



**CHEMITAL**  
TÉCNICAS ALIMENTARIAS

# Aplicación de ácidos orgánicos como conservantes en productos cárnicos

**Javier García Pina**  
**Chemital s.a**

## Introducción

El **pH** y el **contenido en ácidos orgánicos** de un alimento son dos factores que determinan, no sólo los microorganismos que pueden sobrevivir durante el período de almacenamiento sino también su capacidad para alterar dicho alimento.

A “grosso modo” tanto los microorganismos capaces de alterar un alimento como los de producir intoxicaciones, se desarrollan en un rango de pH comprendido entre **4,0 y 8,0** si bien mohos y levaduras pueden crecer y desarrollarse a un pH más bajo.

El pH de un alimento puede bajarse artificialmente añadiendo cantidades significativas de ácido (acético, cítrico, láctico,...) con el fin de limitar el crecimiento microbiano.

El efecto combinado de un pH bajo, más una concentración más o menos elevada de un ácido débil, conduce a una acidificación del citoplasma, usualmente suficiente para restringir el desarrollo microbiano, junto con otros efectos más específicos en la actividad celular.

Las soluciones ácidas contienen concentraciones elevadas de protones, tal que  $H^+$  y  $H_3O^+$ . En el caso de ácidos fuertes nos encontramos también con aniones ( $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ , ...) y moléculas no disociadas en el caso de ácidos débiles. De hecho todo ello puede afectar a las células microbianas, bien individualmente, o en combinación.

Diferenciar, a nivel de efectividad, entre pH y acción de los ácidos débiles es importante. Así, mohos y levaduras pueden crecer en pH muy bajos en soluciones de ácidos fuertes, pero no en las de ácidos débiles.

## Descenso del pH exterior por adición de ácidos fuertes inorgánicos

Los ácidos fuertes están totalmente disociados en valores de pH próximos a la neutralidad, y ejercen su efecto únicamente por la concentración de protones. Las estructuras celulares que pueden verse afectados serían las membranas y estructuras externas, y proteínas de la membrana plasmática.

Los protones no pueden pasar prácticamente a través de las membranas de fosfolípidos, ya que tienen una alta densidad de carga, y son insolubles en lípidos. Cuando atraviesan dicha membrana lo hacen muy lentamente, posiblemente a través de "canales de agua" o bien acoplándose a ácidos grasos libres. A modo de resumen se puede decir que los ácidos fuertes no afectan al pH citoplasmático ( $pH_i$ ).

## Propiedades de los ácidos orgánicos y ésteres

Vamos a considerar cuatro:

- **El valor  $pK_a$**
- **El coeficiente de reparto**
- **La solubilidad**
- **La volatilidad**

## El valor $Pk_a$

En solución los ácidos débiles no están totalmente disociados en sus iones, sino que hay un equilibrio entre las moléculas de ácido sin carga, y sus respectivos aniones y cationes.



La proporción de ácido/anión es dependiente del pH, y así a pH bajo, la alta concentración de protones dará lugar a una mayor proporción de moléculas de ácido y a menos aniones. El  $pK_a$  es el pH al que las concentraciones de ácido y anión son iguales. Para varios ácidos se asume que sólo la parte no disociada tiene capacidad antimicrobiana, de acuerdo a ello en valores de pH elevados, superiores al valor de  $pK_a$  es de esperar que cualquier acción antimicrobiana sea débil.

## Coeficiente de reparto, $\log P_{\text{oct}}$

Este coeficiente es la medida del carácter lipófilo de un compuesto.  $\log P_{\text{oct}}$ , es el logaritmo de la distribución entre el octanol y el agua. Así un  $\log P_{\text{oct}}$  de 1,0 indica que el compuesto se distribuye 10 veces más en octanol. Los productos con valores negativos de  $\log P_{\text{oct}}$  son los solubles en agua. Aunque las membranas de los microorganismos no están compuestas por octanol, el  $\log P_{\text{oct}}$ , es un buen parámetro del reparto de agentes antimicrobianos en las membranas microbianas.

El coeficiente de reparto también es un buen indicador de la efectividad de conservantes en alimentos con alto contenido en grasa ya que si son altamente hidrofóbicos se disolverán más en la fase lipídica, lo que conducirá a un descenso de la concentración efectiva.

Los valores del  $\log P_{\text{oct}}$  de los aniones, debido a su carga negativa, es dos veces inferior al de su ácido correspondiente, es decir que son menos hidrofóbicos.

## Solubilidad

La solubilidad de un compuesto orgánico también se puede deducir de su coeficiente de reparto y así, o más hidrofobicidad, menos solubilidad en agua. La solubilidad de los ácidos orgánicos varía con el pH, y así a pH más bajos, menor es la solubilidad.

Los problemas que a veces plantea la solubilidad limitada de un compuesto se puede paliar en parte con agitación mecánica.

## Volatilidad

En sistemas experimentales, a veces la ausencia de actividad antimicrobiana detectable puede haber sido causada por la agitación en un cultivo aeróbico con agitación. Esto sucede de manera particular con productos tales como el metil-acetato.



## Mecanismos de acción antimicrobiana

Los podemos agrupar en cuatro apartados:

- **Acidificación del medio externo**
- **Acidificación del citoplasma**
- **Acción sobre los lípidos y proteínas de las membranas**
- **Quelación de metales**
- **Acción sobre el metabolismo**

## Acidificación del medio externo

Tal vez el efecto antimicrobiano más obvio de la adición de ácidos orgánicos a alimentos y bebidas sea aumentar la concentración de protones conduciendo a un descenso del pH.

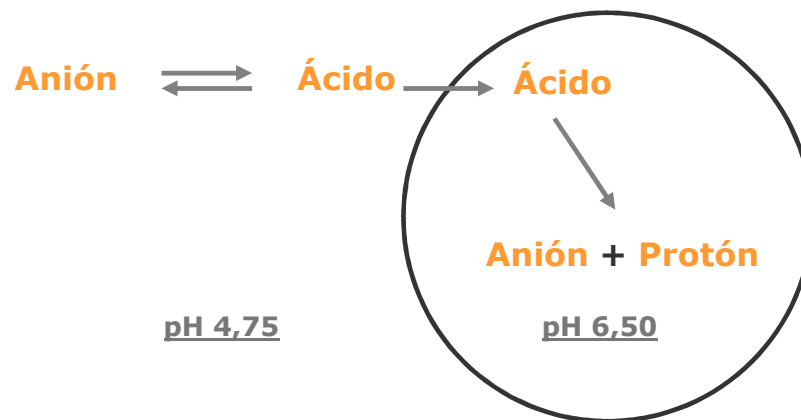
Cada especie/cepa microbiana sólo puede desarrollarse entre unos valores determinados de pH. Si el pH cae por debajo de este intervalo, se inhibe el crecimiento y el microorganismo puede morir.

- pH<4,0 Inhibición de desarrollo vegetativo
- pH<4,5 Inhibición de germinación de esporas
- Mohos y levaduras pueden desarrollarse a pH = 1,6

El pH mínimo para el crecimiento microbiano son más bajos cuando se utilizan como acidulantes ácidos fuertes vs. ácidos débiles. Ello hace presuponer que en la inhibición por ácidos orgánicos existen otros mecanismos, además del descenso del pH del medio.

## Acidificación del citoplasma. La teoría clásica del ácido débil

Los ácidos orgánicos en solución están en un equilibrio, dependiente del pH, entre las moléculas de ácido y su anión correspondiente. La proporción de ácido no dissociado se incrementa conforme baja el pH. Dado que la actividad antimicrobiana aumenta a medida que baja el pH, es plausible pensar que es la parte no dissociada la que tiene capacidad antimicrobiana.



La disociación del ácido libera protones.

Consecuencias:

- Disminución del  $pH_i$
- Inhibición de la glicólisis
- Inhibición transporte activo

Esta teoría de los ácidos no puede ser aplicada:

- Para ácidos insuficientemente hidrofóbicos (succínico, tartárico o cítrico...)
- Cuando se utilizan a concentraciones bajas
- Cuando el  $pH$  externo es elevado

## Acción en lípidos y proteínas de membranas

Los ácidos grasos saturados tienen actividad antimicrobiana, que aumenta conforme aumenta la longitud de su cadena, que se asocia al aumento de carácter lipófilo-hidrofobo.

El aumento del coeficiente de reparto log Poct. es un indicador de la velocidad de paso al interior celular y de la acumulación del compuesto en la fracción lipídica de la membrana (valores superiores a 4,0).

Los ácidos lipofílicos penetran en el citoplasma por difusión simple, si bien en cierta circunstancia pueden penetrar por transporte activo.

La fluidez de la membrana es finalmente regulada por los microorganismos especialmente como respuesta a la temperatura. Concentraciones significativas de compuestos lipofílicos influyen en la fluidez de la misma, incrementando la permeabilidad a protones e iones metálicos, y originando una curvatura mayor lo que conduce a la formación de una "fase de malla" transitoria, más porosa.

## Quelación de metales

La quelación de metales es un fenómeno propio de todos los ácidos orgánicos, si bien a veces con poca afinidad. Los cationes metálicos forman complejos con los aniones cargados negativamente. Estos complejos son prácticamente insolubles y precipitan (por ejemplo: citrato de calcio, lactato de calcio, en vino).

La capacidad quelante se mide por la cte. de estabilidad, que es el log. de la cte. de equilibrio, e indica la afinidad del catión metálico por el anión.

En los ácidos orgánicos, a más grupos carboxílicos, mas capacidad de quelación.

La quelación de metales depende de la presencia de la forma aniónica, a su vez dependiente del pH.

Como mecanismo inhibitorio, este se debe a:

- Eliminación de iones metálicos del medio.
- Eliminación de cationes de la pared/membrana del microorganismo.

La eliminación de iones metálicos de las paredes celulares en bacterias gram negativas, las hace más sensibles a diferentes antibióticos, QAC<sub>s</sub>, ...

## Acción sobre el metabolismo

Además de los efectos ya señalados, los ácidos en general son moléculas reactivas, a las que se ha atribuido una serie de acciones específicas en procesos tales que la respiración, fermentación y en enzimas específicos.

La inhibición del metabolismo en general puede ser consecuencia de la acumulación de aniones.

Se ha sugerido que la acumulación de aniones sería la causa de las diferencias en toxicidad observadas en diferentes ácidos.

## Ácidos orgánicos de cadena corta como agentes antimicrobianos

Consideramos ácidos orgánicos de cadena corta los ácidos fórmico, acético, propiónico, butílico y benzoico.

Para que estos ácidos actúen como agentes antimicrobianos, deben:

- Pasar libre y rápidamente a través de la membrana en su forma no disociada.
- Liberar suficientes protones en el citoplasma como para impactar significativamente en el pH citoplasmático, generalmente tamponado por la cadenas de aminoácidos de las proteínas.

Estos ácidos se difunden de manera libre y rápida en las células microbianas, y alcanzan su máxima concentración en 1 min. (aprox.). Cuando se ha llegado a la máxima acumulación se establece un flujo en los dos sentidos entre el interior y el exterior celular.

En cuanto a la liberación de protones esta dependerá de:

- a) Del valor  $pK_a$  del ácido
- b) De la concentración
- c) Del pH del medio

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$



Las concentraciones de estos ácidos que se requieren para inhibir el crecimiento de microorganismos acostumbran a ser altos, del orden del 1 al 4%, siendo el pH del medio del orden de 3 a 4,5.

Así, a modo de ejemplo, se necesita una concentración del 1% de ácido acético, a un pH de 4,0 para inhibir mohos, levaduras y bacterias ácido tolerantes.

## Espectro antimicrobiano en medios de cultivo de los ácidos orgánicos utilizados en los alimentos

Concentraciones de ácido no disociado precisas para la inhibición del crecimiento de la mayor parte de cepas

Ácido Orgánico	Levaduras	Mohos	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Bacillaceae</i>
Ácido acético	0,5	0,1	0,05	0,05	0,1
Ácido benzoico	0,05	0,1	0,01	0,01	0,02
Ácido cítrico	>0,005 <sup>d</sup>	>0,005	>0,005	>0,001 <sup>d</sup>	>0,005
Ácido láctico	>0,01	>0,02	>0,01	>0,01	>0,03
Metil paraben	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2
Etil paraben	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1

De Chichester y Tanner, 1972 y de datos no publicados de S. Warren y B. Freame.  
Valores expresados como porcentaje en la solución.

### Proporción de ácido no disociado a diferentes valor de pH

Ácidos Orgánicos	Valores de pH				
	3	4	5	6	7
Ácido acético	98,5	84,5	34,9	5,1	0,54
Ácido benzoico	93,5	59,3	12,8	1,44	0,144
Ácido cítrico	53,0	18,9	0,41	0,006	<0,001
Ácido láctico	86,6	39,2	6,05	0,64	0,064
Metil, Etil y propil parabens <sup>b</sup>	>99,99	99,99	99,96	99,66	96,72

Valores expresados en %

La inhibición es causada por descenso del pH interno, lo que conduce a su vez a la inhibición de la respiración, fermentación/glicólisis y transporte activo.

Todos estos efectos son reversibles, simplemente lavando las células.

En relación al pH externo, hay que considerar:

- 1) Su efecto en la proporción de ácido no disociado.
- 2) El pH diferencial entre el citoplasmático y el del medio que determina el grado al que los conservantes se concentran en el citoplasma, lo que determina a su vez la concentración de protones liberada en el mismo.
- 3) El pH por si mismo actúa directamente sobre el microorganismo.

También, como posible mecanismo del efecto sobre la fase estacionaria (alargándola), se ha propuesto que la bomba de protones  $-H^+$ - ATP asa, es activada a bajo pH.

## Ácidos de cadena media-corta, como agentes antimicrobianos

Ácidos valérico, hexanoico, heptanoico y sórbico.

La cantidad necesaria de estos ácidos para causar inhibición, son sustancialmente más pequeñas que la de los ácidos de cadena corta, como el acético. Ello sugiere que su acción no puede ser totalmente atribuible a la simple acidificación del citoplasma. Si se comparan las CMI de estos ácidos, con los del acético, vemos que son mucho más bajos, y el  $pK_a$  es prácticamente el mismo.

La acción de estos ácidos se debe a su capacidad de provocar una pérdida y disipación de la energía que la célula necesita para su propio metabolismo.

La inhibición está influenciada por su grado de hidrofobicidad, lo que sugiere una posible acción sobre la membrana, que podría conducir, entre otras, a una mayor permeabilidad de protones, y a un cambio en la fluidez de la misma.

## Ácidos de cadena media-larga, como agentes antimicrobianos

Ácidos octanoico, nonanoico. Decanoico, undecanoico y laúrico.

La acción inhibitoria de estos ácidos no puede ser debida a su acción sobre el pH citoplasmático ya que no liberan suficientes protones.

Las moléculas no disociadas de estos ácidos pasan muy rápidamente a través de las membranas biológicas, con valores  $t_{1/2} < 1\text{seg}$

Su acción sería sobre la membrana, alterando su fluidez y estructura, en una forma parecida a la de los detergentes.

## Interferencia de la cadena transportadora de electrones

Esta acción puede ser promovida por:

- Vinculación con los transportadores de electrones.
- Inserción entre los transportadores, previniendo su interacción.
- Desplazamiento de los transportadores de su ubicación en la membrana.

## Interferencia con la fosforilación oxidativa

Fenómeno debido a:

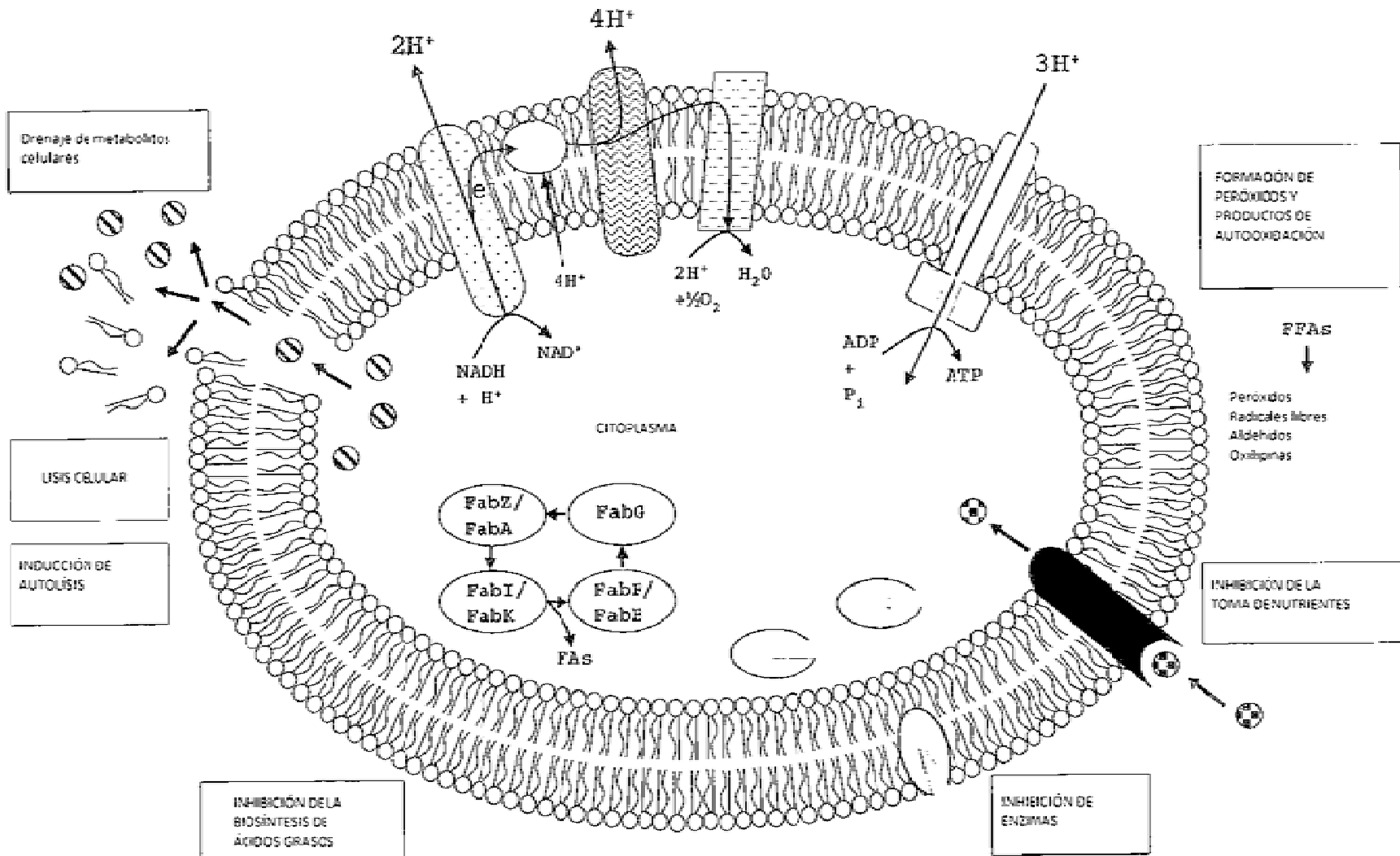
- Impedir el funcionamiento correcto de la ATP sintetasa al desplazarla, bien en parte o totalmente de la membrana .
- Reducir el gradiente de protones/potencial membrana al incrementar la permeabilidad de la misma a protones o a los mismos FFAs, que se disociarán en el interior celular.



Posiblemente estos ácidos puedan sustituir la de la membrana de fosfolípidos (fundamentalmente en levaduras), dando lugar a un cambio en la estructura de la misma.

Es probable que todos los ácidos grasos tengan tres acciones que actúan en diferente proporción ya diferente concentración según el tipo de ácidos. Estas tres actividades serían:

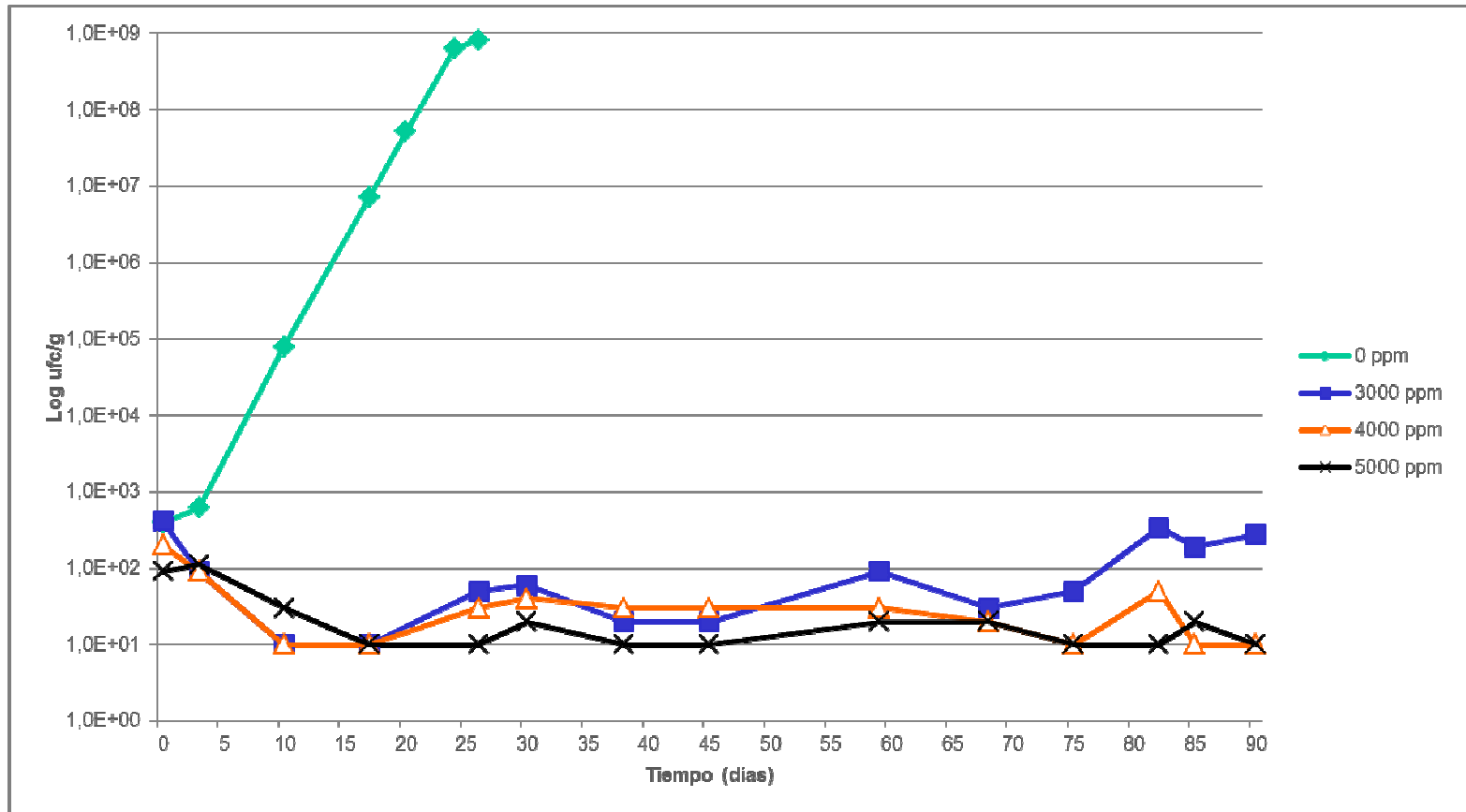
- a) Ruptura de la membrana, provocando la muerte.
- b) Inhibición del crecimiento por descenso del pH interno.
- c) Agotamiento energético, al actuar sobre la membrana celular.



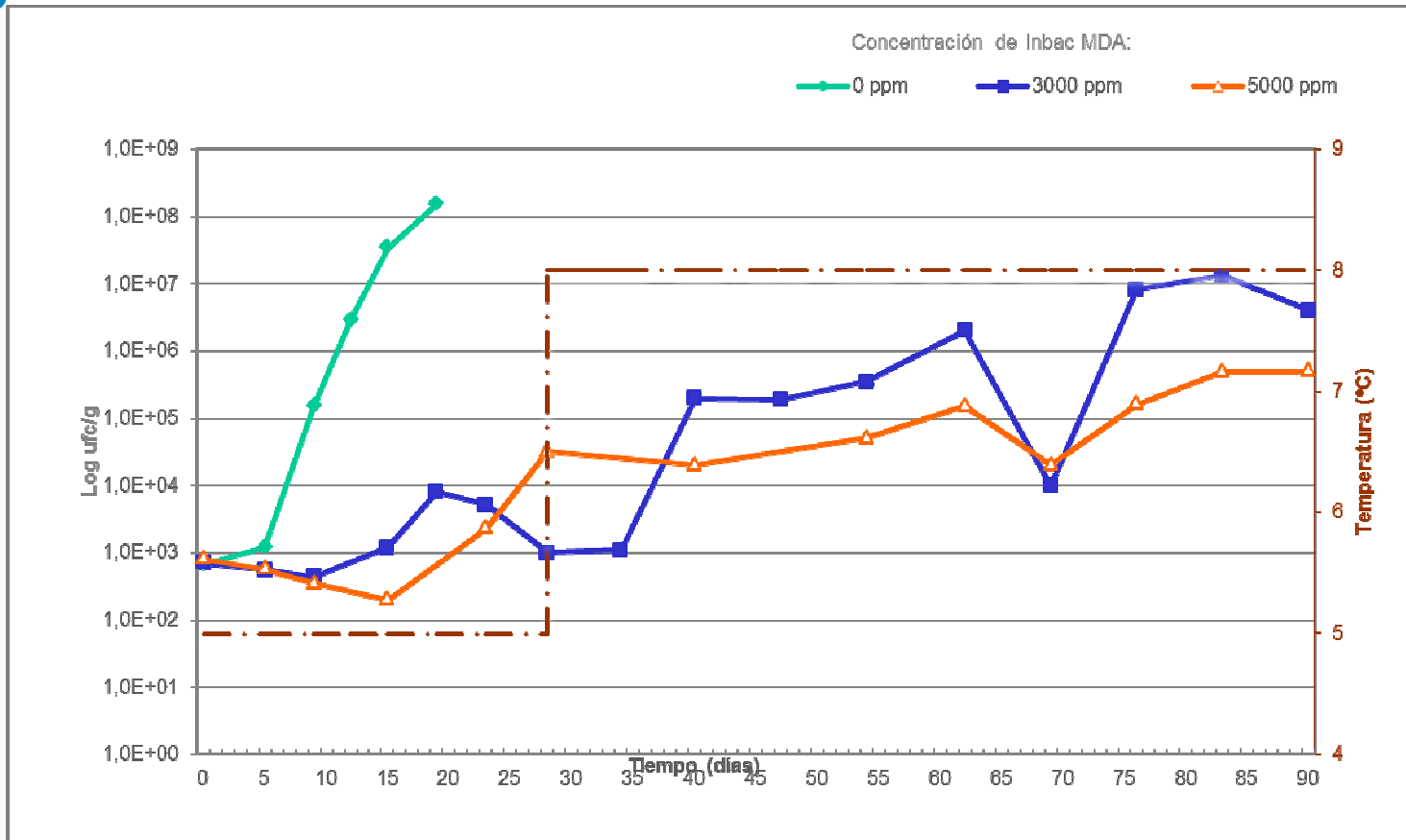
## INBAC-MDA

Producto con acción bacteriostática de uso universal en alimentos elaborados, a base de diacetato sódico, ácido málico y mono y diglicéridos de ácidos grasos.

INBAC-MDA actúa sobre la membrana citoplasmática, desorganizando su estructura y alterando su funcionalidad.



Evolución de las cepas de *Listeria monocytogenes* sobre mortafela formulada con distintas concentraciones de Inbac MDA.



•Resultado del challenge test realizado a las tres formulaciones de mortadela con distinta concentración de Inbac MDA con bacterias acidolácticas (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*).

La contaminación superficial en productos cárnicos tratados por el calor, y posteriormente envasados en atmósfera modificada, es una de las principales causas de la alteración organoléptica (acidificación, formación de gas, aparición de gas, aparición de líquido,...) que puede sufrir un producto a lo largo de su vida comercial.

Dicha contaminación, previa al proceso de envasado, puede proceder del medio ambiente, de la manipulación, de la maquinaria y del método de trabajo.

En casos extremos dicha contaminación puede dar lugar a la formación de biofilms, biopelículas que protegen e incrementan la resistencia de los microorganismos formadores de los mismos, siendo necesario el empleo de conservantes-desinfectantes para eliminarlos.

Si bien de manera no excluyente, entre los géneros bacterianos implicados en esta alteración podemos considerar los siguientes: ***Lactobacillus***, ***Pseudomonas***, ***Listeria***, ***Bacillus***, ***Escherichia***.

## ARTICOAT

Mezcla sinérgica de ácidos orgánicos, diseñado como un producto de recubrimiento de **aplicación externa** con el fin de reducir la contaminación superficial e inhibir el desarrollo de la misma, permitiendo así que el alimento mantenga sus cualidades organolépticas a lo largo de su vida útil.

## Estudio de aplicación

### Productos de recubrimiento de aplicación externa

- **ARTICOAT:** Mezcla de ácidos orgánicos, excipientados en polisacáridos.
- SOLUCIÓN ISOTÓNICA.

### Productos cárnicos

- Salchichas tipo frankfurt envasadas al vacío.
- Jamón cocido loncheado y envasado al vacío.

### Microorganismos inoculados superficialmente

• *Lactobacillus sp.*

• *Pseudomonas sp.*

• *Listeria monocytogenes*

• *Bacillus sp.*

• *Escherichia coli*



**Productos tras ser inoculados, sin tratamiento superficial**

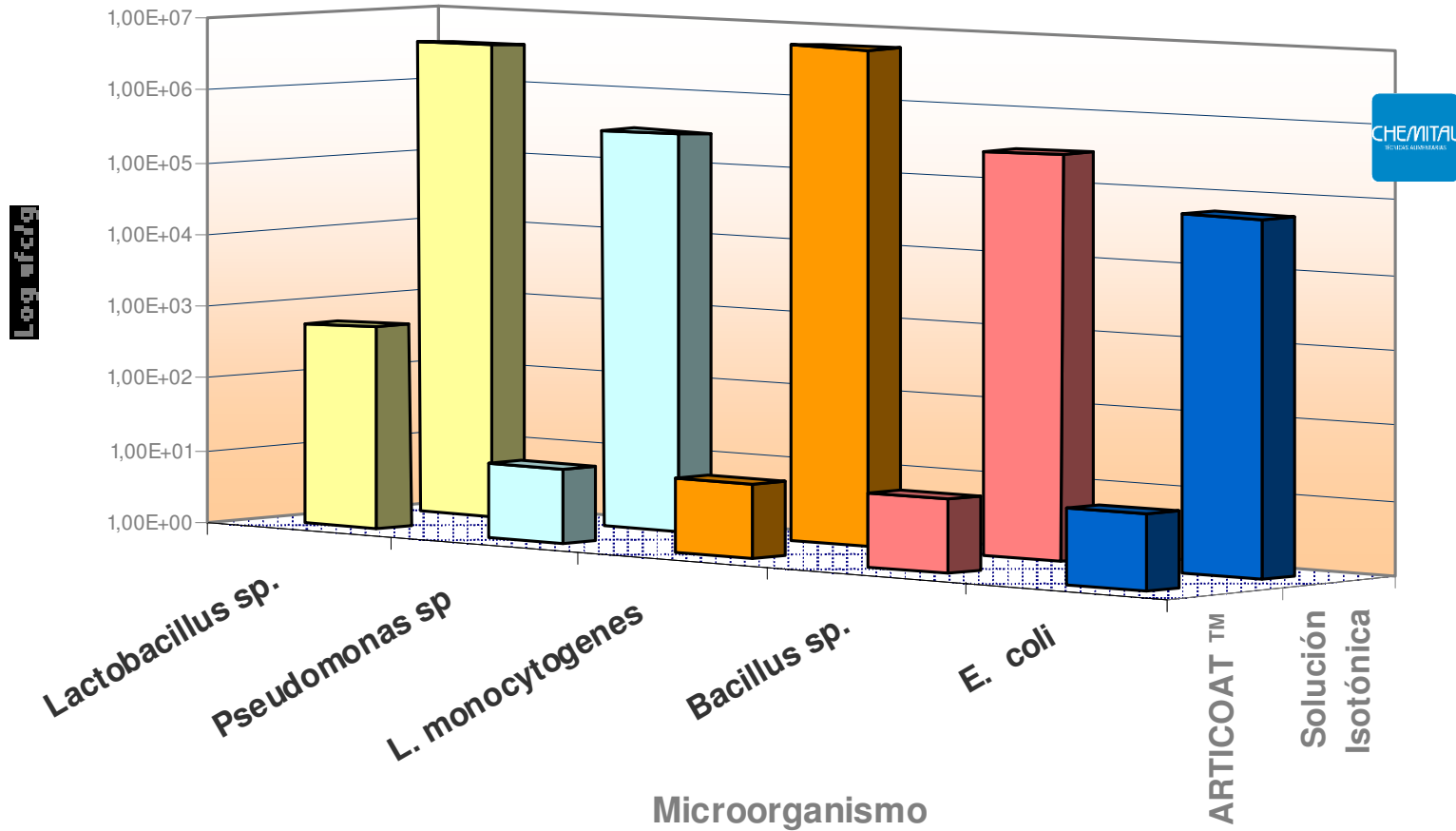
<b>Microorganismos</b>	<b>SALCHICHA</b>	<b>JAMON COCIDO</b>
<i>Lactobacillus sp.</i>	2 x 10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>
<i>Pseudomonas sp</i>	7 x 10 <sup>4</sup>	6 x 10 <sup>4</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	6 x 10 <sup>4</sup>	7 x 10 <sup>4</sup>
<i>Bacillus sp.</i>	3 x 10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>
<i>E. coli</i>	5 x 10 <sup>4</sup>	6 x 10 <sup>4</sup>

**Productos con tratamiento superficial, y tras un período de almacenaje a 4-5°C**

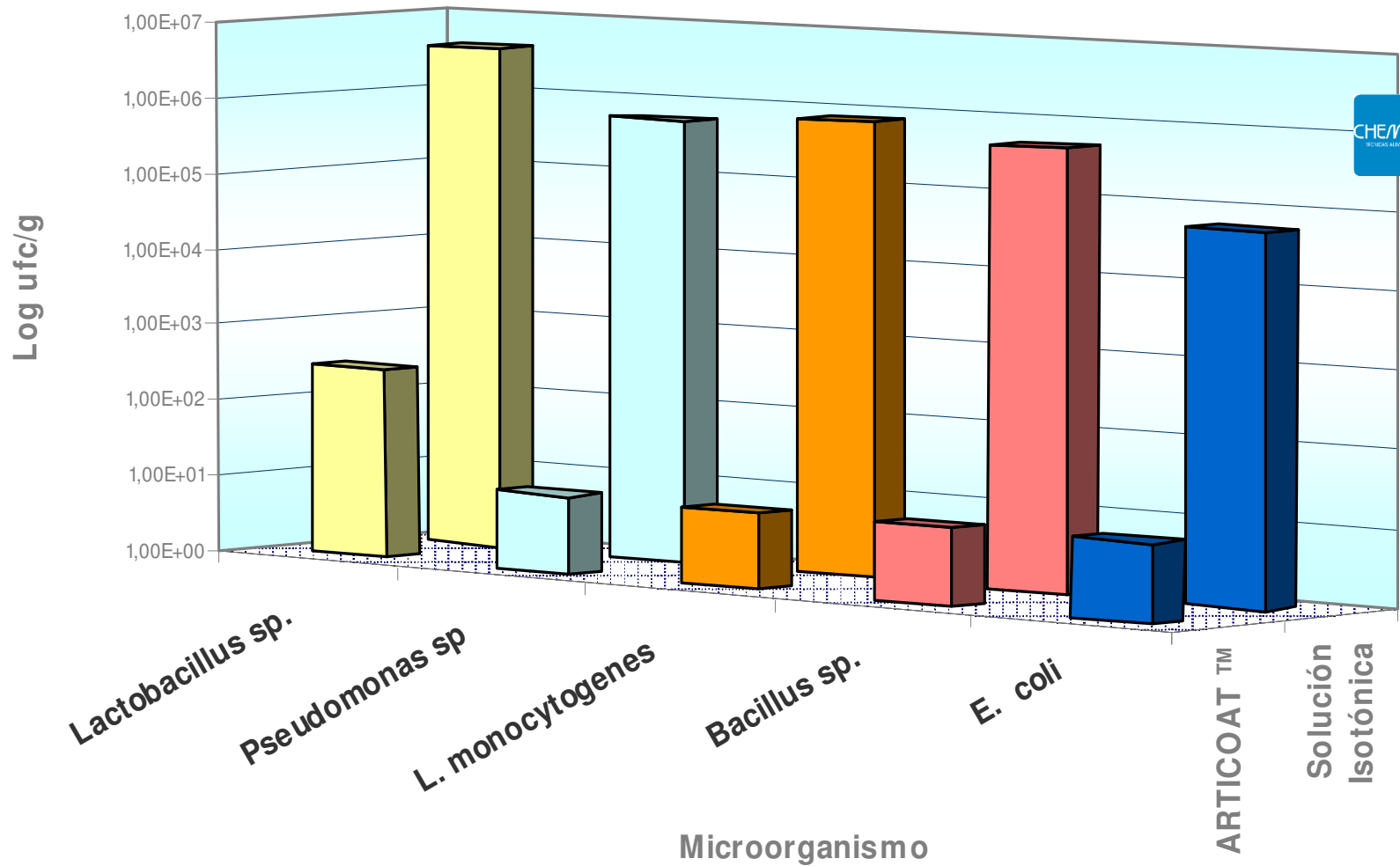
Cuatro días de almacenaje a 4-5°C

PRODUCTO TRATAMIENTO SUPERFICIAL MICROORGANISMOS	SALCHICHA		JAMON COCIDO	
	SOLUCIÓN ISOTÓNICA	ARTICOAT	SOLUCIÓN ISOTÓNICA	ARTICOAT
<i>Lactobacillus sp.</i>	3,8 x 10 <sup>6</sup>	<b>4 x 10<sup>2</sup></b>	4 x 10 <sup>6</sup>	<b>2 x 10<sup>2</sup></b>
<i>Pseudomonas sp</i>	3 x 10 <sup>5</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>	6 x 10 <sup>5</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>
<i>L. monocytogenes</i>	6 x 10 <sup>6</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>	8 x 10 <sup>5</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>
<i>Bacillus sp.</i>	3 x 10 <sup>5</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>	5 x 10 <sup>5</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>
<i>E. coli</i>	6 x 10 <sup>4</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>	6 x 10 <sup>4</sup>	<b>&lt;10<sup>2</sup></b>

**Resultados en salchichas a los 4 días.**



**Resultados en jamón cocido a los 4 días.**

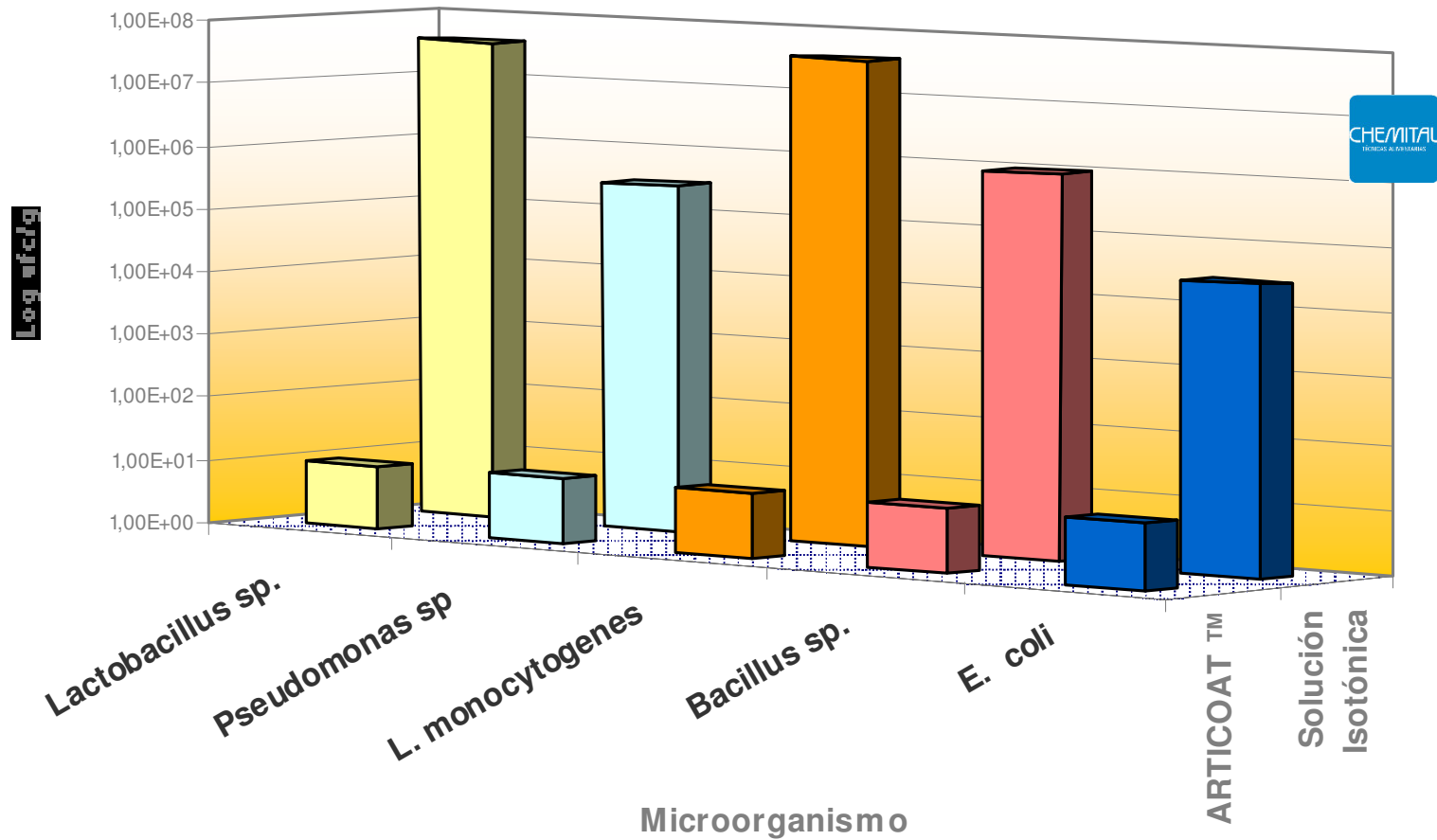


**Productos con tratamiento superficial, y tras un período de almacenaje a 4-5°C**

Veinte días de almacenaje a 4-5°C

PRODUCTO	SALCHICHA		JAMON COCIDO	
TRATAMIENTO SUPERFICIAL	SOLUCIÓN ISOTÓNICA	ARTICOAT	SOLUCIÓN ISOTÓNICA	ARTICOAT
MICROORGANISMOS:				
<i>Lactobacillus sp.</i>	4 x 10 <sup>7</sup>	<10 <sup>2</sup>	2 x 10 <sup>8</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas sp</i>	3 x 10 <sup>5</sup>	<10 <sup>2</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	4 x 10 <sup>7</sup>	<10 <sup>2</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>Bacillus sp.</i>	1 x 10 <sup>6</sup>	<10 <sup>2</sup>	8 x 10 <sup>5</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	3 x 10 <sup>4</sup>	<10 <sup>2</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>	<10 <sup>2</sup>

**Resultados en salchichas a los 20 días.**



**Resultados en jamón cocido a los 20 días.**

