

CONTRIBUCIÓN AL CONCEPTO DE ACTIVIDAD DEL AGUA (a_w) Y SU APLICACIÓN EN LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS EN LATINOAMÉRICA Y VENEZUELA

CONTRIBUTION TO THE CONCEPT OF WATER ACTIVITY (a_w) AND ITS APPLICATION IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY IN LATIN AMERICA AND VENEZUELA

María Soledad Tapia ()*

RESUMEN

La actividad del agua (a_w) es una propiedad termodinámica esencial en ciencia y tecnología de alimentos. Se presenta el enfoque del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UCV para la comprensión del concepto, sus fundamentos y uso práctico en Venezuela y América Latina. La a_w es de los parámetros más eficientes para explicar las relaciones del agua con los microorganismos, pues gobierna en gran medida las respuestas microbiológicas en los alimentos. Esto fue investigado en diversos contextos: diseño de medios de cultivo para detección/enumeración de hongos osmotolerantes/xerófilos en alimentos de a_w reducida, determinación de valores mínimos de a_w para crecimiento microbiano, medición instrumental y predicción de a_w en sistemas alimentarios. Adicionalmente, se investigó la conservación de frutas tropicales de humedad intermedia y extensión del concepto a productos de alta humedad con proceso mínimo y aplicación de la tecnología de obstáculos o *hurdles* con uso de varios factores de preservación.

ABSTRACT

Water activity (a_w) is a thermodynamic property recognized essential in food science and technology. This work presents the approach followed in the Institute of Food Science and Technology, UCV, for understanding the concept, its fundamentals and practical use in Venezuela and Latin America. Water activity is one of the most efficient parameters to explain the relations of water in microorganisms since it largely governs microbiological responses in food. This was investigated in various contexts: detection and enumeration of osmotolerant and xerophilic fungi in foods of reduced a_w , determination of minimum a_w values for microbial growth, instrumental measurement of a_w and prediction of a_w in food systems. Additionally, the preservation of intermediate moisture tropical fruits was investigated, leading to the extension to high moisture products minimally processed by "hurdle technology", through the use of various preservation factors.

Palabras clave: Actividad de agua (a_w), tecnología de obstáculos, medición de a_w , predicción de a_w , frutas de humedad intermedia, métodos combinados de preservación de alimento, proceso mínimo.

Keywords: Water activity (a_w), hurdle technology, a_w measurement, a_w prediction, intermediate moisture fruits, combined methods of food preservation, minimal processing of fruits.

1. Introducción

La influencia de la actividad de agua (a_w) en la calidad y estabilidad de los alimentos comenzó a recibir una atención considerable a principios de 1950 en razón de las inconsistentes interrelaciones empíricas observadas entre el contenido de humedad y la estabilidad del producto. Los microbiólogos estuvieron entre los primeros en reconocer que la a_w , antes que el contenido total de humedad, controlaba el crecimiento

microbiano, la muerte, la sobrevivencia, la esporulación y la producción de toxinas de diversos microorganismos. Entre 1970 y 1980, el interés se orientó a evaluar la influencia de la a_w sobre el crecimiento microbiano bajo condiciones distintas de temperatura, pH y a_w . Los principales aspectos en relación al concepto de actividad de agua en la microbiología de los alimentos fueron revisados por López-Malo *et al.* [1] y se discuten a continuación.

(*) Trabajo de Ingreso como Miembro Correspondiente a la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales (ACFIMAN). Caracas, abril 2020.

1.1 Definición de actividad del agua

La actividad es un amplio concepto termodinámico definido como una relación de fugacidades de fases que están en equilibrio en un sistema cerrado a temperatura constante. Para una comprensión adecuada del concepto se requiere una revisión de fisicoquímica y termodinámica básica y aplicada [2]. Para simplificar: sea el caso del agua, con la fase líquida y la de vapor en equilibrio, donde la fugacidad está relacionada a la presión de vapor a través del coeficiente de fugacidad. Si la fase condensada (líquida o sólida) está en equilibrio con su fase de vapor, el potencial químico de la fase condensada es igual al del vapor, y por lo tanto su fugacidad es igual a la fugacidad del vapor. Esta fugacidad es aproximadamente igual a la presión de vapor cuando esta última es baja y si se considera el comportamiento del vapor, como el de un gas ideal. Entonces la razón de fugacidades puede reemplazarse por la razón de presiones de vapor de agua [3] y la actividad del agua será expresada como

$$a_w = P_w / P_w^0 = \text{HRE} / 100 \quad (1)$$

donde P_w es la presión parcial de vapor de la fase condensada: solución acuosa o alimento, P_w^0 es la presión de vapor parcial del agua pura a la misma temperatura, y HRE es la humedad relativa del aire en equilibrio con la solución o alimento. Por lo tanto, la presión de vapor del agua en equilibrio con la solución o alimento puede ser medida o relacionada con la HRE del medio ambiente que le rodea. La actividad del agua: a_w es una variable adimensional que solo está definida para un sistema en equilibrio y su valor es aplicable únicamente en condiciones específicas de temperatura y presión. Los valores de a_w van desde 1 para agua pura, a 0, para un producto en el que toda el agua está termodinámicamente ligada a los sólidos del alimento. Sin embargo, esos valores extremos no se presentan en sistemas reales. Los alimentos frescos tienen valor de a_w cercanos a 0,98-0,99 mientras que los alimentos deshidratados presentan valores de esta propiedad comprendidos entre 0,2 y 0,4. La a_w mide entonces la disponibilidad de agua en un producto, para que actúe como reactante, solvente, humectante, nutriente, etc.

Muchos sistemas multicomponentes como los alimentos, constituidos por dos o más fases (sólida, líquida, acuosa, y aceite), no presentan equilibrio entre una fase y la otra [4]. El método más usual para describir teóricamente las propiedades del agua en estos sistemas es la obtención de las isoterms de sorción de agua, que relacionan, a una temperatura constante, el contenido de humedad en equilibrio con la actividad del agua en el producto, en un intervalo dado de humedad. En el equilibrio, las presiones de vapor del producto y del aire que le rodea son iguales a una temperatura determinada. Las isoterms de sorción tienen significados en conceptos básicos

(determinación de la humedad de máxima estabilidad o de monocapa, entalpías de adsorción-desorción, condiciones de humedad y temperatura para cambios de fase, etc.), y también son utilizables con fines prácticos, como la predicción del tiempo de secado, la vida útil de un producto deshidratado, cambios en la estabilidad del alimento dependiendo de su composición, selección de materiales de empaque y condiciones de manejo y almacenamiento de alimentos.

Las isoterms son características para cada producto, y se pueden obtener ya sea a través de procesos de humidificación (adsorción) o deshumidificación (desorción). Estos dos procesos opuestos pueden no ser reversibles, generando diferencias en las isoterms de adsorción y desorción, lo que está ligado con el fenómeno denominado *histéresis*. Franks [5] propuso que la presencia de histéresis en las isoterms de sorción (Figura 1) puede implicar que los procesos de sorción de humedad en los alimentos no sean reversibles. En el caso del agua en los alimentos, se puede considerar que se trata de un pseudoequilibrio. Si se presenta el fenómeno de histéresis, al utilizar el término a_w , debe ser aclarado si dicho valor se ha obtenido en un proceso de desorción (deshumidificación, secado) o de adsorción (humidificación).

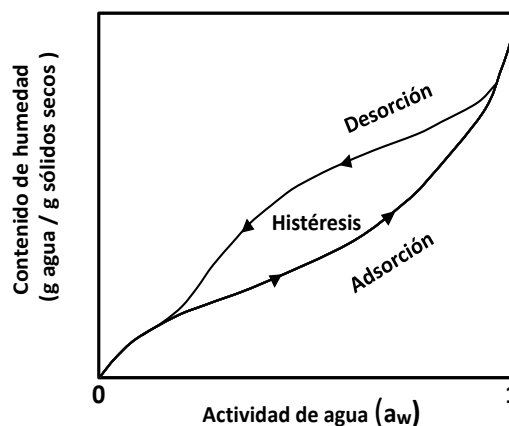


Figura 1. Una isoterma de sorción típica mostrando histéresis

1.2 Actividad del agua como indicador de inocuidad microbiológica y vida útil

La influencia del contenido de agua en la perecibilidad de un producto se conoce desde tiempos inmemoriales. Prácticamente, cada cultura primitiva encontró una forma conveniente de reducir el contenido de agua hasta un nivel al que podía proteger sus alimentos contra el deterioro microbiano (ej. secado, salado, adición de azúcares, procesos de concentración). Sin embargo, el fracaso ocasional de estas técnicas de preservación produjo resultados predecibles: los productos salados se teñían de rojo debido al desarrollo de bacterias halófilas, los productos preservados con azúcar

eran atacados ocasionalmente por levaduras osmofílicas, y los productos deshidratados eran atacados a menudo por mohos xerófilos [6]. Se descubrió también que el bajo contenido de agua de un alimento no definía completamente su estabilidad microbiológica, porque la leche en polvo podía deteriorarse rápidamente aun cuando su contenido de agua era alrededor de 12 %, mientras que los cereales podían permanecer en perfecto estado hasta 14 % de humedad y las frutas deshidratadas inclusive a 18 %. Un mejor enfoque cuantitativo para definir la influencia del agua en la respuesta microbiológica en los alimentos fue introducido por Scott [7] con el concepto de a_w .

Considerando la a_w y su relación con la estabilidad microbiológica, los valores mínimos de a_w que permiten el crecimiento a diferentes tipos de microorganismos son de una enorme importancia. La **Tabla 1** presenta el intervalo de a_w en el cual se puede presentar o inhibir el deterioro microbiano de los alimentos con la clasificación de los microorganismos como osmosensibles y osmotolerantes. Corry [8], Beuchat [9,10] y Gould [11] produjeron extensas tablas con valores de a_w mínimos para el crecimiento y producción de toxinas de muchos microorganismos patógenos y deteriorativos. La **Tabla 2** muestra a_w mínimos para patógenos bacterianos que crecen en alimentos, así como su pH y temperatura óptimos de crecimiento. Con la excepción de *Staphylococcus aureus*, para el cual se requiere una a_w de 0,86 para impedir su crecimiento en condiciones anaeróbicas, el desarrollo de todos los demás patógenos puede inhibirse mediante una reducción de la a_w hasta aproximadamente 0,92. Los principales hallazgos de Corry, Beuchat y Gould [8-11] pueden resumirse de la siguiente manera:

- Para $0,90 < a_w < 0,92$ la mayoría de las bacterias patógenas generalmente son inhibidas, excepto *Staphylococcus aureus*, el cual puede crecer a una a_w de 0,86.
- La a_w mínima para el crecimiento es siempre igual o menor que la a_w mínima para la producción de toxina.
- La a_w mínima para el crecimiento depende del soluto empleado para controlar la a_w , lo que se conoce como “efecto soluto”.

Es así como la actividad del agua es un factor principal que gobierna las respuestas microbiológicas en los alimentos. El concepto de a_w ha sido aplicado exitosamente a las relaciones del agua con los microorganismos, porque generalmente los valores medidos y el sustrato en el que están inmersos se correlacionan con el potencial para el crecimiento y actividad metabólica. La combinación de la a_w del alimento y su pH determinan frecuentemente si puede ocurrir crecimiento bacteriano o fúngico y el tipo de especies que se desarrolla, con efecto también de la temperatura, la atmósfera gaseosa,

Tabla 1. Actividad del agua y deterioro microbiano de los alimentos

Intervalo de a_w	Microorganismos inhibidos	Ejemplos de alimentos
1,00-0,95	Algunas levaduras, bacilos Gram negativos, esporas bacterianas	Alimentos con 40 % de sacarosa o 7 % de sal
0,95-0,91	Mayoría de cocos, lactobacilos, células vegetativas de bacilos, algunos mohos	Alimentos con 50 % de sacarosa o 12 % de sal
0,94	Crecimiento y producción de toxinas por todos los tipos de <i>Clostridium botulinum</i>	Carnes empacadas bajo condiciones anaeróbicas
0,91-0,87	Mayoría de las levaduras	Alimentos con 65 % de sacarosa o 15 % de sal
0,87-0,80	<i>Staphylococcus aureus</i> , mayoría de los mohos	Harina, arroz, etc., con 15-17 % de agua
0,86	Crecimiento aeróbico de <i>S. aureus</i>	Setas
0,80-0,75	Mayoría de las bacterias halofílicas	Alimentos con 26 % de sal
0,75-0,65	Mohos xerófilos	Alimentos con menos de 10 % de agua
0,68	Límite práctico para mohos	
0,65-0,60	Levaduras osmofílicas	Productos de confitería. frutas con 15-20 % de agua

Tomada de López-Malo *et al.*, [1]

Tabla 2. Actividad de agua (a_w) mínima (sin especificar soluto depresor) para el crecimiento de patógenos bacterianos de alimentos, en condiciones óptimas de pH y temperatura

Bacteria	a_w
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,990
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,970
<i>Clostridium botulinum</i> E	0,965
<i>Clostridium botulinum</i> G	0,965
<i>Shigella</i> spp.	0,960
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,960
<i>Clostridium perfringens</i>	0,945
<i>Clostridium botulinum</i> A & B	0,940
<i>Salmonella</i> spp.	0,940
<i>Escherichia coli</i>	0,935
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,932
<i>Bacillus cereus</i>	0,930
<i>Staphylococcus aureus</i> (anaeróbico)	0,910
<i>Staphylococcus aureus</i> (aeróbico)	0,860

Tomada de López-Malo *et al.* [1].

el potencial redox, el contenido de nutrientes del sustrato, el estado físico, la presencia de sustancias antimicrobianas y otros preservantes químicos [12].

La flora predominante de un alimento particular puede

ser determinada por los valores de a_w y la interacción entre a_w y pH puede llegar a establecer los límites de crecimiento y de inhibición. Aunque las bacterias son los principales microorganismos de deterioro a altos valores de pH ($> 4,6$) y a_w (0,980-0,999), las levaduras y mohos dominarán cuando el pH está por debajo de 4,0. En alimentos de a_w alta con pH por debajo de 4,0, tales como jugos de frutas y yogurt, las levaduras, lo mismo que algunas bacterias ácidolácticas, son probablemente los microorganismos dominantes. Algunos hongos filamentosos igualmente compiten bien en ambientes de alta a_w - bajo pH. La mayoría de las levaduras y mohos que causan deterioro son mohos no xerófilos que crecen adecuadamente a $a_w > 0,99$, pero también a valores de a_w menores de 0,90. En ambientes ricos en azúcar, en los cuales las bacterias no parecieran adaptarse, las levaduras y los mohos predominarán como los principales agentes deteriorativos. Sin embargo, en alimentos como carne, con pH cercano a 7,0 y alta a_w , dominarán las bacterias, aunque no sean capaces de crecer a a_w por debajo de 0,95. Las bacterias raramente ocasionan deterioro en alimentos con valores de a_w por debajo de 0,85, aunque las salmueras y alimentos salados pueden ser descompuestos por bacterias halófilas moderadas o extremas [12].

El concepto de a_w ha ayudado a predecir el inicio del daño e identificar los peligros microbiológicos que puedan existir en los alimentos [13]. Sin embargo, la a_w de un medio no es el único factor determinante al considerar el deterioro de los alimentos ya que intervienen otros factores como pH, temperatura, potencial redox, etc., que regulan la respuesta metabólica de un microorganismo. La naturaleza del soluto que controla la a_w en lo que se conoce como efecto soluto, puede jugar también un papel relevante [14].

Consecuentemente, el concepto de la a_w en los alimentos como un determinante de crecimiento microbiano ha estado en constante revisión [13]. La presencia de efectos solutos específicos a partir de diversos solutos puso en cuestionamiento el papel de la a_w como una medida creíble de la viabilidad fisiológica de los microorganismos, debido a que dicho efecto puede conducir a una predicción errónea del crecimiento microbiano sobre la base de valores medidos de a_w si no se considera la naturaleza y efecto químico que puede ejercer cada soluto a un mismo valor de a_w [9, 13].

Durante la década de 1980 recibió considerable atención el enfoque sobre los aspectos dinámicos de los sistemas de alimentos de humedad baja a intermedia que, como se mencionó previamente, no están en equilibrio termodinámico [13, 15]. Esta perspectiva que señala la importancia de mantener a los alimentos en estados vítreos cinéticamente metaestables, constreñidos dinámicamente, incorporó las

bases teóricas de los principios de la estructura fundamental y de las propiedades, desde el campo de la ciencia de polímeros sintéticos, que incluye los conceptos innovadores de la dinámica acuosa y dinámica vítrea, en lo que se ha llamado la ciencia de polímeros de alimentos [15].

En muchos alimentos y materiales biológicos, los sólidos se encuentran en estado amorfo metaestable, muy sensible a cambios en el contenido de humedad y temperatura [15]. Esta matriz amorfa puede existir bien como una estructura vítrea muy viscosa o una estructura gomosa más líquida. La temperatura característica (T_g), a la cual ocurre la transición del estado vítreo al gomoso sin cambio de humedad, ha sido propuesta como un parámetro fisicoquímico que puede determinar las propiedades del producto tales como estabilidad e inocuidad, mejor que la a_w [15]. Sin embargo, la aproximación de la ciencia de los polímeros de alimentos puede no representar una mejor alternativa al concepto de a_w como predictor de crecimiento microbiano en los alimentos, a pesar de las limitaciones del concepto de a_w y los posibles efectos de la situación de no equilibrio [13]. En la actualidad se reconoce que a_w y T_g son conceptos que deben considerarse conjuntamente y pueden ayudar para definir las condiciones de proceso y preservación de los alimentos.

1.3 Estrés osmótico y osmorregulación en microorganismos

Los cambios en la osmolalidad del medio en el caso de disminución de la a_w conducen a un flujo pasivo de agua desde el microorganismo a través de la membrana microbiana y como resultado se produce una pérdida de turgor. El mecanismo celular universal para contrarrestar la pérdida inicial que prosigue a un “shock” hiperosmótico, es la acumulación de soluto(s) citoplasmático(s) que aumenta(n) la presión osmótica interna, lo cual a su vez, puede restaurar el turgor [11,16]. Hay una gran variación en los tipos de solutos acumulados por distintos microorganismos (ej. cationes, amino e iminoácidos, aminos, aminos cuaternarios, polioles, azúcares), pero todos exhiben una serie de propiedades comunes, tales como ser “compatibles” fisiológicamente con los microorganismos que los producen, de modo tal que se mantiene la actividad de las enzimas citoplasmáticas aún a los bajos valores de a_w que generan estos solutos internos. Este comportamiento difiere cuando las células se enfrentan a valores similares de a_w , pero generados por otro tipo de solutos, como son aquellos se encuentran comúnmente en los alimentos, por ejemplo, cloruro de sodio.

El control del crecimiento microbiano en los alimentos por modificación de la a_w puede alcanzarse mediante dos estrategias diferentes:

1. Usar la a_w como el único factor de estrés y, por lo tanto, reducirla hasta valores muy bajos (ej. alimentos deshidratados de $a_w < 0,6$).
2. Usar otros factores de estrés como pH, temperatura, adición de conservantes, uso de radiación UV, etc., en combinación con una a_w baja. Este es el enfoque de obstáculos o “hurdles” que reduce la cantidad de energía disponible para la osmorregulación, ya que al aumentar el número de factores de estrés se incrementa el consumo de energía, se afecta la homeóstasis celular y se hace más difícil la sobrevivencia.

1.4 La actividad de agua en la detección y enumeración de microorganismos

No todos los factores ecológicos determinantes de la respuesta microbiana -incluidos los incorporados por el procesamiento- pueden ser considerados en el examen microbiológico de los alimentos. Como se discutió con anterioridad, tanto la a_w como el pH de los alimentos tienen una influencia de gran peso sobre el tipo de microflora capaz de colonizar y causar su deterioro o producir enfermedad en el consumidor. Estos son hechos que necesitan ser tomados en cuenta para el aislamiento y enumeración confiables de los microorganismos presentes que sean de interés.

En bacteriología existen relativamente pocos usos de medios de a_w reducida basados en cloruro de sodio. Esta sal es un importante componente de caldos de enriquecimiento selectivo y de medios de cultivo en placas, los cuales son usados para detectar y enumerar bacterias que requieren sal o son tolerantes a ella, tales como especies de *Vibrio*, que necesitan para su crecimiento óptimo una concentración de NaCl no inferior al 1 %.

En el caso de los hongos (mohos y levaduras), la mayoría de los hongos no xerófilos que causan deterioro en alimentos de alta humedad pueden detectarse sin consideraciones especiales en medios microbiológicos generales, tales como agar papa dextrosa (PDA) acidificado, agar extracto de malta, agar diclorán rosa de bengala y cloranfenicol (DRBC) [17]. De mayor relevancia es la consideración de la a_w del producto en alimentos de humedad intermedia y baja, como son siropes, productos de confitería, concentrados de fruta, miel, frutas secas, pescado y carne salados y deshidratados, granos, legumbres, nueces, especias. Estos productos tienen una microflora característica que está determinada por factores tales como a_w , tipos de solutos presentes (azúcar o sal), y condiciones de almacenamiento como temperatura, concentración de CO_2 , y disponibilidad de oxígeno [12]. Muchas especies fúngicas requieren medios de a_w reducida y no pueden crecer a valores de a_w de 0,99 y, por lo tanto,

pueden no detectarse o subestimarse con métodos y medios tradicionales como, por ejemplo, el medio de contaje general en agar papa dextrosa (PDA) acidificado, agar extracto de malta, o DRBC [18].

Los hongos xerófilos que se han descrito por ser capaces de crecer a a_w menores de 0,85 incluyen levaduras osmofílicas y mohos filamentosos xerófilos: *Debaryomyces hansenii*, *Zigosaccaromyces bailli*, y *Z. rouxii* entre las levaduras, y muchas especies de *Aspergillus*, (xerófilos moderados): la serie de *A. restrictus* y *A. glaucus* o *Eurotium*) y *Penicillium*, lo mismo que *Chrysosporium*, *Eremascus*, *Paecilomyces*, *Wallemia*, *Xeromyces*, *Basipetospora*, *Polypaecylum*, *Geomyces* y *Monascus*. Entre los xerófilos fastidiosos extremos, aquellos mohos que además de requerir una a_w reducida, para crecer son nutricionalmente muy exigentes, es decir, recuperar esos mohos en el laboratorio requiere de medios de cultivo diseñados a la medida. Estos son: *Chrysosporium faninicola*, *C. fastidium*, *C. inops*, *C. xerophilium*, *remascus albus*, *E. fertilis*, y *Xeromyces bisporum*, *Basipetospora halophila* y *Polypaecylum pisce*, que son mohos halofílicos. La incompatibilidad de los medios con alta a_w para soportar el crecimiento de hongos xerófilos se magnifica cuando los alimentos investigados contienen sustancias inhibitorias químicas o factores de estrés adicionales de naturaleza física que afecta la habilidad de las células para crecer en los medios de enumeración [18].

Entre los medios comunes para la detección o enumeración de hongos en alimentos de humedad intermedia y baja está el agar diclorán glicerol 18 (DG18) (a_w 0,95; pH 6,5), desarrollado por Hocking y Pitt [17] para la enumeración de mohos xerófilos moderados en sustratos como los granos, harinas, nueces, y especias. La presencia de diclorán en este medio restringe el crecimiento de especies mucoráceas, tales como *Eurotium* spp, que tienden a extenderse sobre las placas y opacar el crecimiento, detección y recuperación de xerófilos de crecimiento más lento, aunque esta recuperación se logra en todos menos en los xerófilos extremos (que solo pueden crecer a valores muy bajos de a_w). Para resolver este problema, se ha investigado la adición de compuestos químicos no tóxicos (Tritón X-301 o iprodina) al DG18 para mejorar el contaje de colonias formadas por el número máximo de propágulos viables de mohos xerófilos moderados, presentes en alimentos de humedad baja e intermedia. DRBC y DG18 se recomiendan como medios de propósito general para el aislamiento y enumeración que discriminan entre alimentos dependiendo de sus valores de a_w ($> 0,90$); el DG18, por ejemplo, es menos apropiado para frutas y vegetales frescos que el DRBC.

Para analizar los alimentos de a_w baja, los principios básicos de selectividad son altas concentraciones de carbohidratos o de cloruro de sodio. Así, para enumerar mohos en harinas se

ha empleado ampliamente el Agar Malta Sal (MSA), pero ha sido reemplazado por el más eficiente DG18. Otros medios son Agar Triptona Ácido Cítrico Glucosa (50 GCT), pH (4,0) para enumerar levaduras tolerantes al azúcar en jugo de naranja concentrado, el Mosto Osmofílico de Scarr (SOW) para levaduras osmofílicas en productos de alto contenido de azúcar, una serie de agares Extracto de Malta Glucosa (MYG) con hasta 60 glucosa (a_w 0,85); Extracto de Malta Levadura 70 % Glucosa Fructosa (MY70GF), (a_w 0,76) para aislamiento de xerófilos extremos que pueden estar acompañados de *Eurotium* spp; y Agar Levadura Extracto de Malta Sal, 5 % sal, 12 % glucosa (a_w 0,96) [18].

Es importante conocer la composición y la historia del procesamiento y manejo de los alimentos de a_w reducida al seleccionar los métodos para el análisis microbiológico y particularmente el micológico [18], ya que la adaptación celular puede ocurrir a valores bajos de a_w y la tolerancia a esos niveles de a_w puede ganarse o perderse en presencia de distintas concentraciones de soluto. Por lo tanto, el estado de la adaptación celular microbiana afectará, por ejemplo en el caso de los mohos, su capacidad de formar colonias en diferentes medios de enumeración. Con respecto a los diluentes, agua peptonada (0,1 %) y buffers de potasio de 0,05 a 0,1 M son comunes para la enumeración general de mohos y levaduras. Los diluentes que contengan un soluto son recomendados para investigar mohos xerófilos en alimentos de humedad intermedia y baja, de modo de minimizar el choque osmótico a las células fúngicas al hacer las diluciones seriadas para sembrar en placas. Sin embargo, si las células están estresadas, el uso de diluentes con a_w reducida puede ser crítico. Se espera que la rehidratación de alimentos de a_w baja, antes de homogeneizar en el diluyente y de sembrar en placas, pueda mejorar la recuperación de células dañadas [18].

La selección de los solutos usados para alcanzar la a_w deseada en los diluentes y medios de enumeración depende del soluto principal que se encuentre en el alimento a ser analizado (sal o azúcar). Siguen necesiéndose nuevos medios que permitan una mejor y más rápida evaluación de los alimentos, con consideraciones de a_w .

1.5 Influencia de la actividad de agua en la muerte y sobrevivencia microbiana

Cuando un microorganismo es transferido a un nuevo ambiente sobrevivirá o morirá dependiendo de su habilidad de adaptación. Aparte de la presencia de nutrientes, los factores más importantes para el crecimiento y producción de toxinas son la temperatura, la a_w , el pH y el oxígeno. Las bases de la sobrevivencia y muerte de los microorganismos en términos de la a_w son complejas. Como se indicó antes, hay varios factores que, dependiendo del alimento, del proceso y de los tipos de microorganismos, pueden afectar la

relación sobrevivencia-muerte de los microorganismos: los *intrínsecos* (pH, concentración y tipo de nutrientes, potencial redox, contenido de humedad y a_w , agentes antimicrobianos naturales, estructura física y biológica de los alimentos o nutrientes) y los *extrínsecos* (temperatura de almacenamiento, humedad relativa del ambiente, presencia y concentración de gases como CO_2 y O_2).

El uso combinado de factores extrínsecos e intrínsecos junto a una disminución de la a_w es común en la industria de alimentos. Generalmente, en la medida en que se acerca al valor mínimo de la a_w para el crecimiento de un microorganismo, los cambios en el resto de factores ambientales tendrán un mayor impacto en la muerte o en la sobrevivencia microbiana.

Los efectos de la temperatura en la sobrevivencia de microorganismos están muy documentados; la resistencia térmica de las células vegetativas y de las esporas y cómo es influenciada por la a_w es probablemente una de las áreas estudiadas más extensivamente en términos de inactivación microbiana. En general, las células vegetativas y las esporas fúngicas son más resistentes en la medida en que la a_w en el medio de calentamiento se reduce.

El tipo de soluto empleado para ajustar la a_w hasta un valor determinado puede resultar en diferencias significativas en la resistencia térmica de un microorganismo dado. Los compuestos de peso molecular bajo, como el cloruro de sodio y el glicerol producen una disminución de la resistencia térmica de cepas de *Salmonella*, mientras que solutos de mayor peso molecular como la sacarosa, ejercen un efecto de mayor protección contra la inactivación térmica.

1.6 Medición de la actividad de agua

Los requisitos de los sistemas de aseguramiento de calidad en la industria de alimentos necesitan de métodos precisos, seguros y convenientes de medición de la a_w y esto es particularmente cierto para los alimentos en los cuales la a_w es un factor de control del crecimiento microbiano. Esta sección presenta algunos de los métodos disponibles que se emplean para medir la a_w en los alimentos [19,20,21].

1.6.1 Medición de la presión de vapor

Sobre la base de la definición de la a_w , esta se puede medir cuando un alimento se coloca bajo condiciones ambientales hasta que alcance condiciones de equilibrio (a temperatura controlada) con la atmósfera del entorno que se encuentra a una humedad relativa constante y conocida (**Tabla 3**). Dada la condición de equilibrio, la presión de vapor de la atmósfera -medida con un manómetro o transductor de presión- es igual a la a_w . La desventaja es que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es largo, lo cual hace a este método inadecuado para un análisis de rutina rápido.

Tabla 3. Humedad relativa generada por soluciones salinas saturadas

	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
Bromuro de litio	7,1	6,9	6,6	6,4	6,2
Hidróxido de sodio	-	9,6	8,9	8,2	7,6
Cloruro de litio	11,3	11,3	11,3	11,3	11,3
Acetato de potasio	23,5	23,5	23,0	22,5	22,0
Cloruro de magnesio	33,5	33,0	33,0	33,0	32,5
Carbonato de potasio	44,0	43,5	43,0	43,0	43,0
Bromuro de sodio	60,0	59,0	58,0	57,5	56,5
Cloruro de cobre	68,0	68,0	68,0	67,5	67,0
Ioduro de potasio	72,0	71,0	70,0	69,0	68,0
Cloruro de sodio	76,0	75,5	75,5	75,5	75,0
Sulfato de amonio	81,0	80,5	80,5	80,0	80,0
Cloruro de potasio	87,0	86,0	85,0	84,5	84,0
Benzoato de sodio	88,0	88,0	88,0	88,0	88,0
Nitrato de potasio	95,5	95,0	94,0	93,0	92,0
Sulfato de potasio	98,0	98,0	97,5	97,0	97,0

1.6.2 Depresión del punto de congelación

El efecto de la concentración de un soluto en soluciones acuosas sobre la propiedad coligativa depresión del punto de congelación puede determinarse con crioscopos, como los que se usan ampliamente en la industria láctea, y calcularse con la ecuación de Robinson y Stokes [3], la cual es válida para alimentos líquidos de $a_w > 0,97$, aunque su empleo ha sido también aceptado para valores menores de a_w hasta 0,80.

1.6.3 Higrómetro de punto de rocío

Este método, el cual puede utilizarse para medir un amplio espectro de a_w a diferentes temperaturas, está basado en la condensación de vapor de agua sobre la superficie de un espejo que es enfriado. Cuando la temperatura del espejo alcanza el punto de rocío, la condensación es detectada fotoeléctricamente en la atmósfera generada por la muestra bajo estudio y la temperatura medida se usa para encontrar la humedad relativa utilizando tablas de psicrometría. Los medidores de a_w basados en la técnica del espejo enfriado fueron, por mucho tiempo, los únicos que permitían hacer la medición de la a_w en solo unos minutos.

1.6.4 Termocupla psicrométrica

Este aparato mide la a_w tomando en cuenta la temperatura del bulbo húmedo, la cual es la que tendría un volumen de aire si fuese enfriado isoentálpicamente hasta saturación del aire a presión constante. La medición de a_w está basada en los valores de humedad relativa que se determina a partir del conocimiento de las temperaturas de bulbo seco y húmedo. La muestra se coloca dentro de una cámara en la cual se le permite que alcance el equilibrio con la atmósfera que lo rodea, dentro de la cámara está un termopar que es enfriado y sobre el cual se condensa el vapor de agua generado por la atmósfera misma y la muestra. Posteriormente se provoca la evaporación del agua

condensada sobre el termopar, la velocidad de evaporación se relaciona con la humedad relativa de la atmósfera en equilibrio con la muestra, a partir de dicha humedad el aparato directamente registra la a_w de la muestra.

1.6.5 Higrómetros eléctricos

El comportamiento de este higrómetro está basado en el uso de higosensores conformados por un cable eléctrico recubierto por una sal altamente higroscópica como el cloruro de litio. Cuando la sal absorbe el vapor de agua liberado por la muestra, se provoca un cambio en la conductancia del cable que se relaciona con la presión de vapor y la actividad de agua.

1.6.6 Higrómetro de filamento

Este instrumento de bajo costo usa una fibra sintética que se encoge cuando está expuesta a una humedad relativa alta. La modificación dimensional es registrada y relacionada a la a_w de la muestra. Este higrómetro se afecta de una manera muy importante por los cambios de temperatura y la presencia de volátiles. Tiene una baja sensibilidad, aunque es funcional dentro del rango de a_w de 0,700 - 0,965.

1.7 Predicción de actividad del agua

La predicción de la a_w en alimentos ha sido de gran relevancia durante los últimos años. En múltiples estudios se ha buscado generar modelos matemáticos simples que ayuden a dicha predicción, para su uso en el diseño de alimentos, aplicación en métodos de conservación, selección de condiciones de almacenamiento y manejo de alimentos, así como en la selección y diseño de materiales de empaque. Los estudios de Van den Berg y Bruin [4], Chirife [21] y Roa y Tapia [22] fueron pioneros en la presentación de una serie de análisis detallados sobre los procedimientos empleados tradicionalmente para calcular o predecir la a_w [1]. En estos estudios, se discutió la aplicabilidad de diversos modelos teóricos y empíricos, incluyendo ejemplos descriptivos.

1.8 Algunas consideraciones

Aun cuando hay restricciones y problemas asociados con el uso del parámetro de a_w en algunos alimentos, su cuantificación y predicción continúan siendo de gran utilidad en el diseño de procesos, en la formulación de alimentos, en la selección de las condiciones de almacenamiento de materias primas y de productos elaborados, en la determinación de la calidad y estabilidad de los alimentos, y en la vida útil de anaquel de alimentos almacenados bajo condiciones diversas de empaque, temperatura y humedad relativa. Es muy claro que la a_w desempeña un papel muy significativo en la sobrevivencia y muerte de los microorganismos en los alimentos. Es así como la a_w es factor importante en las respuestas microbianas, con implicaciones prácticas de gran

impacto en la industria de alimentos destinada a mejorar la estabilidad e inocuidad de los productos.

2. Actividad de agua como indicador de inocuidad microbiológica y vida útil

2.1 Algunas premisas de partida:

1. La actividad de agua es un factor de peso que rige las respuestas microbiológicas en los alimentos.
2. El concepto de a_w puede emplearse para explicar las relaciones del agua en los microorganismos, ya que los valores medidos y las características del sustrato en el que pueden o no proliferar generalmente se correlacionan con el potencial para el crecimiento y la actividad metabólica.
3. Las interacciones entre la a_w del alimento y otras propiedades intrínsecas de los mismos (pH, contenido de nutrientes, potencial de óxido reducción, disponibilidad del agua, presión osmótica, presencia de antimicrobianos naturales, etc.) y factores extrínsecos determinados por el procesamiento y el ambiente (temperatura, humedad, oxígeno, luz, preservantes químicos, empaque, etc.) gobiernan las respuestas microbianas expresadas como crecimiento o imposibilidad del mismo, el tipo de especies que se desarrollarán y la subsecuente actividad metabólica (producción de toxinas y de otros metabolitos).
4. Considerando la a_w y su relación con la estabilidad microbiológica, los valores de a_w mínimo que permiten el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos son de una enorme importancia. Muchos investigadores han generado un cúmulo de valores de a_w mínimos para el crecimiento y producción de toxinas de diversos microorganismos patógenos y deteriorativos.

2.2 Determinación de a_w mínimo para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*

Desde el trabajo pionero de Scott [23], quien estableció que el crecimiento bacteriano se correlacionaba con la a_w y no con el contenido de humedad, los requerimientos de agua de las bacterias patógenas, su respuesta a la a_w , -que puede determinar crecimiento, supervivencia o muerte-, los efectos de los solutos sobre esta respuesta, etc., han sido un importante tema de investigación, particularmente para microorganismo patógenos, tanto tradicionales como emergentes.

Listeria monocytogenes ha sido un patógeno muy investigado dado el número y severidad de los brotes de listeriosis humana registrados en diversas partes del mundo, que lamentablemente se mantienen hasta el presente como ha sido el ocurrido en España que durante el mes de agosto de 2019, las autoridades sanitarias de Andalucía notificaron un

severo brote de listeriosis asociado al consumo de un producto de carne de cerdo asada, condimentada en el procesamiento con sales y especias, empacada al vacío y comercializada bajo refrigeración. Las autoridades españolas notificaron el brote a la Organización Mundial de la Salud a través de la Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) el 20 de agosto de 2019 [24].

En nuestro laboratorio en el ICTA-UCV se investigaron dos cepas de *Listeria monocytogenes*, Scott A (serotipo 4b) y Brie 1 (serotipo 1b), en términos de los requisitos mínimos de a_w para su crecimiento a 4 y 30 °C, utilizando NaCl, glicerol y sacarosa como solutos de prueba. Ambas cepas fueron cultivadas en caldo tripticasa soya suplementado con glicerol (TSB), NaCl y sacarosa, como solutos depresores de actividad de agua. La a_w de cada medio fue ajustada mediante cálculos de predicción a valores de a_w que variaron de 0,86 a 0,99. Estos valores fueron seleccionados para cubrir el intervalo de a_w obtenidos con varios solutos registrados en la literatura como mínimos y óptimos para el crecimiento del patógeno, e incubados a las dos temperaturas 4 y 30 °C. A la fecha de realizar este trabajo, no se había publicado información que comparase la respuesta de crecimiento de *L. monocytogenes* a varias temperaturas y cómo era afectada por a_w reducidas empleando solutos distintos al NaCl.

Los resultados se presentan de modo resumido en la **Tabla 4**. Ambas cepas crecieron bien a 30 °C en caldo tripticasa soya (TSB), suplementado con glicerol, pero no crecieron en TSB suplementado con NaCl, ni con sacarosa a una a_w de 0,90. La sacarosa resultó más inhibitoria que el NaCl y el glicerol. La cepa Brie 1 fue menos tolerante a la sacarosa en comparación con la cepa Scott A a 4 y 30 °C. Los efectos de los tres solutos se magnificaron a 4 °C, donde la tolerancia a bajo a_w fue notablemente menor que a 30 °C. Los resultados confirmaron que el tipo de soluto y las condiciones osmóticas alteradas por el soluto afectan la capacidad de *Listeria monocytogenes* para crecer a 4 y 30 °C [25].

3. Estrés osmótico y osmorregulación en microorganismos

3.1 Premisas

El control del crecimiento microbiano en los alimentos por modificación de la a_w puede alcanzarse mediante dos estrategias diferentes:

- Usar la a_w como el único factor de estrés y, por lo tanto, reducirla hasta valores muy bajos (ej. alimentos deshidratados de $0,4 < a_w < 0,6$).
- Usar otros factores de estrés en combinación con una a_w baja en lo que se conoce como enfoque de obstáculos o *hurdles*, como son aumento de la acidez (p.ej. pH bajo), la adición de conservadores, el uso de temperaturas

Tabla 4. Crecimiento de *L. monocytogenes* en caldo Trypticasa Soya, a varios a_w ajustados con NaCl, Glicerol o Sacarosa [25]

a_w	<i>L. monocytogenes</i> Scott A incubada a 4 °C				<i>L. monocytogenes</i> Brie incubada a 30 °C			
	4 °C		30 °C		4 °C		30 °C	
	(PI)		(PI)		(PI)		(PI)	
	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴
NaCl	0,99	+	+	+	+	+	+	+
	0,98	+	+	+	+	+	+	+
	0,96	+	+	+	+	+	+	+
	0,95	+	+	+	+	+	+	+
	0,94	-	+	+	+	-	+	+
	0,93	-	-	+	+	-	-	+
	0,92	-	-	+	+	-	-	+
	0,90	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	0,96	+	+	+	+	+	+	+
	0,94	+	+	+	+	+	+	+
	0,93	+	+	+	+	+	+	+
	0,92	+	+	+	+	+	+	+
	0,91	-	-	+	+	-	-	+
	0,90	-	-	+	+	-	-	+
	0,89	-	-	-	-	-	-	-
	0,86	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	0,97	+	+	+	+	+	+	+
	0,96	+	+	+	+	+	+	+
	0,94	-	+	+	+	-	-	-
	0,93	-	+	+	+	-	-	-
	0,92	-	-	+	+	-	-	-
	0,91	-	-	-	-	-	-	-
	0,90	-	-	-	-	-	-	-
	0,88	-	-	-	-	-	-	-
0,86	-	-	-	-	-	-	-	

* El crecimiento (+) fue interpretado como desarrollo de turbidez o un incremento en población viable después de 20 días de incubación. (PI), Población inicial (log ufc/ml).

altas (escaldado) o bajas (refrigeración), la limitación de nutrientes, adición de flora competitiva como probióticos, etc., que reducen la cantidad de energía disponible en los microorganismos para la osmorregulación, ya que aumenta el consumo de energía requerida para la homeóstasis (mecanismo que mantiene y regula el equilibrio de las células, las cuales funcionan correctamente dentro de un intervalo estrecho de condiciones como temperatura, pH, concentraciones iónicas y accesibilidad a nutrientes, etc.). La homeóstasis se altera desde diversos flancos por los obstáculos empleados (ej. alimentos de humedad intermedia o alta).

3.2 Empleo del enfoque de obstáculos o hurdles

Este enfoque constituyó una línea de investigación en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la

Universidad Central de Venezuela. A continuación, los resultados:

3.2.1 Alimentos de humedad intermedia (AHI)

En los alimentos deshidratados ($0,4 < a_w < 0,6$; humedad $< 10\%$) la actividad del agua es su principal obstáculo contra la actividad de los microorganismos. Si bien en el Laboratorio de Frutas y Vegetales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) se trabajó en una primera etapa en el desarrollo de productos de fruta deshidratada con financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas¹, en este proyecto se incluyeron prioritariamente trabajos en el área de alimentos de humedad intermedia, particularmente de frutas de humedad intermedia, (a_w entre 0,65 y 0,90 y 10-50 % de humedad), en los cuales, la reducción de actividad del agua sigue siendo un factor importante para controlar las reacciones que comprometen su estabilidad e inocuidad, pero no se lleva el producto a niveles muy bajos de a_w , lo cual solo es posible si se potencia la depresión de a_w con el concurso de otros factores de conservación de acompañamiento, en la llamada tecnología de obstáculos o *hurdles*, no siendo necesario deshidratar los productos. El método hurdle ha sido muy exitoso como una forma de desarrollar nuevos productos, de mejor calidad, más plásticos, más húmedos y palatables, en la mejoría de alimentos tradicionales de humedad intermedia. Leistner [26] introdujo el concepto de obstáculo, o efecto de obstáculos para ilustrar el hecho de que, en la mayoría de los alimentos, una combinación inteligente de parámetros de conservación (obstáculos o *hurdles*) mejora la estabilidad e inocuidad microbiana final. Cada factor de conservación empleado es considerado un obstáculo que los microorganismos deben “saltar” para proseguir con su actividad metabólica en el sustrato. Cada “salto” representa un gasto energético considerable para el microorganismo. Mientras más saltos deba realizar, más se agota su energía para el crecimiento y metabolismo hasta que se inactiva o muere. En la **Figura 2** las líneas punteadas representan esquemáticamente estos saltos. En la medida en que se adicionan más factores de preservación, o se varían los niveles de los mismos, la respuesta microbiana variará tendiendo a ralentizarse o a extinguirse.

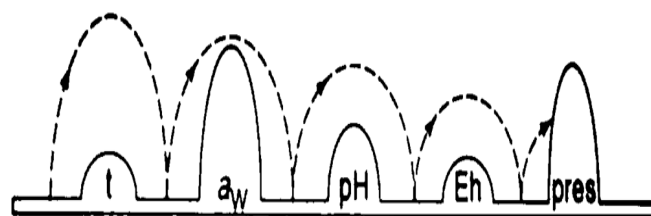


Figura 2. Representación gráfica del efecto de obstáculos o *hurdles* en alimentos. t, tratamiento térmico leve; a_w , actividad de agua; pH, acidez; Eh, potencial de óxido-reducción; pres, preservantes. (Tomado de [26])

1. Desarrollo de técnicas de preservación de frutas tropicales mediante descenso de su a_w . Proyecto CONICIT S1-1917, Caracas, Venezuela

Desde el punto de vista microbiológico, la conservación de alimentos consiste en exponer los microorganismos a un medio hostil (por ejemplo, a uno o más factores adversos) para prevenir o retardar su crecimiento, disminuir su supervivencia o causar su muerte. Ejemplos tradicionales de tales factores son la acidez (ej. pH bajo), la limitación de agua disponible para el crecimiento (ej. reducción de a_w), la presencia de conservadores, las temperaturas altas o bajas, la limitación de nutrientes. Los microorganismos han desarrollado distintos mecanismos para resistir los efectos de estos factores ambientales de estrés. Estos mecanismos, denominados «mecanismos homeostáticos», actúan para mantener relativamente sin cambio los parámetros y las actividades fisiológicas claves de los microorganismos, aun cuando el medio que rodea a la célula se haya modificado y por tanto, sea diferente [27].

Para ser efectivos los factores de conservación deben superar la resistencia microbiana homeostática. En el caso de microorganismos vegetativos, los mecanismos homeostáticos son energético-dependientes, pues la célula debe consumir energía para resistir a los factores de estrés, por ejemplo, para reparar los componentes dañados, sintetizar nuevos componentes celulares, etc. En el caso de las esporas, los mecanismos homeostáticos no consumen energía, ya que los mismos están incluidos en la estructura de la célula aún antes de que ésta sea expuesta a los diversos tipos de estrés ambiental. En la medida en que la industria de alimentos se ha modernizado, diseñando procesos basados en conceptos científicos, se han probado distintos obstáculos y se han incorporado como resultado de numerosas investigaciones. Algunos de los obstáculos investigados con éxito como nuevos antimicrobianos son: quitosano, ácidos orgánicos, bacteriocinas, aceites esenciales, empaque en atmósfera modificada, uso de películas comestibles como barreras externas y enzimas como lactoperoxidasa, entre otros. Igualmente, se ha estudiado nuevas tecnologías de descontaminación con obstáculos tales como calentamiento inductivo, microondas y radiofrecuencia, campo eléctrico pulsado, calentamiento óhmico, altas presiones hidrostáticas, luz pulsada, campo magnético de oscilación, descarga de arco de alto voltaje, ultrasonido, rayos X, luz ultravioleta, agua electrolizada (solución de ácido hipocloroso), entre otros [28, 29].

3.2.2 Alimentos de humedad intermedia tradicionales: línea de investigación en el ICTA-UCV

En razón de que los AHI forman parte de los patrones alimentarios tradicionales en todas las poblaciones del mundo, desde el ICTA-UCV nos incorporamos a un proyecto multinacional de cooperación (CYTED-D), puesto en marcha por los Ministerios de Ciencia de España y Portugal

y los consejos de investigación de gran parte de los países iberoamericanos para inventariar una serie de alimentos de AHI de España y de varios países de América Latina², como una manera de contribuir a identificar la relevancia del manejo del parámetro a_w en estos productos, así como demostrar que el enfoque de obstáculos, aunque aplicado de manera empírica, gobierna la estabilidad, inocuidad y calidad de esos productos. A cada producto se le determinó su composición química, su a_w por medición experimental y predicción sobre la base de los principales solutos depresores de a_w . Se recopiló información de 260 alimentos tradicionales de humedad intermedia. El estudio incluyó la determinación de las características fisicoquímicas (a_w experimental y predicha, pH, humedad, principales sólidos solubles responsables de la depresión de la a_w) y la identificación de obstáculos (*hurdles*): presencia de antimicrobianos, aplicación de tratamiento térmico durante el proceso o llenado en caliente, flora competitiva y requerimiento de refrigeración. Se incluyó información sobre la forma de consumo, condiciones de comercialización, aspectos tecnológicos y de calidad. Se identificaron los principales factores de preservación responsables de la estabilidad microbiana, así como el papel de los factores individuales en el sistema de preservación, y se evaluó si estos obstáculos eran aplicados correctamente y los productos eran susceptibles de deterioro o de soportar patógenos. A partir de los resultados obtenidos se generaron recomendaciones de cómo mejorar la calidad (reformulando productos), la inocuidad y la estabilidad de estos alimentos iberoamericanos [30, 31, 32, 33].

En la **Tabla 5** se presenta un extracto de la caracterización de algunos productos a base de frutas de humedad intermedia (seleccionados de los 260 inventariados que incluyen alimentos cárnicos y lácteos) tradicionales de varios países de América Latina, los obstáculos identificados y usados empíricamente en su procesamiento, y su nivel de relevancia en el sistema de preservación [30].

3.3 Frutas de humedad intermedia

Los productos de frutas de humedad intermedia (FHI) han sido muy populares y aún tienen mercados potenciales. Sin embargo, la aplicación de la tecnología de hurdle para producir productos estables a temperatura ambiente está limitada por la alta concentración de solutos necesarios para reducir la actividad de agua a niveles seguros. Esto generalmente afecta las propiedades sensoriales de los alimentos. Igualmente, el pH es relevante, y aunque las frutas son un buen ejemplo de alimentos que aceptan la reducción del pH sin afectar significativamente el sabor, solo puede llegar a un valor de pH tan bajo como lo permita la palatabilidad, alrededor o por debajo de pH 5.0.

2. Desarrollo de Alimentos de Humedad Intermedia Importantes para Iberoamérica” Proyecto Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTEDD. XII. V Centenario Encuentro entre Dos Mundos. 1988-1990. Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba, España, Nicaragua/Iberoamérica, México, Uruguay y Venezuela y Puerto Rico.

Tabla 5. Factores de preservación identificados en algunos productos de frutas analizados en varios países de Iberoamérica (Adaptado de [30])

Producto	País	Factor de preservación				Nivel de relevancia de barreras	
		a_w	pH	AM	V	MR	Secundario
Frutas confitadas:							
Papaya	Chile	0,75	4,6	No	No	a_w	pH, T
Calabaza	México	0,81-0,83	5,7-6,5	No	No	a_w	pH, T
Camote	México	0,75-0,85	5,3-6,6	No	No	a_w	pH, T
Chilacayote	México	0,70-0,85	5,6-7,0	No	No	a_w	pH, T
Naranja	México	0,81	5,3	No	No	a_w	pH, T
Piña	México	0,80-0,87	4,5-5,6	No	No	a_w	pH, T
Pera	México	0,81	5	No	No	a_w	pH, T
Camote	Venezuela	0,74	5	No	No	a_w	pH, T
Toronja	Venezuela	0,77	4,3	No	No	a_w	pH, T
Papaya	Venezuela	0,77	5	No	No	a_w	pH, T
Higo	Venezuela	0,73	4,5	No	No	a_w	pH, T
Mazapán de calabaza	México	0,83	6,4	BS	No	a_w	
Lima	México	0,66	4,2	No	No	a_w	pH, T
Frutas deshidratadas:							
Ciruela	Brasil	0,77	3,9	No	No	a_w	pH
Ciruela	Chile	0,7	4	BS.	No	a_w	AM, pH
Anacardo	Costa Rica	0,78	5,3	BS	No	a_w	AM, T, pH
Plátano	Costa Rica	0,62	5,1	No	No	a_w	No
Mermeladas de fruta:							
Ciruela	Argentina	0,82	3,2	No	Sí	a_w , pH	T
Ciruela	Uruguay	0,79	3,2	No	Sí	a_w , pH	T
Durazno	Argentina	0,83	3,1	No	Sí	a_w , pH	T
Durazno	Chile	0,87	3,3	BS	Sí	a_w , pH	T, AM
Durazno	México	0,83	3,2	BS	Sí	a_w , pH	T, AM
Fresa	Brasil	0,83	3,7	No	Sí	a_w , pH	T
Fresa	Chile	0,85	3,2	BS	Sí	a_w , pH	T, AM
Fresa	México	0,84	3,3-3,8	BS	Sí	a_w , pH	T, AM
Fresa	Venezuela	0,79	3,4	No	Sí	a_w , pH	T
Mango	Costa Rica	0,81	5	BS	Sí	a_w , pH	T, AM

T: tratamiento térmico. AM: antimicrobianos. BS: benzoato de sodio. V: vacío. MR: más relevante

Sin lugar a dudas, esto impone una limitación no solo en la microflora colonizadora, sino también en los alimentos, ya que el pH no se puede reducir en muchos productos sin alterar el sabor. A bajos valores de pH y de a_w , ciertas especies de levaduras y mohos, por ejemplo, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp, pueden tolerar altas concentraciones de soluto y, en consecuencia, presentar un riesgo para la estabilidad del FHI. Por ello, siempre se requieren preservantes. La extensa investigación realizada en India por el Dr. Jayaraman y su equipo [34] ha generado información importante sobre esta categoría de productos y los microorganismos que los colonizan.

En el ICTA-UCV, por ejemplo, se investigó la respuesta de una cepa de *Zygosaccharomyces rouxii* aislada de un AHI de papaya desarrollado en el laboratorio [35]. Esta cepa es el organismo más común de deterioro dentro de las levaduras osmotolerantes y un organismo bastante apropiado para estudios de reto microbiano. Se investigó: a) su a_w mínima de

crecimiento en caldo glicerol (47,6 %) - sacarosa (28,6 %) a pH 4,0. Los medios basales glicerol-sacarosa de a_w , 0,60; 0,62; 0,64; 0,66 y 0,68 fueron preparados a partir de la isoterma de trabajo del caldo basal (0,6-0,75 a_w , 25 °C), (Figura 3), mientras que los medios de a_w , 0,85 y 0,95 fueron preparados calculando la contribución de cada soluto no electrolito a la depresión de a_w del caldo de cultivo, las cuales se describen en la Sección 5 de este documento; y b) la respuesta a una combinación de factores de estrés: pH (4,0; 3,5 y 3,0), sorbato de potasio (0; 500; 1.000 y 1.500 ppm), y bisulfito de sodio (0; 100 y 150 ppm), preservantes empleados en la industria de frutas deshidratadas de humedad intermedia.

El medio de enumeración empleado fue Extracto de Levadura 50 % Glucosa (YES 50). Los tiempos investigados fueron 0,3; 6; 9; 12; 40; 60; 80; 120; 180; 240; 300; 420; 600 y 840 horas para los estudios de a_w , mínima de crecimiento y estimación de los tiempos de generación; y 0,3; 6; 12; 24; 48; 216 y 360 horas para los estudios de respuesta a los factores

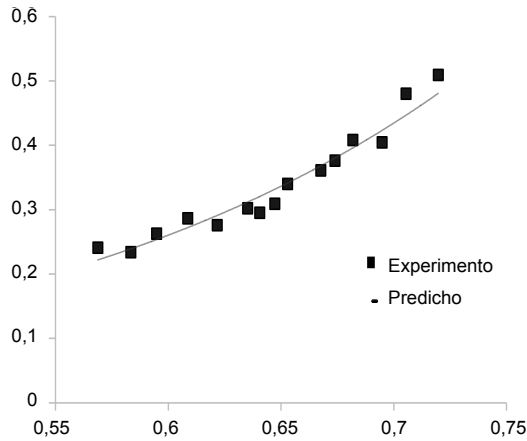


Figura 3. Isoterma de trabajo del caldo basal sacarosa:glicerol a 28°C. (■) valores experimentales; línea: valores predichos

de estrés. Los efectos de sorbato de potasio (SK) y de dióxido de azufre (SO_2) sobre el crecimiento de *Z. rouxii* expresado como $\log N/N_0$ o logaritmo del número de células N en un tiempo con respecto al logaritmo del número de células N_0 en el tiempo inicial, en medios de laboratorio se observan en la **Figura 4**. La adición de 500 ppm SK retardó el crecimiento especialmente durante las primeras 4 h. Al final del período de incubación en presencia de 500 ppm SK los contajes se hicieron muy altos ($p \leq 0,05$) acercándose a aquellos obtenidos sin SK, lo que sugiere una adaptación de la levadura al sorbato, lo cual fue comprobado al analizar y constatar los niveles de sorbato residual en el medio de crecimiento. El aumento a 1.000 ppm SK resultó en inhibición del crecimiento, mientras que con 1.500 ppm SK no hubo crecimiento (datos no presentados en la figura). La adición de 100 ppm SO_2 (en ausencia de SK), tuvo un marcado efecto en el crecimiento de la levadura, el cual se retrasó significativamente ($p \leq 0,05$) comparado con el

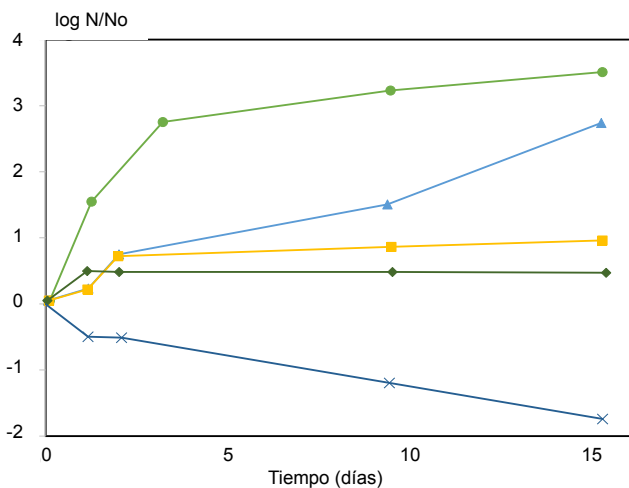


Figura 4. Efecto de los factores de estrés combinados (sorbato de potasio y dióxido de azufre) sobre el crecimiento de *Z. rouxii* en caldo sacarosa:glicerol. (●) 0 ppm de sorbato; (▲) 500 ppm de sorbato; (■) 1.000 ppm de sorbato; (◆) 100 ppm SO_2 ; (x) 500 ppm de sorbato y 100 ppm SO_2

crecimiento en los otros medios investigados.

La a_w mínima de crecimiento determinada en caldo sacarosa glicerol se ubicó entre 0,62 y 0,64 en ausencia de antimicrobianos y en el rango de pH óptimo de la levadura (**Figura 5**). Se concluye que una combinación de 100 ppm de bisulfito de sodio, 500 ppm de sorbato de potasio y pH 4,0 previene el deterioro por *Z. rouxii* en FHI.

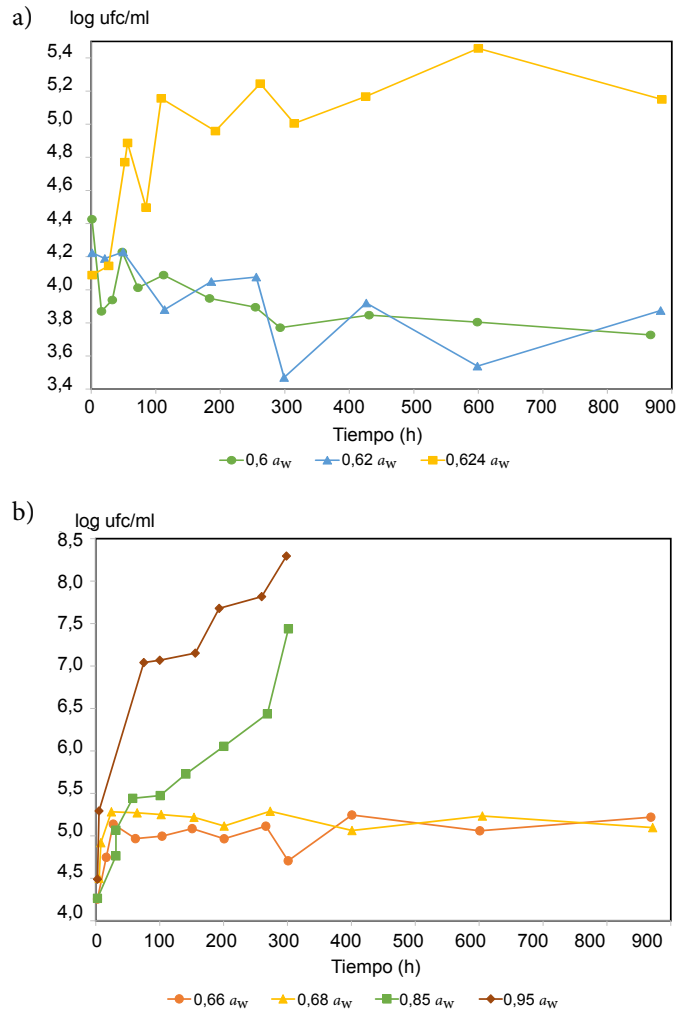


Figura 5. Efecto de la actividad de agua sobre el crecimiento de *Z. rouxii* en caldo sacarosa:glicerol (pH 4,0) durante 840 horas de incubación a 28 °C

a) ● 0,60 a_w ▲ 0,62 a_w ■ 0,64 a_w
b) ● 0,66 a_w ▲ 0,68 a_w ■ 0,85 a_w ◆ 0,95 a_w .

Entre los aspectos que han impedido que las FHI hayan continuado desarrollándose con los enfoques tradicionales están las preocupaciones de salud del consumidor asociadas con los altos niveles de humectantes y conservantes utilizados. Este último tema se ha vuelto más importante en años recientes gracias a una mayor conciencia pública sobre inocuidad alimentaria y los consumidores están buscando, además de características de frescura en los productos, la ausencia de preservantes. La industria alimentaria ha respondido a estas demandas con las llamadas frutas y hortalizas mínimamente

procesadas, que se han convertido en una industria muy extendida y constituyó el paso siguiente en nuestra línea de investigación.

3.4 Extensión del concepto de humedad intermedia a productos de alta humedad (procesamiento mínimo)

Se pueden explorar diferentes enfoques para obtener estabilidad de almacenamiento y una apariencia fresca en productos de fruta. Las frutas comerciales, mínimamente procesadas, son frescas (con alta humedad) y deben tener características de conveniencia para el consumidor.

El procesamiento mínimo incluye procedimientos de preparación tales como lavado, pelado, corte, empaque, entre otros, después de lo cual el producto de fruta generalmente se coloca en almacenamiento refrigerado donde su estabilidad varía según el tipo de producto, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, la estabilidad del producto sin refrigeración es un problema importante no solo en los países en desarrollo sino también en los países industrializados. El principio utilizado por Leistner [36], para carnes de alta humedad estables ($a_w > 0,90$) donde solo se usa un tratamiento térmico suave y el producto aún exhibe una larga vida útil sin refrigeración, se puede aplicar a otros alimentos. Las frutas son una buena opción para la aplicación de dicho principio y la generación de productos estables, seguros y mínimamente procesados.

Si el objetivo es la obtención de productos con características similares a las frutas frescas, la deshidratación (a_w como único o principal obstáculo) no puede usarse en el procesamiento. Por otro lado, la reducción de a_w mediante la adición de humectantes para mantener el producto en estado de alta humedad debe emplearse a un nivel mínimo que no afecte el sabor. Para compensar la alta humedad que queda en el producto (en términos de estabilidad), se puede aplicar un tratamiento térmico leve (escaldado) sin afectar las propiedades sensoriales y nutricionales, se pueden hacer reducciones de pH que no perjudiquen el sabor, y se pueden agregar antimicrobianos (ácido sórbico o benzoico), todo en contexto con el principio de obstáculos aplicado a las frutas, lo que constituye una alternativa interesante para la preservación de frutas con procesamiento mínimo.

Alzamora *et al.* [37] realizaron un trabajo pionero para obtener duraznos y piñas de alta humedad, estables a temperatura ambiente. La preservación microbiológica con estas técnicas combinadas, aplicando suavemente factores de estrés individuales para controlar el crecimiento microbiano evita la severidad de las técnicas basadas en el empleo de un solo factor de conservación [38]. Los métodos combinados fueron objeto de proyectos de OEA³ y CYTED⁴.

Durante la década de 1990, el uso de este enfoque condujo a importantes desarrollos de tecnologías innovadoras para obtener “productos de fruta de alta humedad” (PFAH) que se pueden almacenar durante 3-8 meses sin refrigeración. En la **Figura 6** y **Tabla 6** se presentan ejemplos de algunos de estos procesos y un diagrama esquemático para la preparación de frutas, en este caso, mango y papaya, estables a temperatura ambiente mediante el enfoque de métodos combinados.

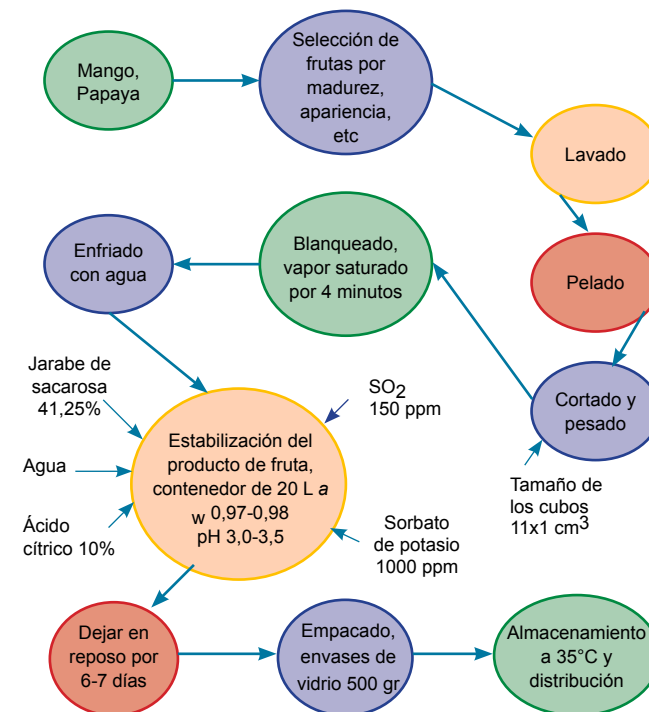


Figura 6. Diagrama esquemático para la preparación de mango y papaya de larga vida de anaquel mediante métodos combinados (Adaptado de [38])

Los proyectos mencionados en pie de página fueron muy exitosos y sus resultados están expresados en numerosas publicaciones [1, 39-49], dos de las cuales fueron dos manuales sobre el tema para la FAO [37,48].

En la **Figura 7**, se comparan un producto de fruta de alta humedad (PFAH), un producto de humedad intermedia (FHI) y un productos de fruta refrigerada con procesos mínimo, en términos de los obstáculos involucrados [48].

El ejemplo A representa un producto de humedad intermedia (PFHI) que contiene dos obstáculos (pH y a_w). Los microorganismos no pueden superar (saltar) estos obstáculos, por lo tanto, el producto es microbiológicamente estable. En este caso, la a_w es el obstáculo más relevante que ejerce la mayor presión contra la proliferación microbiana de FHI. En el sistema de preservación de PFAH (ejemplo B), es obvio que la a_w no

3. “Conservación de Productos Agrícolas (Frutas) por Tecnología de Métodos Combinados”. Organización de Estados Americanos (OEA). Proyecto de Biotecnología y Alimentos. Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos. ICTA. UCV. Caracas. Venezuela. Bienios 1992-1993 y 1994-1995.

4. Conservación de frutas a granel por métodos combinados. Proyecto CYTED-D XI-II. V Centenario Encuentro entre Dos Mundos. 1991-1993.

Tabla 6. Algunas nuevas tecnologías de preservación de frutas por factores combinados, desarrollados en el marco del Programa CYTED-D. (Adaptado de [45])

Frutas	Obstáculo "Hurdle"	T °C	Vida útil
Parchita Passiflora edulis flavicarpa (pulpa)	pH: 2,7-3,0; a_w : 0,98 (sacarosa); KS: 1.500 ppm; 4-hidroxiresorcinol: 200 ppm; ác, ascórbico: 2.500 ppm	30	2
	a_w : 0,97 (sacarosa)	35	3(a)
Durazno Prunus persica (mitades)	pH: 3,7; KS: 1.000 ppm; NaHCO ₃ : 150 ppm	23	8
	a_w : 0,94 (glucosa)	20	4
Durazno Prunus persica (mitades)	pH: 3,5; KS: 1.000 ppm; NaHSO ₃ : 150 ppm	30	4
Mango Mangifera indica L. (puré)	a_w : 0,93 (sacarosa)	30	6
	pH: 3,6; SB: 1.480; NaHSO ₃ : 150 ppm	30	8
Mango Mangifera indica L. (rebanadas)	a_w : 0,93 (sacarosa); pH: 3,3; SB: 1.400 ppm, NaHSO ₃ : 150 ppm	35	6(a)
Mango Mangifera indica L. (rebanadas)	a_w : 0,97 (sacarosa), pH: 3,0, KS: 1.000 ppm; NaHSO ₃ : 150 ppm	35	4-5
	a_w : 0,97 (sacarosa)	35	4-5
Papaya Carica papaya (rebanadas)	pH: 3,8, KS: 1.000 ppm; NaHSO ₃ : 150 ppm	25	8(a)
Piña Ananas comosus (rebanadas)	a_w : 0,97 (glucosa); pH: 3,1; KS: 1.000 ppm; NaHCO ₃ : 150 ppm;	27	4(a)
Banana Musa paradisíaca (puré)	a_w : 0,92 (sacarosa); pH 4,2; KS: 1.500 ppm; SO ₂ : 300 ppm	26	3
Níspero Achras zapota (rebanadas)	a_w : 0,92-0,94 (sacarosa); pH: 4,0-4,3; NaHSO ₃ : 150 ppm	26	3

(a) vida útil (en meses) se investigó solo por este período, pero puede ser mayor

KS= Sorbato de potasio

SB= Benzoato de sodio

T= temperatura de almacenamiento

representa el obstáculo de mayor relevancia contra la proliferación microbiana; el pH es el obstáculo que ejerce la presión selectiva más fuerte sobre la microflora. Como en el ejemplo A, PFAH no requiere almacenamiento refrigerado.

En el ejemplo C, se ha aplicado un tratamiento térmico suave T(t) y agregado un conservante químico, P. Ambos afectan el crecimiento y la supervivencia de la flora. Con estas

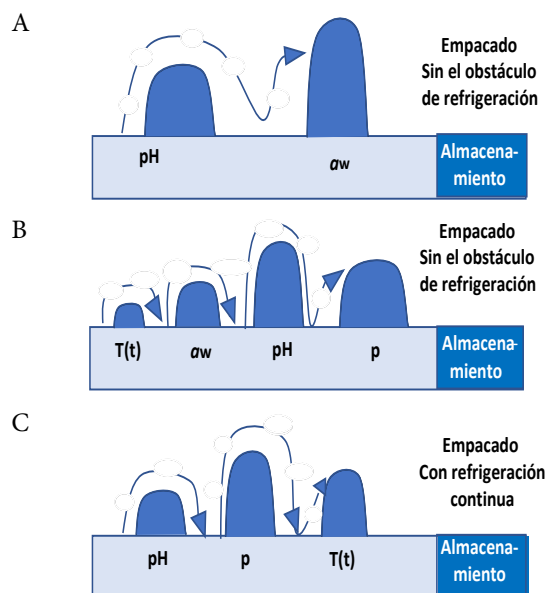


Figura 7. Representación esquemática de obstáculos: actividad de agua (a_w), pH, conservantes (P) y tratamiento térmico leve, T (t), involucrados en tres sistemas de preservación de frutas. (A): un producto de fruta de humedad intermedia. La depresión de a_w es el obstáculo más relevante. (B) un producto de fruta de alta humedad. El descenso de pH es el obstáculo más relevante. (C) un producto de fruta refrigerado mínimamente procesado, sin descenso de a_w . La adición de preservantes es el obstáculo más relevante, y el almacenamiento refrigerado es un requisito para la estabilidad. (Fuente [48]).

consideraciones en mente, es posible comprender y anticipar los tipos de microorganismos que podrían sobrevivir, así como su comportamiento y control en esos productos a base de fruta.

4. La actividad de agua en la detección y enumeración de microorganismos

Los medios utilizados en la enumeración de hongos (mohos y levaduras) en los alimentos y otros sustratos son tradicionalmente de alta actividad de agua (a_w): en el rango de 0,997 a 0,999. Aunque dichos medios son satisfactorios para enumerar y aislar levaduras y mohos de alimentos frescos como frutas, verduras, productos lácteos y cárnicos, son inadecuados para expresar la flora fúngica de alimentos secos y semisecos como frutas deshidratadas, condimentos y especias, confitería, productos cárnicos y pesqueros deshidratados, cereales, semillas y nueces. En consecuencia, se requiere una reducción de a_w para su análisis microbiológico. Durante muchos años han estado en uso medios con a_w reducida, para el aislamiento y enumeración de levaduras osmofílicas. Por ejemplo, ya Ingram en 1958 [50] informaba sobre los medios que contenían grandes proporciones de miel para aislar levaduras de ese producto. Posteriormente se han registrado numerosos medios basados en glucosa y sacarosa para el cultivo de levaduras osmofílicas [51].

Los medios de a_w reducida para enumerar mohos en los productos alimenticios se han basado tradicionalmente en la

adición de NaCl en los caldos de cultivo, aunque también se han usado medios con el añadido de sacarosa. El medio a base de sal más utilizado, el agar salino de malta de Christensen (MSA) con a_w de 0,95, no es satisfactorio por varias razones. Por ejemplo, en MSA las colonias del grupo *Aspergillus glaucus* (estados imperfectos del género *Eurotium* Link ex Fr.) se extienden rápidamente, cubriendo y ocultando algunas de las especies de desarrollo más lento. También esporulan abundantemente, a menudo causando problemas con las colonias secundarias si las placas deben incubarse durante más de 5 días. Los medios a base de azúcar tienen la desventaja de una alta viscosidad y temperatura de gelificación y son propensos a la cristalización.

Hocking y Pitt [52] mostraron que el glicerol es un soluto adecuado para el cultivo de una gama de hongos xerófilos, es menos inhibitorio que el NaCl para algunas especies, produce medios transparentes, y se maneja más fácilmente que los azúcares a altas concentraciones. Sin embargo, incluso los medios formulados con glicerol no resuelven el problema de controlar la expansión del crecimiento del grupo de *A. glaucus*. Por otro lado, se ha demostrado que el diclorán (2,6-dicloro-4-nitroanilina), solo o en combinación con rosa de bengala, inhibe la propagación de hongos mucoráceos y limita los diámetros de colonias de otros géneros en medios de enumeración de hongos para alimentos. Basado en estos antecedentes Hocking y Pitt desarrollaron un nuevo medio con 18 % (p/p) de glicerol y 2 µg de diclorán por ml (0,955 a_w) para la enumeración de hongos xerófilos de alimentos secos. Las características de este medio, junto con una recuperación mejorada de mohos a partir de alimentos secos, hacen que DG18 sea el medio más adecuado para enumerar la flora fúngica de una amplia gama de alimentos de baja humedad y alimentos de humedad intermedia. El medio es particularmente útil para detectar el crecimiento de colonias por *Walleimia sebi*, de miembros de la serie *Aspergillus restrictus* y *Eurotium* que no crecen bien en los medios de enumeración con mayor a_w . Desafortunadamente, algunas especies de *Eurotium* también crecen rápidamente en agar DG18, oscureciendo el crecimiento de otros xerófilos. La adición de sorbitol al agar rosa de bengala cloranfenicol retarda el desarrollo de colonias de *Eurotium amstelodami* Mangin, pero el desarrollo de color hifal es pobre.

Se han evaluado, con varios niveles de éxito, algunos productos químicos para determinar su idoneidad en el control de la propagación de colonias de hongos, que presentan un amplio rango de tolerancia o requerimientos para un a_w específico. Se probaron fungicidas, antibióticos, colorantes, propionato de amonio, oxgall, un agente humectante y otros compuestos tensoactivos. Estos químicos inhiben diversas actividades metabólicas de los mohos, lo que resulta en una tasa reducida de crecimiento micelial. Los tensoactivos, en

particular, retrasan el desarrollo de la punta hifal y, por lo tanto, pueden ser efectivos para controlar la propagación de colonias en los medios de enumeración.

En nuestro laboratorio del ICTA-UCV, trabajamos en equipo con el *Food Safety and Quality Enhancement Laboratory* del Departamento de *Food Science and Technology* de la Universidad de Georgia, en la Estación Experimental Agrícola en Griffin (USA), en un proyecto para determinar los efectos de sustancias químicas en la tasa de propagación de colonias por *E. amstelodami* (cuatro cepas), FRR 475 y FRR 3020 que fueron suministradas por Ailsa Hocking del *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* en North Ryde, Australia; las cepas NRRL A-27649 y NRRL A-27651 se obtuvieron del *USDA National Center for Agricultural Utilization Research* en Peoria, Illinois [53].

Se seleccionaron 20 aditivos químicos por su efectividad para restringir la propagación de colonias de cuatro cepas de un moho xerófilo *Eurotium amstelodami*, en agar diclorán glicerol 18: Se examinaron trece tensoactivos a concentraciones de 1.000 y 5.000 µg/ml: Triton X-100, X-301 y N-101 (Rohm and Haas Co., Filadelfia, PA); Teepol 610 y HB7 (Shell Chemical Co., Nueva York, NY); Span 20 y Span 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Tween 20 y 80 (Sigma); y Tergitol NP-7, NP-40, 15-S-3, y 15-S-40 (Union Carbide Corp., Nueva York, N.Y.). Otro tensoactivo, lauril sulfato de sodio, se probó a 500 y 1.000 µg/ml, al igual que propionato de sodio y desoxicolato de sodio, Oxgall (bilis bovina, seca, no fraccionada; Sigma), se probó a 1.000 y 5.000 µg/ml. Los productos químicos restantes analizados fueron fungicidas (500 y 1.000 µg del ingrediente activo por ml): ketoconazol (Sigma); Maxim [4-(2,2-difluoro-1,3-benz-dioxol(4-il)-1H-pirrol-3-carbonitrilo) y propiconazol [1-([2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-il]metil)-1H-1,2,4-triazol] (CIBA – GEIGY Corp., Greensboro, NC); e iprodiona [3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metil-etil)-2,4-dioxo-1-imidazolidina-carboxamida] (Rovral 5OWP; Rhone-Poulenc, Inc., Research Triangle Park, NC).

De acuerdo a los resultados, Tritón X-100, Tritón X-301, Tergitol NP-7 y Tergitol 15-S-3 (cada uno a 200 µg/ml) y 1,000 µg de desoxicolato de sodio, 1 µg de iprodiona, 0,1 µg de propiconazol y 0,01 µg de Maxim por ml se consideró más eficaz para restringir la tasa de propagación de colonias de *E. amstelodami* durante un período de incubación de 5 a 7 días, suficiente para permitir el desarrollo de colonias de otros xerófilos que crecen más lentamente, y poder hacer una enumeración que refleje con mayor fidelidad la carga micológica real (Tabla 7).

Se evaluaron [54] cuatro compuestos tensoactivos no iónicos, dos tensoactivos aniónicos y tres fungicidas en términos de su capacidad para controlar la propagación -sin

Tabla 7. Diámetros de colonias de cuatro cepas de *E. amstelodami*, crecidas en agar DG18 conteniendo varios químicos de prueba

Químico	Conc. (µg/ml)	Diámetro de las colonias (mm) * después de:									
		3 días		5 días		7 días		10 días		14 días	
		Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango
Ninguno (control)	0	4,48 (a)	2,9-5,4	11,8 (a)	8,8-14,8	20,7 (a)	15,5-22,7	36,5 (a)	33,9-39,9	45,7 (a)	40,2-49,1
Tritón X-100	200	1,1 (d)	0,8-1,3	3,3 (f,g)	1,7-4,3	5,9 (f)	4,2-7,3	10,3 (e)	8,3-12,0	15,9 (f)	14,4-17,0
Tritón X-301	200	0,9 (d)	0,8-1,0	2,8 (g)	1,8-3,6	4,8 (g)	3,8-6,6	8,2 (f)	6,4-10,3	12,8 (g)	11,1-13,9
Tergitol NP-7	200	1,0 (d)	0,9-1,0	2,7 (g)	2,2-3,1	4,6 (g)	3,6-5,9	8,1 (f)	4,6-9,8	12,4 (g)	11,4-13,8
Tergitol 15-S-3	200	1,0 (d)	0,8-1,0	4,4 (d,e)	3,6-5,0	7,9 (e)	6,9-8,5	13,5 (d)	13,1-14,6	18,7 (e)	17,1-20,0
Desoxicolato de sodio	1.000	0,8 (d)	0,4-1,0	3,7 (e,f)	3,1-4,6	6,4 (f)	5,1-7,6	10,2 (e)	8,5-12,0	16,2 (f)	12,2-17,4
Iprodiona	1,00	1,9 (c)	1,3-2,0	5,1 (c,d)	4,1-5,7	9,0 (d)	8,1-10,0	16,4 (c)	14,0-18,6	25,0 (d)	22,6-30,3
Propiconazol	0,10	2,4 (b)	1,6-3,4	8,9 (b)	7,9-10,2	16,6 (b)	14,0-20,0	29,9 (b)	26,6-33,4	38,7 (b)	34,9-43,1
Maxim	0,01	2,3 (b,c)	0,1-2,8	5,5 (c)	4,8-6,2	10,2 (c)	8,3-11,0	17,7 (c)	16,9-19,9	26,9 (c)	24,6-31,3

* Los datos representan valores de tres repeticiones de mediciones de diámetro de las colonias, por triplicado. Las medias fueron calculadas usando cuatro cepas de prueba.

(a-g) Los valores de medias en la misma columna que no contienen la misma letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.0001$) como se determina en el análisis de varianza y la prueba de rango múltiple de Duncan. Los rangos indican los valores mínimos y máximos de los diámetros obtenidos para las cuatro cepas de prueba.

ser tóxico- y no inhibir el crecimiento de 21 cepas de *Eurotium* -que representan nueve especies- y otros ocho mohos xerófilos: *Aspergillus candidus*, *A. penicilloides*, *A. restrictus*, (varias cepas), y *Wallemia sebi*, en total, 29 especies xerófilas. Se evaluó la efectividad de estos químicos en controlar el esparcimiento de las colonias de cepas de crecimiento rápido, sin inhibir las de crecimiento lento, así como, permitir que las colonias que se desarrollen, lo hagan sin que su morfología, pigmentación y capacidad de producción de conidios y de otros tipos de esporas fúngicas sea afectado. Adicionalmente, se evaluó la recuperación en los medios investigados, de conidios de las 29 cepas xerófilas, sometidos a estrés por calentamiento y también por congelación, a modo de probar la eficacia de los medios para enumerar células “lesionadas” por el procesamiento, que pudiesen no expresarse y no ser contabilizadas. El agar DG18 que contenía 200 ppm de Tritón X-301, 200 ppm de Tergitol 15-S-3, 1.000 ppb de iprodiona fue más efectivo para controlar la propagación de colonias de los xerófilos investigados. El agar DG18 con Tritón X-301, o 1.000 ppb de iprodiona o de Maxim se desempeñó mejor para recuperar conidios no estresados, estresados por calor y estresados por congelación. (Tabla 8). Adicionalmente, se evaluó el agar DG18 no modificado y modificado químicamente para enumerar cuatro cepas de xerófilos (*Aspergillus candidus*, *A. restrictus*, *Eurotium amstelodami* y *Wallemia sebi*, en harina de trigo. La recuperación máxima se logró en agar DG18 que contenía 200 ppm de Tritón X-301, 1.000 ppb de iprodiona, 100 ppb de propiconazol o 10 ppb de Maxim. Con base en estas observaciones, no habiéndose observado efecto de los compuestos químicos probados sobre la morfología característica y la pigmentación

de las colonias, se consideró que el agar DG18 que contenía 100 ppm de Tritón X-301 o 1.000 ppb de iprodiona era superior al agar DG18 no modificado y al agar DG18 modificado con los otros productos químicos de prueba (0,955 a_w , todos). Se esperaba que la incorporación de Tritón X-301 o iprodiona en el agar DG18 mejorase la facilidad de contar colonias formadas por el número máximo de propágulos viables de mohos moderadamente xerófilos presentes en alimentos de humedad intermedia y alimentos deshidratados.

Tabla 8. Número de especies y cepas de mohos xerófilos de prueba (de 29 investigados) que fueron recuperados significativamente ($p \leq 0.05$) con poblaciones menores (m) o mayores (M) en agar DG18 (diclorán-glicerol-cloranfenicol) DG18 modificado químicamente comparado con agar DG18 no modificado

Medio (a)	Control (b)						Combinado (e)	
	Calentado		Congelado					
	m	M	m	M	m	M	m	M
Sin químicos (control)	19	0	12	1	5	3	26	4
Tritón X-100	2	3	3	7	0	2	5	12
Tritón X-301	15	0	12	1	6	1	33	2
Tergitol NP-7	11	1	6	3	5	1	22	5
Tergitol 15-S-3	17	0	11	0	9	1	37	1
Desoxicolato de sodio	13	0	14	2	5	2	32	4
Iprodiona	0	1	1	2	0	3	1	6
Propiconazol	16	1	11	1	9	0	36	2
Maxim	0	0	2	2	1	1	3	3

(a) Agar DG18 con adición o no de los químicos indicados.

(b) Los conidios no fueron estresados por temperatura.

(c) Los conidios fueron calentados por 20 minutos a 50 o 55 °C.

(d) Los conidios fueron almacenados a -18 °C por 7 semanas.

(e) Suma de valores de 87 muestras: control, calentadas y congeladas.

Se llevó a cabo un estudio colaborativo, con la participación de siete laboratorios, entre ellos el nuestro, para comparar el agar DG18 vs el agar diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC), el agar cloranfenicol extracto de levadura, glucosa triptona (TGYC) y el agar de recuento en placa suplementado con cloranfenicol (PCAC), para enumerar 14 especies de levaduras deteriorativas de alimentos [55]. La comparación de los valores medios de las poblaciones de todas las levaduras recuperadas en cada medio no reveló diferencias significativas entre el agar DRBC, el PCAC y el agar TGYC, mientras que cada uno de estos medios sustentó el desarrollo de un número significativamente mayor ($p \leq 0,05$) de colonias que el agar DG18. Sin embargo, las diferencias fueron solo de 0,08 a 0,10 \log_{10} ufc/ml, por lo que la importancia práctica es cuestionable. El coeficiente de variación global (CV) para la repetibilidad dentro del laboratorio fue de 1,71 %, mientras que el CV para la reproducibilidad de los recuentos obtenidos entre laboratorios fue de 6,96 %. En comparación con el agar DRBC, el agar TGYC y el PCAC, las colonias de levadura fueron más pequeñas en el agar DG18. El crecimiento de *Brettanomyces anomalus*, *Cryptococcus albidus* y *Rhodotorula mucilaginosa* se retrasó o inhibió particularmente en el agar DG18. Basado en el desempeño de los medios para apoyar el desarrollo de colonias y la facilidad para contar colonias, no se puede recomendar el uso del agar DG18 como medio de enumeración general para levaduras vehiculizadas por alimentos.

5. Medición de la actividad del agua

Siendo nuestro grupo de investigación pionero en Venezuela en la introducción del concepto de a_w como parámetro fundamental determinante de la estabilidad de los alimentos y la ecología microbiana, y de las propiedades del agua del sistema alimento-entorno, este parámetro debía incorporarse en proyectos tesis de pre y postgrado. En el año 1990 no existía equipo para la medición de a_w en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Ese año apareció en el mercado la Serie AquaLab fabricada por ©Decagon Devices Inc., publicitado como el instrumento más rápido, preciso y confiable disponible para medir la a_w , y fue incluido en el arsenal de nuestro laboratorio. AquaLab utiliza la técnica de punto de rocío, en la cual la muestra se equilibra con el espacio de la cabeza de una cámara sellada que tiene un espejo y un mecanismo para detectar la condensación en el espejo. En equilibrio, la humedad relativa del aire en la cámara es igual a la a_w de la muestra. La temperatura del espejo se controla con precisión mediante un enfriador termoelectrónico (Peltier), y la detección del punto exacto en el cual la condensación aparece por primera vez en el espejo se observa con una celda fotoeléctrica. Un haz de luz se dirige hacia el espejo y es reflejado en la celda fotodetectora, la cual detecta el cambio en

la reflectancia cuando se produce condensación sobre el espejo. Un termopar unido al espejo registra entonces la temperatura a la cual ocurre la condensación que es indicado con una señal sonora del equipo y se despliega en una pantalla la a_w final y la temperatura. El equipo utiliza un ventilador interno que hace circular el aire dentro de la cámara sobre la muestra para reducir el tiempo de equilibrio. Dado que el equipo mide simultáneamente tanto el punto de rocío como la temperatura de la superficie de la muestra, se elimina la necesidad de equilibrio térmico completo, reduciendo así los tiempos de medición a menos de cinco minutos para la mayoría de las pruebas.

El equipo de AquaLab fue evaluado para establecer la precisión de los datos obtenidos y el tiempo de respuesta en función de la composición de soluciones acuosas de interés en el área de alimentos, y de la temperatura (25-35 °C). Los resultados demostraron la buena funcionalidad al evaluar soluciones acuosas de mezclas binarias y multicomponentes con solutos no ionizables (principalmente mono y disacáridos) y electrolitos. Los tiempos de obtención de los valores de actividad de agua fueron inferiores a cinco minutos a todas las temperaturas evaluadas. La presencia de solventes volátiles (como etanol) interfieren con la medida de a_w . Los resultados obtenidos sirvieron en su momento, como referencia para el uso confiable del equipo en los proyectos con alimentos de humedad intermedia y alta [56].

6. Predicción de la actividad de agua

Como ya se estableció, la actividad del agua (a_w) es un parámetro muy importante en el diseño y elaboración de formulaciones alimentarias. Se ha desarrollado métodos analíticos precisos y exactos para la determinación experimental práctica de a_w , así como procedimientos matemáticos para calcular este parámetro, que pueden ser tan efectivos como las determinaciones experimentales en el rango medio y alto de humedad, pues los alimentos de alta humedad o aquellos de humedad intermedia cercanos a los límites superiores de a_w pueden ser tratados como soluciones binarias o como soluciones multicomponentes, conociendo la composición del alimento.

6.1 Soluciones binarias

Para aquellas soluciones binarias de interés en la industria de alimentos o alimentos que se comportan como tales, los métodos de cálculo de a_w se pueden agrupar en dos tipos: *i*) aquéllos que se aplican para sistemas con un comportamiento ideal (mezclas perfectas) y *ii*) aquéllos utilizados para soluciones no ideales:

i) Comportamiento ideal. Las soluciones binarias diluidas de algunos solutos se comportan idealmente y la ley de Raoult

puede ser utilizada para el cálculo de la a_w :

$$a_w = P_w / P_w^0 = X_w = n_w / (n_w + n_s) \quad (2)$$

donde X_w es la fracción molar del agua en la solución, n_w los moles totales de agua y n_s los moles totales de soluto.

Un buen número de soluciones acuosas diluidas se aproximan a este comportamiento ideal. La Ec. (2) funciona adecuadamente para jugos y bebidas (con concentraciones en peso de solutos menores a 15 %), que representan soluciones diluidas, sin embargo, la mayor parte de las veces, la ecuación no resulta adecuada para alimentos más concentrados de composición compleja (multicomponentes).

ii) *Comportamiento no ideal.* Cuando una solución se comporta idealmente, el coeficiente de actividad de las ecuaciones, que relacionan fugacidades en lugar de presiones parciales, es uno. Esta idealidad es un índice de que durante la mezcla no se presentan ni cambios de volumen, ni efectos de calor de mezcla o cambios en exceso en la entropía. Las soluciones no ideales se comportan como soluciones perfectas y la Ec. (3) rige para estos casos:

$$a_w = \gamma_w X_w \quad (3)$$

donde γ_w = coeficiente de actividad y es diferente a 1 y X_w es la fracción molar del agua en la solución.

De esta última expresión resulta claro que la estimación de los coeficientes de actividad de agua es de gran importancia para la predicción de la a_w . Por ello se han utilizado y desarrollado diversos modelos para el cálculo de los coeficientes de los solutos depresores de a_w en soluciones binarias de electrolitos y no electrolitos. Sin embargo, normalmente se ha optado por el uso de algunos modelos de predicción de que engloban el concepto del coeficiente de actividad, que son simples en su aplicación y que han dado buenos resultados, como sucede con el modelo de Norrish [57].

Los modelos matemáticos basados en la composición del sistema alimentario para el cálculo de los coeficientes de actividad de agua (a_w) pueden exponerse como

ii.1) *Soluciones de no electrolitos:*

Norrish [57] propuso una expresión para el cálculo de la en soluciones binarias de azúcares, la cual escribimos en la forma de Chirife [58]:

$$a_w = X_w \exp(K X_s^2) \quad (4)$$

siendo X_w y X_s las fracciones molares del agua y soluto en el sistema y K es la constante de la ecuación de Norrish para cada soluto.

Esta ecuación se ha aplicado con buenos resultados en la predicción de la en alimentos y soluciones binarias de diversos

solutos no electrolitos.

ii.2) *Soluciones de electrolitos*

En el caso de soluciones binarias de electrolitos, una consecuencia de la reducción de la a_w es el incremento de la presión osmótica (π) que puede ejercer una solución. Esta presión se relaciona con el coeficiente de actividad (γ_w) y con la a_w en una solución acuosa a través de la siguiente expresión:

$$\pi = (RT/V^*) \ln X_w \gamma_w = (RT/V^*) \ln a_w \quad (5)$$

en la cual V^* toma un valor de 18 ml/mol de agua, R es la constante de la ecuación para gases ideales y T de la temperatura de la solución.

Estas expresiones han sido el origen de otras que se han utilizado para el cálculo del valor de π o de la a_w directamente utilizando el valor del coeficiente osmótico (ϕ), sobre todo en el caso de soluciones de electrolitos.

Ecuación de Pitzer y Mayorga [59]

$$\phi = (-1000/M_w \sum m_i) \ln a_w \quad (6)$$

donde M_w es el peso molecular del solvente (18,02 para el caso del agua) y m_i son los moles de las especies iónicas del componente i por kilogramo del solvente (molalidad del soluto). Nótese que el coeficiente osmótico tiende a 1 a medida que m_i tiende a cero.

La ecuación anterior puede expresarse de la siguiente forma, para el caso del agua [60]:

$$a_w = \exp(-0.018 \sum m_i \phi) \quad (7)$$

Utilizando los modelos para el cálculo del coeficiente osmótico propuestos por Bromley [61] y Pitzer y Mayorga [59], se puede calcular la actividad de agua de una solución o de un alimento que se comporta como una solución binaria, en donde el soluto puede ser un electrolito o un no electrolito. Sin embargo, el procedimiento del cálculo del coeficiente osmótico resulta largo y tedioso. Por ello, Favetto y Chirife [62] generaron una versión simplificada de la Ec. (7) que se puede expresar como:

$$a_w = 1 - K^* m \quad (8)$$

siendo K^* una constante para cada soluto, que incluye el efecto de la presión osmótica y, en el caso de ser un electrolito, el grado de disociación de este. Esta es la suposición más importante en la Ec (8) y a partir de un análisis de regresión lineal se obtuvieron valores de K^* para diferentes solutos, algunos de los cuales se presentan en la **Tabla 9**.

Todos los modelos matemáticos varían desde los empíricos hasta aquellos con una fuerte base teórica, lo que resulta en una amplia gama de modelos en términos de precisión, complejidad y aplicabilidad.

Tabla 9. Valores de la constante de la ecuación de Favetto y Chirife [62]

<i>Soluto</i>	K^* (mol ⁻¹)
No electrolitos	
Sacarosa	0,02476
Glucosa	0,01959
Maltosa	0,02070
Sorbitol	0,01859
Glicerina	0,01723
Xilosa	0,01840
Electrolitos	
Cloruro de sodio	0,03710
Cloruro de potasio	0,03248
Sulfato de sodio	0,03476
Acetato de potasio	0,04280

6.2 Soluciones multicomponentes

De todos los modelos propuestos para estimar la a_w en mezclas multicomponentes, la ecuación de Ross [63] es la más importante, ampliamente aplicada, y proporciona un modelo razonablemente preciso y simple para estimar a_w .

Dicha ecuación define que la a_w del alimento es el producto de la actividad del agua de cada componente, calculada suponiendo que éstos se comportan en forma independiente, pero considerando la concentración a la que se encuentran si formara cada soluto una mezcla binaria con el agua. Ec. (9)

$$a_w = (a_w)_1 (a_w)_2 (a_w)_3 \quad (9)$$

Lo primero es identificar cuáles componentes intervienen en la fase líquida (agua más los sólidos solubles en ella) y en la fase sólida (los solutos insolubles) del alimento. Una vez identificados los solutos presentes en la fase líquida, se debe ver de qué clase son. Hay presentes solutos no iónicos, solutos electrolíticos y solutos poliméricos. De todos ellos, únicamente los solutos iónicos y solutos electrolíticos son los que realmente contribuyen a reducir el valor de a_w del agua pura. Por lo tanto, es posible simplificar el alimento a ser estudiado considerándolo un sistema formado por agua, solutos no iónicos y solutos electrolíticos (en caso de encontrarse ambos tipos de solutos presentes en el alimento).

Chirife [58] probó la validez de la ecuación de Ross [63] para estimar la actividad del agua de soluciones multicomponentes, en alimentos sólidos de humedad intermedia. Para ello empleó datos experimentales ya publicados de actividad del agua y de la composición del sistema alimentario, en una amplia variedad de alimentos de humedad intermedia. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios e indican que la ecuación de Ross constituye un método simple y razonablemente preciso para predecir la actividad del agua en un AHI. Esta ecuación requiere el uso de modelos binarios para estimar

la contribución de cada soluto participante. Sin embargo, los cálculos que involucran estas ecuaciones y se adaptan al modelo de Ross [63] pueden ser difíciles y los errores intrínsecos de las estimaciones binarias se llevan a la predicción final. En la mayoría de estos modelos, las interacciones homotácticas y heterotácticas entre solutos disueltos, no se tienen en cuenta. Los efectos superficiales entre solutos y macromoléculas no se han considerado teóricamente, lo que limita su aplicabilidad en los alimentos a rangos de humedad intermedios y altos.

En un trabajo colaborativo del ICTA-UCV y el Laboratorio de Química y Procesos de la Universidad Simón Bolívar⁵ se trabajó en el desarrollo teórico y en la verificación de un modelo matemático simple para estimar a_w en soluciones multicomponentes de electrolitos y no electrolitos. En este estudio [22], se evaluó la generación de un modelo alternativo a la ecuación de Ross [63], que considera a los alimentos como soluciones acuosas multicomponentes con solutos que pueden ser o no ser electrolitos. Se buscaba generar un modelo matemático que sirviera como un método simple, de uso potencial en el diseño práctico de alimentos y el control de calidad.

El modelo desarrollado se basó en una combinación del concepto de mezcla propuesto por Salwin y Slawson, como fue planteado por Vega-Mercado y Barbosa-Cánovas [64], junto con el propuesto por Favetto y Chirife [62] que presenta una relación lineal entre la a_w y la molalidad de cada soluto.

La ecuación generada se presenta a continuación:

$$a_{wM} = 1 - \sum K_i m_i \quad (10)$$

en la cual a_{wM} es la actividad de agua de una mezcla acuosa con i componentes, K_i es una constante obtenida para cada soluto presente en una mezcla acuosa binaria y representa la pendiente de la relación entre la actividad de agua y la molalidad (m_i) de la solución.

Para validar el modelo generado y comparar resultados con los de la ecuación de Ross se utilizaron datos experimentales de actividad del agua para mezclas multicomponentes con solutos electrolitos (NaCl, KCl, KBr, KNO₃, MgCl₂, LiCl, BaCl₂ y CaCl₂) y no electrolitos (sacarosa, glucosa, glicerol, glicina, manitol y urea), reportados por Teng y Seow [65], Chirife *et al.*, [66] y Correa *et al.* [67]. Para obtener los valores de K_i se utilizó la ecuación de Favetto y Chirife [62] y datos experimentales de mezclas binarias reportados por Teng y Lenzi [68]. La bondad de la predicción del modelo propuesto y de la ecuación de Ross se evaluó utilizando comparaciones entre los valores predichos y experimentales, así como el error generado en la predicción siguiendo los

5. Proyectos Conicit (S1-96000584), Decanato de Investigación y Desarrollo Universidad Simón Bolívar, y Comisión Europea TS3*CT94-0333 (DG 12 HSMU).

planteamientos propuestos por Teng y Seow [65], Favetto y Chirife [62] y Catté *et al.*, [69]. Se realizaron predicciones de la actividad de agua para mezclas ternarias y cuaternarias que generaran valores de a_w comprendidas entre 0,75 y 1 (a 25 °C), intervalo de interés en el diseño y formulación de alimentos de humedad intermedia y alta. Las mezclas empleadas fueron: a) sistemas acuosos ternarios de electrolitos: NaCl-KCl (12 combinaciones), NaCl-KBr (5 combinaciones), NaCl-KNO₃ (6 combinaciones), KCl-MgCl₂ (12 combinaciones); b) sistemas acuosos ternarios de electrolitos y no electrolitos: NaCl-sacarosa (8 combinaciones), KCl-glicina (10 combinaciones), NaCl-urea (16 combinaciones); c) sistemas acuosos ternarios de no electrolitos: glucosa-sacarosa (6 combinaciones), glicerol-sacarosa (6 combinaciones), sacarosa-urea (6 combinaciones), glucosa-urea (13 combinaciones), sacarosa-manitol (8 combinaciones); d) sistemas acuosos cuaternarios de electrolitos: LiCl-NaCl-KCl (3 combinaciones), NaCl-KCl-BaCl₂ (8 combinaciones) y NaCl-KCl-CaCl₂ (18 combinaciones). En todos los casos se obtuvieron predicciones similares a las generadas con la ecuación de Ross con errores menores al 5 % ($p < 0,05$) al comparar los datos predichos y experimentales. Con nuestro modelo se lograron mejores predicciones cuando la $a_w \geq 0,85$, obteniéndose diferencias entre los datos experimentales y predichos inferiores a 0,01 unidades. Se concluyó que la ecuación propuesta [Ec. (10)] demostró predecir adecuadamente los valores de a_w . Tal ecuación ha sido incluida en la literatura dentro de las ecuaciones empíricas de predicción de a_w y calificada como muy sencilla pero razonablemente exitosa, que emplea un solo parámetro por soluto en mezclas multicomponentes [70].

7. Conclusiones

Conocer el comportamiento del agua y de cómo interactúa con diferentes solutos, trasladándolo a los complejos sistemas multicomponentes que representan los alimentos, resulta fascinante. Más aún, si los alimentos a los que nos referimos son frutas, es decir, tejidos vivos, frágiles y casi perfectos, en los que esa “vida” debe detenerse con gran cuidado para no alterar estructura y condición de fresca y asegurar que el hombre pueda consumirlos en un suministro estable, sostenible, inocuo y palatable. Además, se debe velar para que otras formas de vida no los utilicen, pues los microorganismos, grandes competidores, necesitan agua disponible para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas.

La medición de la actividad de agua es importante para cumplir con requerimientos del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés: *Hazard Analysis and Critical Control Points*) y del Análisis de Riesgos, para ser utilizadas en la industria de alimentos a fin de asegurar la inocuidad de los mismos destinados al consumo humano

(Norma Venezolana COVENIN 3802:2002), cumplir con el control de calidad de las empresas de alimentos, con las regulaciones y normativas nacionales e internacionales, y con la confianza de los consumidores. Por este motivo, muchos países han establecido disposiciones de carácter obligatorio sobre los valores de a_w admisibles en distintos grupos de alimentos. La disponibilidad de medios de cultivo con consideraciones de actividad de agua, especialmente para flora xerófila u osmofílica, es fundamental para la realización del análisis microbiológico de los alimentos de acuerdo a métodos estandarizados y normas internacionales.

La medición de la actividad de agua con una precisión de 0,01 solo es posible a una temperatura constante y con un equipo de alta sensibilidad. En la zona de actividades de agua elevadas, y particularmente críticas (productos alimentarios perecederos como el pescado y las carnes), una variación mínima de la temperatura conlleva a_w a un error superior de 0,01 el cual puede determinar o no, crecimiento de microorganismos deteriorativos o patógenos, y por lo tanto, resulta esencial para el control de calidad en el campo microbiológico. En consecuencia, las medidas no termorregulables son pues, inconcebibles y los equipos con control de temperatura, facilidad y rapidez de equilibrio de las muestras, precisión y rapidez en las lecturas, son esenciales.

Conocer los valores mínimos de a_w a los cuales se inhiben y por encima de los cuales pueden crecer los microorganismos patógenos o deteriorativos, es de gran importancia para el control microbiano y aseguramiento de la calidad e inocuidad de los alimentos. Determinar esta característica del crecimiento de microorganismos es prácticamente una investigación obligatoria para su identificación y clasificación.

El manejo del parámetro a_w conociendo los efectos de los solutos y los modelos de predicción constituyen un fascinante aspecto en el desarrollo, formulación y determinación de vida útil en la industria de alimentos. El diseño de sistemas de preservación de frutas aplicando la tecnología de obstáculos en los que la a_w es una de estas barreras, es igualmente retador. La preservación de alimentos moderna continúa basándose en gran medida en el efecto “hurdle”.

Referencias

- [1] López-Malo, A., Tapia, M.S., Alzamora, S., Welti-Chanes, J., Gongora-Nieto, M. y Barbosa-Cánovas, G. Water Activity: Microbiology. *The Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. Francis F.J. (ed.) (John Wiley y Sons, Hoboken, NJ, USA, 1999) pp. 2635-2640.
- [2] Welti-Chanes, J. y Vergara, B.F. Actividad de agua. Concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad. En: *Temas en tecnología de alimentos*. Aguilera, J.M. (ed.), (Instituto Politécnico Nacional, México, 1997) **1**, pp. 11-43.

- [3] Robinson, R.A. y Stokes, R.H. *Electrolyte solutions. The measurement y interpretation of conductance, chemical potential and diffusion in solutions of simple electrolytes.* (Butterworths Scientific Publications, Oxford, UK 1965).
- [4] Van de Berg, C. y Bruin, S. Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. En: *Water activity: Influences on food quality.* Rockland, L.B. y Stewart, G.F. (eds.) (Academic Press, N.Y., Londres, 1981) pp. 2-6.
- [5] Franks, F. Water activity: a credible measure of food safety and quality? *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 68-72. (1991).
- [6] Mossel, D.A.A. Water and microorganisms in foods - a synthesis. En: *Water relations of foods.* Duckworth, R.B. (ed.), (Academic Press, N.Y., Londres, 1975) pp. 347-361.
- [7] Scott, W.J. Water Relations of Food Spoilage Microorganisms. En: *Advances in Food Research.* Mraz, E.M. & Stewart, G.F. (eds.) (Academic Press, N.Y., Londres, 1957) pp 83-127.
- [8] Corry, J.E.L. The water relations and heat resistance of microorganisms. *Prog. Ind. Microbiol.* **12**, 73-80 (1973).
- [9] Beuchat, L.R. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts y molds. *J. Food Prot.* **46** (2), 135-141 (1983).
- [10] Beuchat, L.R. Influence of water activity on sporulation, germination, outgrowth, and toxin production. En: *Water activity: theory and applications to foods* Rockland LB y Beuchat L.R. (eds.) (Marcel Dekker N.Y. 1987) pp. 137-151.
- [11] Gould, G.W. Drying raised osmotic pressure and low water activity. En: *Mechanisms of action of food preservation procedures.* Gould. G.W. (ed.), (Elsevier Applied Science, Springer Netherlands, 1989) pp. 97-118.
- [12] Hocking, A.D. y Christian, J.H.B. Microbial ecology interactions in the processing of foods. En: *Fundamentals y applications of food preservation by moisture control* Barbosa-Cánovas, G. y Welti-Chanes, J. (eds.) (Technomic Publishing, Lancaster, PA, 1996) pp. 575- 602.
- [13] Chirife, J. y Buera, M.P. Water activity and glass dynamics y the control of microbial growth in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, 465-512 (1996).
- [14] Christian, J.H.B. Specific solute effects on microbial water relations. En: *Water activity: Influences on food quality.* Rockland L.B. y Stewart, J.F.V. (eds.) (Academic Press, N.Y., Londres 1981) pp. 825-854.
- [15] Slade, L. y Levine, H. Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment on food quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **30**, 115-360 (1991).
- [16] Gutiérrez, C. Abee, T. y Booth, I.R. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 233-244 (1996).
- [17] Hocking, A.D. y Pitt, J.I. Media and methods for enumeration of microorganisms with considerations of water activity. En: *Water activity:theory and applications to food.* Rockland, L.B. y Beuchat, L.R. (eds.) (Marcel Dekker, N.Y. 1987) pp. 21-25.
- [18] Beuchat, L.R. Detection and enumeration of microorganisms in hurdle technology foods, with particular considerations of foods with reduced water activity. En: *Fundamentals and applications of food preservation by moisture control.* Barbosa-Cánovas G. y Welti-Chanes, J. (eds.) (Technomic Publishing, Lancaster, PA, 1996) pp. 603- 612.
- [19] Troller, J.A. y Christian, J.H.B. *Water activity and food.* (Academic Press, N.Y., Londres, 1978).
- [20] Rockland, L.B. y Nishi, S.K. Influence of water activity on food product quality and stability. *Food Technol.* **34** (4), 42-51 (1989).
- [21] Chirife, J. An update on water activity measurements and prediction in intermediate and high moisture foods: The role of some non-equilibrium situations. En: *Fundamentals y applications of food preservation by moisture control.* Barbosa-Cánova, G. y Welti-Chanes, J. (eds.) (Technomic Publishing, Lancaster, PA, 1996) pp. 169-189.
- [22] Roa, V. y Tapia, M.S. Estimating water activity in systems containing multiple soluted based on solute properties. *J. Food Sci.* **63**, 559-564 (1998).
- [23] Scott, W.J. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C. *Aust. J. Biol. Sci.* **6**, 549-564 (1953).
- [24] Organización Mundial de la Salud (OMS). Preparación y respuesta ante emergencias. Brotes epidémicos. <https://www.who.int/csr/don/16-september-2019-listeriosis-spain/es/> (2019).
- [25] Tapia de Daza, M., Villegas, Y. y Martínez, A. Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 333337 (1991).
- [26] Leistner, L. Principles and applications of hurdle technology. En: *New methods of food preservation.* Gould, G.W. (ed.), (Springer Netherlands, 1995) pp.1-21.
- [27] Leitsner, L. y Gould, G.W. Hurdle technologies. Combination treatments for food stability, safety y quality, (Kluwer Academic/Plenum Publishers, N.Y. 2002).
- [28] Barbosa-Cánovas G.V., Tapia M.S. y Cano. M.P. *Novel food processing technologies* (CRC Press, Boca Raton FL, USA 2005).
- [29] Tapia, M.S. y Welti-Chanes, J. Hurdle technology applied in decontamination of whole and fresh-cut produce. En: *Decontamination of fresh and minimally processed produce.* Gómez-López, (ed.) (John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. 2012) pp. 417-451.

- [30] Aguilera, J.M., Chirife, J., Tapia de Daza, M.S., Welti, J., y Parada, E. *CYTEDD. Inventario de Alimentos de Humedad Intermedia Tradicionales de Iberoamérica*. (Ediciones Instituto Politécnico Nacional, México, 1990).
- [31] Tapia de Daza, M.S., Aguilera, J.M., Chirife, J., Parada, E. y Welti, J. Identification of microbial stability factors in traditional foods from Latin America and Spain. *Rev. Esp. Cien. Technol. Alimentos* **34** (2), 145-163 (1994).
- [32] Welti, J., Tapia de Daza, M., Aguilera, J. M., Chirife, J., Parada, E., LopezMalo, A., López, L. y Corte, P. Classification of intermediate moisture foods consumed in Iberoamerica. *Rev. Esp. Cien. Technol. Alimentos* **34** (1), 53-63 (1994).
- [33] Parada Arias, E., Aguilera, J.M., Chirife, J., Tapia, M.S., y Welti-Chanes, J. Alimentos de humedad intermedia. *Cuad. Nutr.* **18** (3), 21-28 (1994).
- [34] Jayaraman, K.S. Development of intermediate moisture tropical fruit and vegetable products: Technological problems and prospects. En: *Food preservation by moisture control*. C.C. Seow (ed.), (Elsevier Applied Science Publishers, Londres, 1988) pp. 175-187.
- [35] Tapia de Daza, M.S., Aguilar, C.E., Roa, V. y Díaz de Tablante, R.V. Combined stress factors on growth of *Zygosaccharomyces rouxii* from an intermediate moisture papaya product. *J. Food Sci.* **60** (2), 356-359 (1995).
- [36] Leistner, L. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. En: *Properties of water in foods*. Simatos, D. y Multon, J.L. (eds.) (Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1985) pp. 309-321.
- [37] Alzamora, S.M., Guerrero, S., Nieto, A.B. y Vidales, S. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de capacitación. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria (AGST). Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura (AGS). <http://www.fao.org/3/y5771s/y5771s00.htm#Contents>. (2004).
- [38] Díaz de Tablante, R.V., Tapia de Daza, M.S., Montenegro, G., y González, I. High moisture mango and papaya products stabilized by combined methods. *CYTED-D, Bolet. Divulg.* **1**, 5-21 (1993).
- [39] Welti-Chanes, J., Alzamora, S.M., López-Malo, A. y Tapia, M.S. Minimally processed fruits using hurdle technology. En: *Food preservation technologies: innovations in food processing* Barbosa-Cánovas, G.V. y Gould, G.W. (eds.) (Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster PA, USA, 2004) pp. 123-148.
- [40] Tapia de Daza, M.S., Alzamora, S.M. y Welti-Chanes, J. Minimally processed high moisture fruit products by combined methods. Results of a multinational project. En: *Food engineering* 2000. Fito, P., Barbosa-Cánovas, G. y Ortega, E. (eds.) (Chapman y Hall, Londres, UK, 1996) pp. 161-180.
- [41] Welti-Chanes, J., Alzamora, S.M., López-Malo, A., Tapia M.S., Barbosa-Canovas, G.V. y Parada-Arias, E. Role of water in the stability of minimally or partially processed foods. En: *Water management in the design and distribution of quality foods*. Roos, Y.H., Leslie, R.B. y Lillford, P.J. (eds.) (Technomic Publishing, Lancaster, PA, USA, 1999) pp. 503-534.
- [42] Alzamora, S.M., Tapia, M.S., Leúnda, A., Guerrero, S. y Rojas, A.M. Relevant results on minimal preservation of fruits in the context of the multinational project XI-3 of CYTED, an Ibero-American R&D Cooperative Programme. En: *Trends in Food Engineering*. Lozano, J. y Añón, M.C. (eds.) (Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA, 2000) pp. 205-222.
- [43] Martínez, A., Díaz, R.V. y Tapia, M.S. Microbial ecology of spoilage and pathogenic flora associated to fruit and vegetables. En: *Minimal processing of fruit y vegetables. fundamental aspects and applications*. Alzamora, S.M., Tapia, M.S. y López-Malo, A. (eds), (Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA, 2000) pp. 42-61.
- [44] Alzamora, S.M., Tapia M.S., López-Malo, A. y Welti-Chanes, J. The control of water activity. En: *Food preservation techniques*. Zeuthen, P. y Bogh-Sorensen, L. (eds.) (CRC Press, Boca Raton FL, USA, 2003) pp. 126-153.
- [45] Alzamora, S.M., Tapia de Daza, M.S., Argaíz, A. y Welti, J. Application of combined methods technology in minimally processed fruits. *Food Res. Int.* **26**, 125-130 (1993).
- [46] Tapia de Daza, M.S., Alzamora, S.M. y Welti, J. Combination of preservation factors applied to minimal processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36** (7), 629-659 (1996).
- [47] Alzamora, S.M., Tapia, M.S. y Welti-Chanes, J. New strategies for minimal processing of foods: the role of multitarget preservation. *Food Sci. Technol. Int.* **38** (5), 353-361 (1998).
- [48] Barbosa-Cánovas, G.V., Fernández-Molina, J.J., Alzamora, S.M., Tapia, M.S., López-Malo, A. y Welti-Chanes, J. Harvesting, handling, y preservation of fruits and vegetables by combined methods at rural and villages levels. (*Technical Manual*. FAO Agricultural Services. Bulletin 149, 2003). <http://www.fao.org/3/y4358e/y4358e00.htm#Contents>.
- [49] Alzamora, S.M., Tapia, M.S. y López-Malo, A. (eds.) *Minimal processing of fruit and vegetables. fundamental aspects and applications*. (Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA, 2000).
- [50] Ingram, M. Yeasts in food spoilage. En: *The chemistry and biology of yeasts*. Cook, A.H. (ed.), (Academic Press, Londres, 1958) pp. 603-633.

- [51] Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W. y Baird, R.M. *Handbook of culture media for food microbiology* (Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands 2003).
- [52] Hocking, A.D. y Pitt, J.I. Dichloran–glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *App. Environ. Microbiol.* **39**, 488-492 (1980).
- [53] Beuchat, L.R. y Tapia de Daza, M.S. Evaluation of chemicals for restricting colony spreading by a xerophilic mold, *Eurotium amstelodami*, on dichloran glycerol (DG18) agar. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (6), 2093-2095 (1992).
- [54] Tapia de Daza, M.S. y Beuchat, L.R. Suitability of modified glycerol (DG18) agar for enumerating unstressed and stressed xerophilic molds. *Food Microbiol.* **9**, 319-333 (1992).
- [55] Deak, T., Chen, J., Golden, D., Tapia, M.S., Tornai-Lehoczki, J., Viljoen, B.C., Wyder, M.T. y Beuchat, L. Comparison of dichloran glycerol 18 (DG18) agar with general purpose mycological media for enumerating food-spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **67**, 49-53 (2001).
- [56] Roa, V. y Tapia de Daza, M. Evaluation of water activity measurements with a dew point electronic humidity meter. *Lebensmittel-Wiss Technol.* **24**, 208-213 (1991).
- [57] Norrish R.S. An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1** (1), 25-39 (1966).
- [58] Chirife, J. Prediction of water activity in intermediate moisture foods. *J. Food Technol.* **13**, 417 (1978).
- [59] Pitzer, K.S. y Mayorga, G. Thermodynamics of electrolytes. II. Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *Journal Phys. Chem.* **77**, 2300 (1973).
- [60] Robinson, R. A. y Stokes, R. H. *Electrolyte solutions; the measurement y interpretation of conductance, chemical potential, and diffusion in solutions of simple electrolytes* (Butterworths Scientific Publications, Oxford, UK, 1968).
- [61] Bromley, L.A. Thermodynamic properties of strong electrolytes in aqueous solutions. *AIChE J.* **19** (2), 313-320 (1973).
- [62] Favetto G.J. y Chirife, J. Simplified method for the prediction of water activity in binary solutions. *J. Food Technol.* **20**, 631-636 (1985).
- [63] Ross, K.D. Estimation of water activity in intermediate moisture foods. *Food Technol.* **29**, 26 (1975).
- [64] Vega-Mercado, H. y Barbosa-Cánovas, G.V. Prediction of water activity in food systems: A review on theoretical models. *Rev. Esp. Cien. Technol. Alimentos* **34**, 368-388 (1994).
- [65] Teng, T.T. y Seow, C.C. A comparative study of methods for prediction of water activity of multicomponent aqueous solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **16** (4), 409-419 (1981).
- [66] Chirife, J., Ferro Fontan, C. y Benmergui, E.A. The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods IV. a_w prediction in aqueous non electrolyte solutions. *J. Food Sci. Technol.* **15** (1) 59-70 (1980).
- [67] Correa, A., Comesaña, J.F. y Sereno, A.M. Measurement of water activity in water-urea-“sugar” and water-urea-“polyol” systems, and its prediction by the ASOG group contribution method. *Fluid Phase Equilib.* **98**, 189-199 (1994).
- [68] Teng, T.T. y Lenzi, F. Water activity data. Representation of aqueous solutions at 25°C. *Can. J. Chem. Eng.* **52**, 387 (1974).
- [69] Catté, M., Dussap, G.G. y Gros, J.B. A physical chemical UNIFAC model for aqueous solutions of sugars. *Fluid Phase Equilib.* **105**, 1-25 (1995).
- [70] Sereno, A.M., Hubinger, M.D., Comesaña, J.F. y Correa, A. Prediction of water activity of osmotic solution. *J. Food. Eng.* **49**, 2-3 (2001).