar un cambio en la temperatura, una modificación del pH y la adición de un “no solvente” (aquel disolvente que es miscible con el disolvente del polímero y en cual el polímero es insoluble), una sal o un polímero incompatible. Las sustancias encapsuladas son más estables aun cuando estas se utilicen dentro de alimentos que requieran tratamientos térmicos como calentamiento, microondas y freído. Por otro lado, sus costos de proceso son relativamente bajos (Jato, 2003).

El proceso de microencapsulación por coacervación consta de las siguientes etapas (Figura 2): Dispersión mediante agitación adecuada del compuesto que se va a encapsular (líquido o partículas sólidas) en una solución del (los) polímero(s) formador(es) de cubierta. Inducción de la coacervación por alguno de los procedimientos señalados, en esta etapa se observa que el sistema sufre una opalescencia y, al microscopio óptico, las gotitas de coacervado presentan una apariencia semejante a la de una emulsión. Deposición (adsorción) de las gotitas de coacervado alrededor de los núcleos que va a encapsular. El sobrenadante, en principio turbio, se va clarificando

a medida que transcurre el proceso de coacervación. La deposición continuada de la cubierta es promovida por una reducción de la energía libre interfacial del sistema, debido a una disminución del área superficial durante la coalescencia de las gotitas líquidas poliméricas. Coalescencia de las gotitas de coacervado para formar una cubierta continua alrededor de los núcleos. Endurecimiento de la cubierta de coacervado, sometiendo al sistema a un enfriamiento y añadiendo (de manera opcional) un agente reticulante (glutaraldehído). Finalmente, las microcápsulas (estructura de tipo reservorio) obtenidas son aisladas por centrifugación o filtración (Jato, 2003).

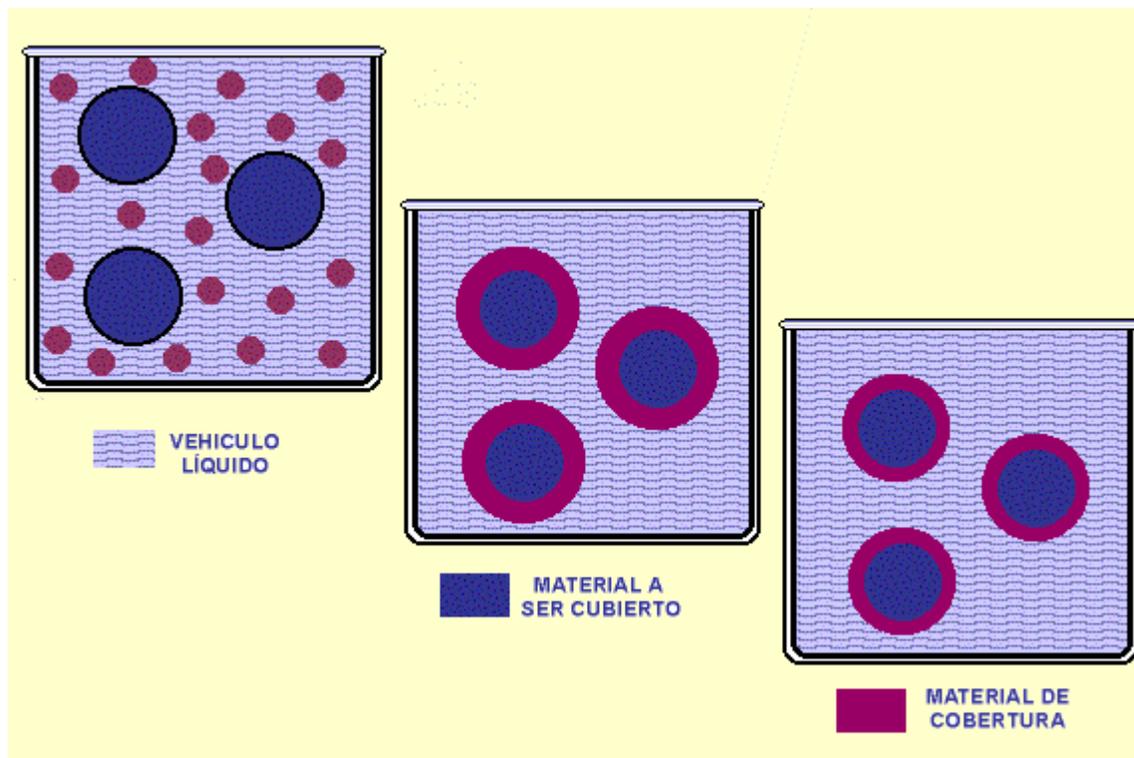


Figura 2. Etapas de la microencapsulación por coacervación

## Tipos de coacervación.

### Coacervación en fase acuosa.

Esta técnica implica la utilización de agua como disolvente y un polímero soluble en agua como material de recubrimiento y permite la encapsulación de sustancias insolubles en dicho líquido. El principio activo es dispersado directamente en la solución polimérica o en un aceite que, a su vez, es emulsificado en la solución polimérica. La principal ventaja de este método es que transcurre en un medio totalmente acuoso y que los polímeros utilizados (de origen natural) carecen de toxicidad (Jato, 2003).

### Coacervación simple.

Este procedimiento se basa en la utilización de un único polímero para formar la cubierta y de una

sal o de un “no solvente” del polímero para inducir la coacervación. El polímero empleado es normalmente la gelatina, cuyas soluciones gelifican (a concentraciones superiores al 1%) a temperaturas inferiores a 30 °C. Para inducir la coacervación se puede añadir un “no solvente” miscible con el agua (disolvente polar: acetona, etanol, isopropanol) o una sal (sulfato sódico, sulfato amónico). Otras combinaciones polímero/agente inductor utilizadas en la práctica para microencapsular medicamentos son agar/acetona, alcohol polivinílico/propanol, metilcelulosa/acetona y pectina/isopropanol (Jato, 2003).

### Coacervación compleja.

La coacervación compleja es el proceso de separación de fases que tiene lugar de forma espontánea cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más coloides que presentan carga opuesta (policación y polianión),

como consecuencia de la atracción electrostática que sufren. En los procedimientos de microencapsulación por coacervación compleja se utilizan generalmente combinaciones de una proteína y un polisacárido, en concreto gelatina y goma arábiga (goma acacia). La gelatina es una proteína anfotérica (presenta carga positiva a valores de pH inferiores a su punto isoelectrico -PI-, y carga negativa a valores de pH superiores) que deriva del colágeno y resulta muy adecuada para la coacervación debido a que su especial configuración facilita la oclusión de una considerable cantidad de agua. La goma arábiga presenta carga negativa en todo el rango de pH. En consecuencia, a pH inferiores a su PI, la gelatina está cargada positivamente e interacciona con las moléculas de goma arábiga, con lo que se produce una neutralización de cargas y una desolvatación de la mezcla polimérica, que se separa en una fase líquida o coacervado complejo. En el proceso de microencapsulación por coacervación, el aspecto más importante que hay que tener en cuenta es el control del pH, ya que determina la ionización de ambos coloides, así como la proporción relativa en que se mezclan éstos y la concentración polimérica total (Jato, 2003).

### **Coacervación en medio no acuoso.**

Esta técnica se utiliza principalmente para la microencapsulación de medicamentos solubles en agua. Para formar la cubierta, se utilizan polímeros solubles en disolventes orgánicos, entre los que se destacan la etilcelulosa y los polímeros de la familia del poli(ácido láctico). El polímero se disuelve bajo determinadas condiciones en un disolvente orgánico poco polares (cloroformo, eter) y el material que se va a encapsular se suspende o emulsifica en la solución polimérica (Jato, 2003).

### **Coacervación por un cambio de temperatura.**

El procedimiento de microencapsulación por un cambio de temperatura implica la utilización de un polímero que es soluble en un disolvente orgánico a una temperatura elevada e insoluble en el mismo disolvente a temperatura ambiente. Generalmente, se utiliza la etilcelulosa que, siendo insoluble en ciclohexano a temperatura ambiente, se solubiliza a temperaturas próximas a la de ebullición de dicha sustancia (78-80°C). El procedimiento consiste en suspender el principio activo que se va a encapsular en una solución al 2% de etilcelulosa en ciclohexano a 80°C. A continuación se procede al enfriamiento gradual, bajo agitación, de la solución hasta temperatura ambiente, lo que provoca la insolubilización o separación del polímero en forma de una fase líquida y su deposición alrededor de las partículas del material que se va a encapsular. A temperatura próxima a la ambiente, la cubierta se solidifica, obteniéndose las microcápsulas, que son recogidas por filtración o centrifugación y secadas (Jato, 2003).

### **Coacervación por adición de un “no solvente”**

En este procedimiento de microencapsulación, la separación de fases es inducida por la lenta adición de un “no solvente” sobre una solución del polímero formador de cubierta en un disolvente orgánico adecuado, que contiene el material que va a encapsularse en suspensión. A medida que se adiciona el “no solvente”, se provoca la insolubilización del polímero que se deposita alrededor de las partículas en suspensión. Al final del proceso, se añade un volumen elevado del “no solvente” con la finalidad de endurecer las microcápsulas (Jato, 2003).

### **Atrapamiento en liposomas.**

Un tipo de cápsula con más propiedades versátiles y menos fragilidad que aquellas hechas de grasa es el de los liposomas. Estos han sido empleados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el cuerpo, y consisten de una o más capas de lípidos no tóxicos y aceptables en alimentos; la permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad pueden variar con el tamaño y la composición del lípido. Los liposomas son vesículas que se forman cuando películas de fosfolípidos son dispersadas en un medio acuoso; al igual que las membranas naturales, los liposomas son selectivamente permeables a iones; los liposomas se forman cuando una solución acuosa de sustancia activa es mezclada con la película del lípido (Figura 3). Estructuralmente existen tres tipos de liposomas: multilamelar, vesículas de un compartimiento y macrovesículas. La sonicación permite la formación de un solo compartimiento de vesículas, mientras que las macrovesículas son formadas por inyección de soluciones de lípido en un buffer de fosfatos. Los liposomas pueden ser obtenidos con cargas positivas por la adición de aminos o con cargas negativas por la adición de fosfatidil serina o diacetil fosfato. Materiales hidrofílicos e hidrofóbicos pueden ser atrapados en liposomas; los compuestos hidrofílicos son disueltos en agua y mezclados con una película lipídica para formar liposomas, mientras que los materiales hidrofóbicos son embebidos en una delgada película de lípido. La liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la bicapa, por destrucción de la vesícula, por medio de una concentración crítica de iones calcio o por un cambio de pH. El colesterol y los tocoferoles pueden ser incorporados para reducir la permeabilidad de la membrana e incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa. Las sustancias activas solubles en agua presentan una mejor eficiencia de encapsulamiento que las hidrófobas; los liposomas son usados con éxito en la encapsulación de sistemas enzimáticos; sin embargo, el uso de disolventes orgánicos reduce su uso en aplicaciones en alimentos (Gorski, 1994; Hoch, 1997) (Cuadro 2).

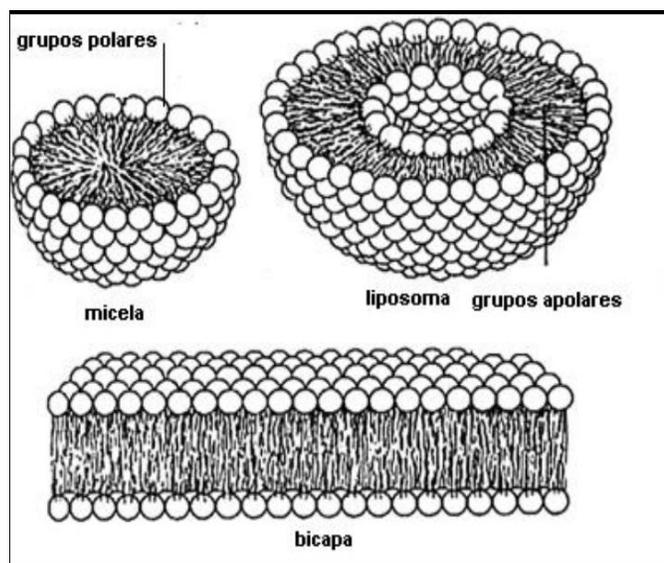


Figura 3. Atrapamiento de sustancias activas por liposomas  
(Fuente: Álvarez, 2003).

**Cuadro 2. Ingredientes encapsulados por atrapamiento en liposomas en alimentos.**

Saborizantes del tipo: especias, aceites, sazoadores y edulcorantes
Acidulantes, álcalis, buffers (Ac. ascórbico, cítrico, fumárico, bicarbonato)
Lípidos: Ac. Linoleico
Agentes redox (blanqueadores, maduradores)
Enzimas o microorganismos
Antioxidantes (Ac. ascórbico, cítrico)
Colorantes

**Gelificación iónica.**

Es un proceso que se desarrolló para inmovilizar células, donde se utiliza principalmente alginato como componente de la membrana y la combinación con iones divalentes como el calcio o bario, para inducir la gelificación. En esta interacción tiene lugar un entrecruzamiento iónico divalente entre los iones de calcio y las unidades de ácido gulurónico del alginato, dando lugar a un gel conocido como “modelo de caja de huevo” (Figura 4). Estequiométricamente se requiere de 7.2% de Calcio (basado en el peso del alginato de sodio) para una sustitución incompleta, sin embargo con sólo 2.2% de calcio se logra la gelificación. Al entrar en contacto con los iones calcio, el alginato forma un gel instantáneamente. Los iones se siguen difundiendo en el alginato, logrando que el gel se vaya endureciendo con el tiempo y formando los gránulos. Cabe mencionar que es posible manipular la dureza de los gránulos modificando las condiciones de elaboración (pH, concentración de iones, concentración de alginato, etc.) (King, 1988). Los geles de alginato/calcio son permeables a moléculas solubles en agua cuyos pesos moleculares sean menores de 5 kDa. Moléculas mayores también pueden difundir a través del gel, pero si el peso molecular excede los 10 kDa, la difusión no ocurre.

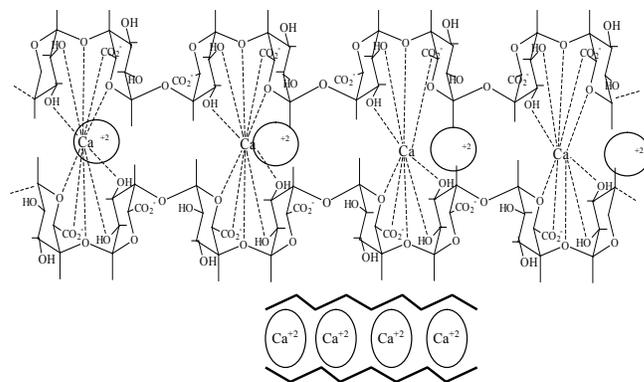


Figura 4. Conformación tipo caja de huevos de la estructura del alginato con iones divalentes (Belitz y Grosch, 1992).

Los gránulos de alginato presentan la ventaja de no ser tóxicos por vía oral y de poseer una elevada biocompatibilidad (Park y col., 1993; Kibat y col., 1990). Otra propiedad ventajosa es su incapacidad para abrirse en entornos ácidos mientras que si lo hacen con facilidad en entornos alcalinos, de modo que los fármacos sensibles al ácido que se incorporen a los gránulos estarán protegidos ante los jugos gástricos. Por lo tanto, el alginato se emplea como una matriz de captura para las células y enzimas, así como para aditivos nutraceuticos y alimentarios (Yotsuyanagi y col., 1987).

**Métodos de liberación.**

Los mecanismos de liberación de las cápsulas se pueden llevar a cabo por una disolución normal en agua, por esfuerzos de cizalla, por temperatura, por reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. La liberación de componentes de una cápsula puede ser controlada por difusión de la matriz de la cápsula o por una membrana que cubre la matriz. La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad del componente de la matriz de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. El compuesto que va a difundir debe ser soluble en la matriz; aunque la presión de vapor de sustancias volátiles en cada lado de la matriz puede ser la fuerza que determine la difusión. La selección de una matriz o membrana es importante; la naturaleza química, morfología y temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento también influyen en la difusión de la membrana aunque pueden disminuir la velocidad de liberación (Yáñez y col., 2002).

**Aplicaciones de la microencapsulación en la industria.**

Las aplicaciones de esta técnica han ido incrementándose en la industria de los alimentos debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. Esta técnica puede mejorar la esta-

bilidad de medicamentos y sabor. En la encapsulación de sabores, se reduce su volatilidad o previene reacciones indeseables con otros componentes del alimento aun cuando se almacene por un periodo prolongado. Cuando se encapsula un sabor, para que sea liberado rápida y efectivamente en la boca, se recomienda utilizar materiales solubles en agua como almidones y dextrinas; en el caso de encapsulación de vitaminas, minerales y otros nutrientes, éstos son liberados después de haberse consumido. Como la liberación se lleva a cabo en el estómago o el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas; los agentes encapsulantes usados para esta aplicación son de naturaleza hidrofóbica como grasas y ceras, pero también se pueden usar derivados de celulosa. El transporte selectivo de un agente terapéutico al sitio de acción puede optimizar la respuesta biológica o la liberación de una molécula activa dentro del medio ambiente seleccionado (Yáñez y col., 2002; AITEX, 2003). En alimentos las microcápsulas se aplican para encapsular aromas, sabores, colores, sustancias nutracéuticas, probióticos entre muchas otras aplicaciones en esta industria y se emplean en panadería, industria de bebidas, jugos, yogurt, lácteos entre otros (Yáñez y col., 2002). La microencapsulación en el sector textil es realmente alta, pudiéndose obtener tejidos ampliamente funcionales, con características hasta ahora impensables, características derivadas de la naturaleza de los agentes contenidos en el núcleo de las microcápsulas, las cuales pueden contener, entre otros: perfumes, productos terapéuticos y cosméticos, bactericidas, repelentes antimosquitos, acaricidas, combinaciones de ingredientes (perfume + bactericida), pigmentos, agentes resistentes al fuego, agentes para la protección a las radiaciones UV y materiales de cambio de fase (PCM) para la adaptación al clima (AITEX, 2003).

## Conclusión.

El desarrollo en las técnicas de microencapsulación ha ido en aumento ya que existe mucha demanda para el control y liberación de ingredientes o microorganismos en alimentos y fármacos y el potencial para nuevas aplicaciones es amplia, por lo que es conveniente que los estudios de las condiciones y materiales para la encapsulación continúen. En particular, la coacervación se vislumbra como una promesa en esta técnica debido a sus bajos costos de proceso y a que sus sustancias encapsuladas (sabores) son más estables aun cuando se utilicen dentro de alimentos que requieran tratamientos térmicos como calentamiento, microondas y freído. Por otro lado, las mezclas de almidones y maltodextrinas como materiales encapsulantes pueden proporcionar grandes beneficios, ya que debido a su solubilidad pueden emplearse en la mayoría de procesos físicos de encapsulación. La gelificación iónica puede ser una opción adecuada cuando la sustancia activa es sensible a cambios bruscos de temperatura como el caso de proteínas o nutracéuticos.

En el caso de bacterias ácido lácticas o productos fermentados el método más indicado de encapsulación es la polimerización interfacial ya que ayuda a la productividad fermentativa de la misma. En vacunas o sustancias muy delicadas como enzimas el método más empleado es el atrapamiento por liposomas.

## Referencias Bibliográficas

- AITEX "Asociación de Investigación de la Industria Textil", 2003. Microencapsulación "nuevas capacidades para los tejidos tradicionales" Revista de análisis de la industria textil. Review. Publicada en junio de 2003. Pp 14-15.
- Yáñez, F.J., Salazar, J.A. Montoya, Chaires Martínez, L., Hernández, J.J., Márquez, M. Robles y Ramos Ramírez, E.G. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avance y Perspectiva vol. 21.
- Hoch, G.J. 1997. Whey to go. Food Processing. 58: 51-52.
- Jackson, L.S. y Lee, K., 1991. Microencapsulation in the food industry gums. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 24: 289-297.
- Jato, V.J.L. 2003. Aspectos Fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Tecnología Farmacéutica. Vol. 2. Síntesis, D.L, Madrid España.
- Kibat, P.G., Igari, Y., Wheatley, M.A., Eisen, H.N. y Laoger, R. 1990. Enzymatically Activated Microencapsulated Liposomes can Provide Pulsative Drug Release. FASEB J; 4: 2533-2539.
- Onwulata C., Smith, P.W., Craig, J.R. y Holsinger, V.H. 1994. Physical Properties of Encapsulated Spray-Dried Milkfat. J. Food Sci. 59 (2): 316-320.
- Park, P.G., Shalaby, W.S.W., Park, H., 1993. Chapter 5. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. Tech. Lancaster; pp 99-140.
- Pedroza-Islas, R., 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre, Cancún, Quintana Roo, México. 438-447.
- Qi, Z.H. y Romberger, M.L. 1998. Cyclodextrins. Food Sci. Tech. (New York). 87: 207-225.
- Ré. M. I. 1998. Microencapsulation by Spray Drying. Drying Tech. 16(6): 1195-1236.
- Rosenberg, M. y Young, S.L. 1993. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. Food Struct. 12: 31-42.
- Yotsuyanagi, T., Ohkubo, T., Ohhashi, T. y Ikeda, K. 1987. Calcium-Induced Gelation of Alginate Acid and Ph-Sensitive Reswelling of Dried Gels. Chem. Pharm. Bull. 35: 1555-1563.
- Fanger, G.O. 1974. Microencapsulation: A brief history and introduction. In: Vandergaer, J.E.(Ed.), Mi-

croencapsulation processes and applications, New York, NY: Plenum Press, pp. 1-20.

King, A. 1988. Flavor Encapsulation with Alginates. En: Flavor Encapsulation (ed. por S. Risch and G. Reineccius), ACS Symposium Series 370, Am. Chem. Soc. pp. 122-125

Gorski, D. 1994. Nutraceuticals with food. ingredient potential. Dairy Foods, 96(1):78.

Pszczola, D.E. 1998. Encapsulated ingredients: providing the right fit. Food Tech. 52(12): 70-77.

Risch, S.J. y Reineccius, G.A. 1998. Flavor Encapsulation. Amer. Chem. Soc., Washington.

Belitz, H. y Grosch, W. 1992. Química de los Alimentos. 2a Edición. Editorial Acriba. S.A. Zaragoza España. pp 271-361.

# USO DE UNA PLATAFORMA DE EDUCACIÓN EN LÍNEA COMO COMPLEMENTO DIDÁCTICO DE UN CURSO PRESENCIAL DE FÍSICA PARA ESTUDIANTES DE INGENIERÍA QUÍMICA.

M. Rodríguez-Martín, M. Chan-Pavón y A. Medina-Lara

## RESUMEN:

La plataforma de educación en línea (DOKEOS) que emplea la Universidad Autónoma de Yucatán para el nivel licenciatura proporciona un complemento para contribuir a los métodos didácticos empleados por sus profesores. Sin embargo, no hay evidencias de su utilidad, de su efectividad ni de su grado de aceptación por sus usuarios. El objetivo de esta investigación fue comparar el método tradicional de enseñanza con el método Blended Learning en un curso de Física de primer semestre de la carrera de Ingeniería Química Industrial. El diseño gira alrededor de seis ejes fundamentales que se tienen que considerar para la selección y uso de tecnologías orientadas a la educación en línea: a) transmisión y acceso, b) control, c) interacción, d) características simbólicas del medio, e) la presencia social creada a través del medio y f) la interfaz entre el usuario y la máquina. Asimismo, se describen los resultados sobre el grado de satisfacción de los participantes respecto a la estructura y diseño del curso, los cuales se obtuvieron mediante cuestionarios de opinión y entrevistas semiestructuradas. Los participantes resaltaron la facilidad de "navegar" por el curso, así como la comunicación efectiva lograda entre todos los participantes, al utilizar las herramientas de la plataforma

Uno de los mecanismos utilizados para la evaluación de las ventajas o desventajas del uso de la plataforma como apoyo didáctico fue la comparación de los resultados de los exámenes que se aplicaron a un grupo testigo y un grupo experimental. Ambos grupos cursaron simultáneamente la asignatura Física I que contempla temas de Electricidad y Magnetismo, Óptica y fundamentos de Física Moderna. En el grupo testigo se aplicaron las herramientas de la enseñanza tradicional presencial. En el grupo experimental, además de las clases presenciales y las correspondientes de laboratorio, se les dio acceso a la plataforma en particular al curso creado, el cual fue administrado y construido "ad hoc" para la asignatura, cuyo contenido abarca todo el temario, incluyendo la teoría fundamental, lecturas complementarias, ejercicios interactivos, ligas a otras páginas de Física, problemas resueltos, problemas propuestos y autoevaluaciones.

**Palabras clave:** Curso en línea, Internet, Dokeos, Plataforma, B-Learning

Facultad de Ingeniería Química. Periférico Nte. Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn, Mérida, Yuc., Méx. C. P. 97203. Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. e-mail: mmartin@uady.mx

## Introducción

El auge, desarrollo, flexibilidad y accesibilidad de las Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC) han favorecido su casi omnipresencia en todas las actividades del quehacer humano. Ello ha generado una gran expectativa sobre el valor potencial que tales recursos podrían agregar al mejoramiento de la calidad de la actividad empresarial, académico-científica, sociocultural y, en general, a la calidad de vida de la población.

En el caso de la educación superior han surgido algunas alternativas para su mejoramiento, tales como el enfoque del *B-Learning*, el cual puede ser entendido como la combinación apropiada entre ciertas acciones instruccionales típicas de la modalidad presencial y algunas actividades propias de los entornos virtuales (e-actividades), centrada en el estudiante, con el propósito de ofrecer una mayor flexibilidad al aprendiz y, de esa manera, favorecer los resultados del aprendizaje y la satisfacción con dicho proceso.

En el presente estudio se evalúa la efectividad y calidad del *B-Learning*, en el contexto de un curso semestral de Física, correspondiente al período académico Sept.2007-Feb.2008 del primer semestre de la licenciatura en Ingeniería Química Industrial en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, México En tal sentido, se propusieron los objetivos siguientes:

1. Determinar el nivel de desempeño académico de los participantes, según la apreciación del profesor y de los propios estudiantes.
2. Obtener información relevante de los estudiantes acerca del diseño, organización y funcionamiento del curso con el fin de evaluar la calidad del mismo.
3. Examinar el nivel de satisfacción de los estudiantes con el curso, a partir del análisis del logro de los objetivos instruccionales y el cumplimiento de las expectativas de aprendizaje.
4. Conocer la opinión de los participantes sobre la efectividad del Blended Learning (B-Learning) como modalidad instruccional.

## Metodología

En el estudio participaron 70 estudiantes (con una edad promedio de 18 años) de la asignatura Física I cuyo contenido abarca temas de Electricidad, Magnetismo, Óptica y Fundamentos de Física Moderna. Los estudiantes estaban divididos en dos grupos, G1 y G2, cada uno de 35 alumnos. Ambos grupos cubrieron los contenidos de la asignatura de manera simultánea, presentaron los mismos exámenes (4 parciales) y desarrollaron los mismos trabajos de investigación y de resolución de problemas. La calificación mínima aprobatoria fué de 70 puntos sobre 100. Se consideró como grupo experimental para la aplicación de B-Learning al grupo G1 y el grupo G2 fue el grupo de control, en donde se aplicaron las estrategias de enseñanza tradicionales de las clases presenciales.

Los instrumentos utilizados para recabar la información sobre el cur-

so se señalan a continuación. Se analizaron las siguientes matrices de desempeño académico:

a. Matriz AE: Constó de los resultados de los exámenes parciales para cada estudiante del grupo experimental.

b. Matriz AC: Constó de los resultados de los exámenes parciales para cada estudiante del grupo de control.

Las anteriores matrices sirvieron para analizar y comparar el desempeño académico entre los estudiantes de cada grupo entre sí, tratando de detectar si el desempeño del grupo en general tendía a ser homogéneo

c. MATRIZ B: Constó de los resultados de los exámenes parciales por grupo. Esta matriz sirvió para comparar los resultados entre el grupo experimental y el de control.

d. MATRIZ C: Constó de los promedios de las calificaciones obtenidas en cada trabajo realizado en los dos grupos.

El cuestionario de autoevaluación, que se contestó de manera anónima en ambos grupos, constó de diez preguntas abiertas en donde los estudiantes respondieron preguntas relacionadas con su propia percepción acerca del aprendizaje obtenido en los temas de los que consta el programa de Física I.

El cuestionario de opinión acerca de la efectividad del B-Learning, únicamente fue aplicado a los alumnos del grupo experimental, y fueron diez preguntas relacionadas con el interés, la atención y el tiempo que se dedicó a la asignatura usando esta modalidad de aprendizaje.

La actividad académica se desarrolló durante 15 semanas, con dos sesiones, de dos horas cada una, por semana. El grupo experimental G1, tuvo las sesiones teóricas, las clases de problemas y las prácticas de laboratorio correspondientes al programa. Para éste grupo se creó, además, una página web utilizando la plataforma DOKEOS. En la figura 1 se puede ver la interfaz de usuario del Sitio de Educación en Línea de la Facultad.

Figura 1. Sitio de la Plataforma de Educación en Línea DOKEOS de la Facultad de Ingeniería Química de la UADY.

En esta plataforma se encuentra el curso de FISI-CA I completo como se puede observar en la figura 2 la interfaz del usuario, organizado de la siguiente manera, mediante la activación de las siguientes herramientas:

**DOCUMENTOS** en la cual el profesor puede subir diversos tipos de archivos (HTML, Word, Powerpoint, Excel, Acrobat, Flash, Quicktime, etc.). Los documentos se presentan en pantalla por orden alfabético, aquí el alumno pudo encontrar toda la teoría del curso, desarrollada objetivo por objetivo de acuerdo al programa de la asignatura, además de lecturas complementarias.

**ENLACES** esta herramienta permite crear enlaces, clasificados por categoría a sitios de interés relacionados con el curso, aquí el alumno pudo consultar sitios o páginas con los mismos temas en otras páginas de Física, ejercicios y problemas resueltos, propuestos (con resultados)

**EJERCICIOS** esta herramienta permite crear ejercicios o evaluaciones de elección múltiple (con respuesta única), elección múltiple (con respuestas múltiples), relacionar, de completar o rellenar espacios en blanco, una vez definidos los reactivos los cuales se almacenan en un banco de preguntas que tiene el curso. Aquí el alumno encontró ejercicios y problemas para cada tema y adicionalmente se diseñaron además cuatro AUTOEVALUACIONES, una para cada examen parcial aplicado durante el curso, que eran calificadas en línea.

**AGENDA** esta herramienta permite estructurar por día, mes, año, hora, duración y nombre cada una de las actividades a desarrollar, desplegándolas en orden cronológico, también se pueden añadir recursos como documentos, enlaces, ejercicios, etc., en esta sección el alumno tuvo disponible las actividades a realizar con anticipación para cada fecha de sesión de clase adjuntando toda la información a tratar, además de las tareas y ejercicios a cubrir.

**TABLON DE ANUNCIOS** es una herramienta que permite tener una comunicación constante con el alumno, ya que a través de esta se pueden dejar avisos y recordatorios de los eventos importantes del curso a todos los alumnos inscritos al curso o a un alumno en particular con copia al correo electrónico de cada estudiante.

**BUZON DE TAREAS** esta herramienta muestra los archivos que le los alumnos han enviado (la carpeta de entrada) y los archivos que el profesor ha enviado a otros miembros del curso (la carpeta de salida). Si envías un archivo con el mismo nombre dos veces, puede sobrescribir la versión antigua. Como alumno se puede enviar archivos al profesor del curso, a no ser que el administrador permita el envío de archivos entre estudiantes. Las tareas del Grupo experimental fueron recibidas en línea mediante esta herramienta.

**FORO** mediante esta herramienta de debate asíncrono se procuró la comunicación entre los estudiantes mismos y con el profesor, que a diferencia del correo electrónico que permite un diálogo uno a uno, este permite un diálogo público o semipúblico. Esta herramienta permite crear temas de discusión los cuales fueron creados sobre los temas tratados en la asignatura y sobre las dificultades que tenían en ellos.

**CHAT** esta herramienta permite la comunicación en tiempo real del profesor con los estudiantes en línea y también permite guardar el texto de las sesiones de chat, aquí los estudiantes tuvieron acceso a sesiones de trabajo sincronizadas para discutir algún aspecto concreto mediante el diálogo o bien para responder a dudas sobre alguno de los temas tratados y sus dificultades.

**ITINERARIO FORMATIVO** esta herramienta tiene dos funciones:

- Construir la ruta de aprendizaje (Learning path)
- Subir rutas de aprendizaje en formato SCORM ("Modelo de agregación de contenidos", en un aprendizaje basado en Web y un entorno de ejecución para objetos de aprendizaje). También se puede subir en formato IMS (basado en e-Learning en formato XML)

Se creó un itinerario para cada unidad del programa de la asignatura, se les colocaron PRE-REQUISITOS, de modo que no pudieran acceder a un tema sin haber cubierto el o los prerrequisitos del mismo.

**ESTADÍSTICAS** se mantuvo un control semanal mediante esta herramienta del uso del general del sitio del curso por alumno, verificando cuáles de las herramientas utilizaban con mas frecuencia.

Al grupo de control G2 no se le dio acceso al curso en línea. Estos estudiantes tuvieron las mismas clases presenciales, de problemas y prácticas de laboratorio que los del grupo G1. Tuvieron acceso al material teórico y a todos los problemarios en forma impresa y disponible para ser fotocopiada. Se les proporcionó la información de los enlaces interesantes para el curso en Internet (los mismos enlaces que se adjuntaron a la página del curso) y entregaron sus tareas e investigaciones en papel. Las autoevaluaciones de la página Web, con las respectivas respuestas correctas, les fueron entregadas una semana antes de cada examen parcial.

Los exámenes parciales fueron aplicados de manera simultánea a ambos grupos.

### Técnica de Análisis de Datos

Se utilizó estadística descriptiva para analizar la información recabada y hacer comparaciones entre el grupo experimental y el grupo de control. Se compararon desviaciones estándar para detectar diferencias significativas en los resultados de ambos grupos.

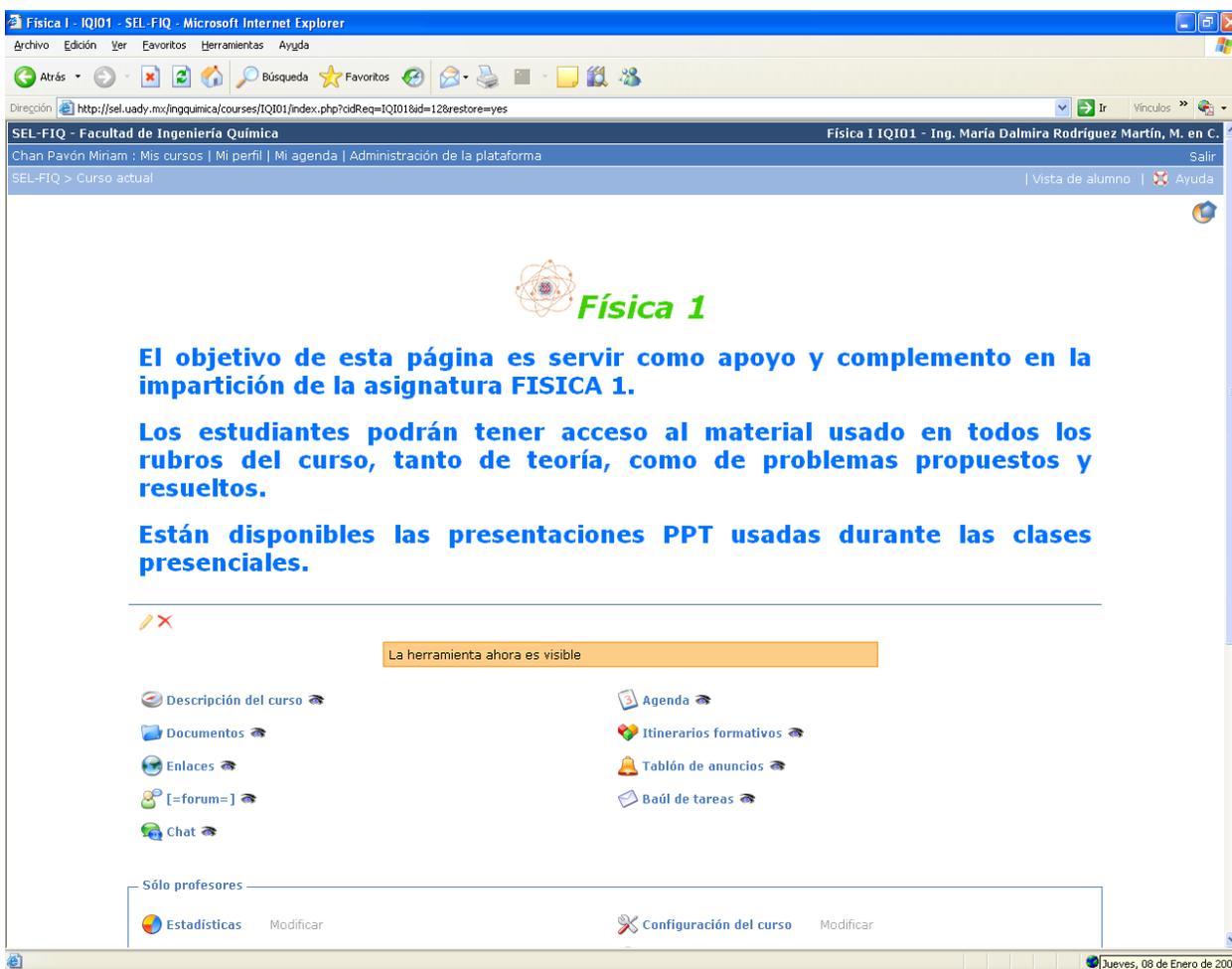


Figura 2. Interfaz del usuario del Curso Física I en la plataforma DOKEOS

## Resultados

En esta sección se describen los resultados más importantes del estudio, los cuales han sido organizados tomando en cuenta los objetivos del mismo.

### Desempeño Académico

La calificación promedio fue de 9 sobre 10 ( $s = 0,695$ ). Esta información fue consistente con las respuestas obtenidas en el cuestionario de auto-evaluación.

### Evaluación de la Percepción de la Calidad del Curso

Las dimensiones incluidas en la escala fueron: contenido de la asignatura, actividades de aprendizaje, tecnología instruccional, desempeño del profesor, organización del curso y evaluación del aprendizaje; mientras que los criterios utilizados fueron: actualidad, relevancia, accesibilidad, calidad, eficiencia y equidad, respectivamente. El estándar utilizado fue de 80 % para cada dimensión y para la escala total. Todos los criterios superaron el estándar establecido.

### Satisfacción con el Aprendizaje y con el Curso

El 73,07 % de los participantes expresó que se sintió “*completamente satisfecho*” con el aprendizaje logrado; un 23,07 % señaló que estaba “*satisfecho*” y el 3,86 % informó estar “*medianamente satisfecho*”.

### Efectividad del B-Learning

El 80,78 % de los participantes se pronunció por la modalidad del **Blended Learning**; mientras que el 15,38 % prefirió la actividad presencial y apenas el 3,84 % seleccionó la modalidad online.

### Discusión

Los resultados principales del estudio se pueden agrupar en cuatro categorías, a saber: (a) el alto desempeño académico de los participantes; (b) la percepción positiva de la calidad del curso; (c) el alto nivel de satisfacción logrado por los estudiantes con la experiencia de aprendizaje; y (d) la opinión favorable de los participantes sobre el *Blended Learning* como modalidad instruccional.

En relación con el primer aspecto, el resultado obtenido es coincidente con estudios previos en los que

se ha utilizado la modalidad instruccional del *B-Learning*, como ha sido reportado por autores tales como Hinch (2007) y Zhao, Lei, Lai y Tan. (2005). Sin embargo, aún cuando no está claro todavía en la literatura cuál es la fundamentación teórica que permite explicar tales resultados, se podría hipotetizar que los mismos están relacionados con la flexibilidad de la modalidad instruccional semipresencial (*B-Learning*) para adecuarse a las necesidades de cada estudiante.

El segundo aspecto se refiere a la percepción positiva de la calidad del curso por parte de los estudiantes. Este resultado era esperable si se toma en cuenta que los componentes del diseño instruccional tienen un efecto motivacional en el participante, lo cual coadyuva al logro de los resultados de aprendizaje (Ausubel, Novak y Hanesian, 2005).

El tercer resultado se refiere al alto nivel de satisfacción logrado por los estudiantes con la experiencia de aprendizaje. Estos resultados son consistentes con las respuestas emitidas por los participantes en las diferentes dimensiones de la escala sobre percepción de la calidad del curso y con la distribución de las respuestas sobre la evaluación general del mismo. Resultados similares han sido reportados por Black (2002).

El cuarto resultado se refiere a la alta efectividad del B-Learning, percibida por los participantes. Estos hallazgos son consistentes con los reportados en investigaciones previas, como lo confirman los estudios de Yildirim (2005).

## Conclusión

Se concluye que el *B-Learning*, en el contexto de este estudio de caso, es una modalidad instruccional preferida por los estudiantes en comparación con la opción online y la enseñanza tradicional de tipo presencial. Los estudiantes valoraron la importancia de la estrategia de aprendizaje colaborativo utilizada como parte del diseño instruccional y las actividades de aprendizaje centradas en proyectos, lo cual les permitió asumir el proceso de aprendizaje con bastante independencia y un alto grado de participación.

## Referencias Bibliográficas

Ausubel, D. P., Novak, J. D., Y Hanesian, H. (2005): *Psicología educativa*. Un enfoque cognoscitivo. México, Editorial Trillas.

Bericat, E. (1998): *La integración de los métodos cuantitativo y cualitativo en la investigación social*. Barcelona (España), Editorial Ariel.

Black, G. (2002): A comparison of traditional, online, and hybrid methods of course delivery. *Journal of Business Administration Online*, 1(1). Disponible en: <http://jbao.atu.edu/Journals/black.htm>. Consulta realizada el 30-09-07.

Cebrián, M. (2003): Innovar con tecnologías aplicadas a la docencia universitaria. En CEBRIÁN M.

(coord.). Enseñanza virtual para la innovación universitaria. Madrid, Editorial Nancea, 21-36.

Delialioglu, D., Y Yildirim, Z. (2007): Students' perceptions on effective dimensions of interactive learning in a blended learning environment. *Educational Technology and Society*, 10 (2), 133-146.

Hinch, P. (2007): Can blending face to face teaching with e-learning support the development of apprentices in mathematics. *Scottish Online Journal of e-Learning*, 1(1), 2-14. Disponible en: [www.sojel.co.uk](http://www.sojel.co.uk). Consulta realizada el 20-07-07.

Jeong So, H. (s/f): Students' satisfaction in a b-learning course: A qualitative approach focusing on critical factors. Disponible en: [http://eduweb.nie.edu.sg/isl/events/AERA2006\\_proceeding2\\_DrSo.pdf](http://eduweb.nie.edu.sg/isl/events/AERA2006_proceeding2_DrSo.pdf). Consulta realizada el 25-08-07.

Monguet, J. M., Fábregas, J. J., Delgado, D., Grimón, F., Y Herrera, M. (2006): Efecto del b-learning sobre el rendimiento y la motivación de los estudiantes. *Revista Interciencia*, 31 (3), 190-196.

Zapata, G.A., Y Reyes, C.W., (2004). Manual para profesores de la Plataforma para cursos en Línea. (Adaptado y adecuado del manual del profesor CLAROLINE del CeDeTE). Facultad de Educación-UADY. Yucatán, México.

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La Revista de la FIQ es una revista multidisciplinaria de difusión científica y tecnológica que considera para publicación trabajos originales y revisiones en cualquier área de la ciencia o la tecnología. Los ARTÍCULOS describen un estudio completo y definitivo. Una NOTA un proyecto completo, pero más corto, que se refiere a hallazgos originales o importantes modificaciones de técnicas ya descritas. Un ENSAYO trata aspectos relacionados con la ciencia pero no está basado en resultados experimentales originales. Una REVISION es un artículo que comenta la literatura más reciente sobre un tema especializado. La sección AVANCES DE INVESTIGACIÓN esta dirigida a comunicaciones cortas de resultados que requieran una publicación rápida. Las secciones EDITORIAL y OPINION están abiertas a toda la comunidad científica.

Los trabajos deberán ser enviados a Av. Juárez No. 421 Ciudad Industrial, Mérida, Yucatán México, Facultad de Ingeniería Química o al correo electrónico revista@fiq.uady.mx. La aceptación de los trabajos esta basada en el contenido técnico-científico y sobre la presentación del material de acuerdo a las normas editoriales de la revista. Se aceptarán trabajos escritos en español. Todos los artículos deben tener un resumen.

Someter un trabajo a publicación implica que el mismo no ha sido publicado ni ha sido enviado en revistas de impacto similar. Se publican preferentemente artículos inéditos; sin embargo podrán ser considerados también, los artículos que hayan sido presentados en congresos, seminarios, o convenciones, siempre y cuando cumplan con los lineamientos. Los autores deben enviar una copia del texto aceptado y corregido en formato electrónico con su correspondiente medio de almacenamiento y una copia impresa indicando el lugar exacto de los Cuadros y Figuras.

Los trabajos que se publican en la Revista de la FIQ deberán contener los componentes que a continuación se indican, empezando cada uno de ellos en página aparte: Página del título, Resumen en español, Texto, Agradecimientos, Literatura citada, Cuadros y Figuras

**PÁGINA DEL TÍTULO.** Debe contener a) el título del trabajo, que debe ser conciso pero informativo; b) nombre(s) y apellidos de cada autor, acompañados de su afiliación institucional; c) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; d) declaraciones de descargo de responsabilidades, si las hay; e) nombre y dirección del autor y correo electrónico a quien deben dirigirse las solicitudes de separatas, y f) origen del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo y otros.

**RESUMEN EN ESPAÑOL.** Los artículos de difusión científica y notas de investigación deberán incluir un resumen que no pase de 250 palabras. Se indicarán los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos y la metodología empleada; los resultados más importantes encontrados, y de ser posible, su significación estadística y las conclusiones principales. A continuación del resumen, en punto y aparte, agregue debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indicadores a clasificar el trabajo, las cuales se publicarán junto con el resumen.

**TEXTO.** Las tres categorías de trabajos que se publican en la revista de la FIQ consisten en lo siguiente:

a) **ARTICULOS CIENTÍFICOS.** Deben ser informes de trabajos originales derivados de resultados parciales o finales de investigaciones. El texto del Artículo científico se divide en secciones que llevan estos encabezados:

Introducción

Materiales y Métodos

Resultados y discusión

Conclusiones o implicaciones

En los artículos que así lo requieran puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas divisiones a fin de hacer más claro el contenido, sobre todo en las secciones de Resultados y Discusión, las cuales pueden presentarse como una sola sección.

b) **NOTAS DE INVESTIGACIÓN.** Deben ser breves, pueden consistir en modificaciones a técnicas, informes de casos de interés especial, preliminares de trabajos o estudios en desarrollo; así como resultados de investigación que a juicio de los editores deban así ser publicados. El texto contendrá la misma información del método experimental señalado en el inciso a), pero su redacción será corrida del principio al final del trabajo; esto no quiere decir que sólo se supriman los subtítulos, sino que se redacte en forma continua y coherente.

c) **REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS.** Consisten en el tratamiento y exposición de un tema o tópico relevante, actual e importante. Su finalidad es la de resumir, analizar y discutir, así como poner a disposición del lector información ya publicada sobre un tema específico. El texto se divide en: Introducción, (las secciones que correspondan al desarrollo del tema en cuestión) y Discusión.

**AGRADECIMIENTOS.** Siempre que corresponda, se deben especificar las colaboraciones que necesitan ser reconocidas, tales como a) la ayuda técnica recibida; b) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; c) las relaciones financieras que pudieran suscitar un conflicto de intereses. Las personas que colaboraron pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo:

---

“Asesor científico”, “revisión crítica de la propuesta para el estudio”, “recolección de datos”, etc.

**LITERATURA CITADA.** Las referencias a trabajos publicados deberán ser indicadas en el lugar apropiado en el texto, empleando el apellido del autor (es) y el año de publicación. Sólo utilice dos apellidos como máximo. En caso de existir más de dos autores, utilice el apellido del primer autor seguido de la abreviación et al. Liste las referencias en riguroso orden alfabético por autor al final del texto y antes de las ilustraciones. Los títulos abreviados de las revistas periódicas deberán seguir el formato usado en el Chemical Abstracts.

Para algunos ejemplos de referenciación solicitar la presentación electrónica a la siguiente dirección electrónica revista@fiq.uady.mx.

**CUADROS, GRÁFICAS E ILUSTRACIONES.** Es preferible que sean pocos, concisos, contando con los datos necesarios para que sean autosuficientes, que se entiendan por sí mismos sin necesidad de leer el texto. Se presentarán uno en cada hoja. Para las notas al pie se deberán utilizar los símbolos convencionales.

**VERSIÓN FINAL.** Es el documento en el cual los autores ya integraron las correcciones y modificaciones indicadas por el Comité Revisor. Se deberá entregar un solo original en hojas blancas, así como en un medio de almacenamiento. Los trabajos deberán ser elaborados con el procesador de texto de su preferencia en formato rtf. Las gráficas y figuras se deberán entregar como imagen en formato tiff por separado con una resolución mínima de 150 dpi.

Los trabajos no aceptados para su publicación se regresarán al autor, con un anexo en el que se explicarán los motivos por los que se rechaza o las modificaciones que deberán hacerse para ser reevaluados.

**UNIDADES.** Deberán ser expresadas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana: NOM-008-SCFI-2002.

Cualquier otra abreviatura se pondrá entre paréntesis inmediatamente después de la(s) palabra(s) completa(s).

Los nombres científicos y otras locuciones latinas se deben escribir en cursivas.

Algunos Ejemplos Formato de Referencias:

**Libro**

Autor/editor (año de publicación). Título del libro (edición) (volumen). Lugar de publicación: editor o casa publicadora.

Ejemplo: Selltiz, C., Jahoda, M., Deutsch, M. y Cook, S. W. (1976). Métodos de investigación en las relaciones sociales (8a. ed.). Madrid: Rialp.

**Artículo o capítulo dentro de un libro editado**

Autor/editor (año de publicación). Título del artículo o capítulo. En Título de la obra (números de páginas) (edición) (volumen). Lugar de publicación: editor o casa publicadora.

Ejemplo: Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (1998). Recolección de los datos. En Metodología de la investigación (pp. 233-339). México: McGraw-Hill.

**Artículo en un libro de congreso:**

Marsh, S. (1994). Optimism and pesimism in trust. En Iberamia 94. IV Congreso de Inteligencia Artificial (Comp.) (pp. 286-297). Caracas: McGraw-Hill.

**Artículo de revista científica**

Autor (año de publicación). Título del artículo. Título de la revista, volumen (número de la edición), números de páginas.

Ejemplo: Parra, R. E. y González, A. (1994). Magnetismo en aleaciones metálicas diluidas. CIENCIA, 3(2), 67-74.

**Documentos electrónicos, bases de datos y programas de computadoras**

Autor/responsable (fecha de publicación). Título (edición), [tipo de medio]. Lugar de publicación: editor. Disponible en: especifique la vía [fecha de acceso].

Ejemplo: Hernández, M. E. (1998). Parque Nacional Canaima, [en línea]. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Disponible en: <http://cenamb.rect.ucv.ve/siamaz/dicciona/canaima/canaima2.htm> [2000, 3 de junio].

El editor en jefe revisará los trabajos recibidos y aquellos trabajos que no cumplan con el formato solicitado no serán enviados a revisión de texto hasta que no cumplan con el mismo. El comité editorial revisará el contenido del trabajo y determinará la aceptación del mismo de acuerdo con los lineamientos de la revista. Cuando así lo requieran se solicitarán modificaciones a la forma de la presentación y se harán sugerencias al fondo del contenido. Los autores revisarán estas sugerencias y en caso de considerar que son pertinentes, harán las correcciones necesarias y enviarán el trabajo corregido. en caso de considerar que las sugerencias no son pertinentes, los autores enviaran por escrito los comentarios y la justificación por la cual no consideran hacer las correcciones y quedará a juicio del comité editorial la aceptación del trabajo. el contenido de los trabajos es responsabilidad de los autores.

