2. Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos

JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

1. LA ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS EN EL CONTEXTO DE LA HIGIENE ALIMENTARIA

Los consumidores demandan alimentos con una calidad cada vez mayor y esperan que esa calidad se mantenga durante el periodo entre su adquisición y su consumo. En nuestra vida cotidiana, se escucha con frecuencia decir que un alimento se ha "*alterado*" o "*deteriorado*". Y, sin embargo, el término "*alteración*" tiene, hasta cierto punto, una gran carga de subjetividad; así, un alimento en fase de deterioro que resulta repugnante para una persona puede constituir toda una exquisitez para otra.

En un sentido amplio, "*alteración*" es cualquier cambio en un alimento que le convierte en inaceptable para el consumidor, ya sea por cuestiones relacionadas con la calidad o con la seguridad. En consecuencia, el término "*vida útil*" se define como el tiempo en el que un alimento conservado en unas condiciones determinadas reúne tres condiciones: 1) es seguro; 2) mantiene unas características químicas, físicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas; y 3) cumple las especificaciones nutricionales declaradas en su etiquetado (1).

Tradicionalmente, se ha considerado que la Higiene de los Alimentos debe velar por el cumplimiento de estos tres aspectos ya que, de hecho, su misión fundamental es garantizar que los alimentos sean aptos para el consumo humano. Sin embargo, la actual normativa europea relativa a la higiene de los productos alimenticios (el conocido "*paquete de higiene*") considera "*apto*" como sinónimo de "*seguro*" o "*inocuo*". Desde este punto de vista, la función de la

Higiene de los Alimentos sería garantizar la seguridad alimentaria. Se trata de una visión demasiado restrictiva ya que ignora la función del higienista en otros aspectos que resultan fundamentales para la aceptación de los alimentos, entre los que destaca la prevención y control de las alteraciones.

Todos los alimentos se alteran si no se consumen en un tiempo prudencial y/o si no se conservan en unas condiciones adecuadas. El Código Alimentario Español define "*alimento alterado*" como todo aquel "*que durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o tenencia, y por causas no provocadas deliberadamente, sufre variaciones en sus caracteres organolépticos, composición química o valor nutritivo de tal forma que la aptitud para el consumo queda anulada o disminuida, aunque permanezca inocuo*". Como se desprende de la definición, un alimento alterado puede ser inocuo pero no apto para el consumo. Por el contrario, también puede suceder que un alimento con unas propiedades sensoriales y nutricionales adecuadas represente un riesgo para la salud pública (Figura 1).

De las palabras anteriores se deduce que, en general, "*alteración*" suele tener una connotación típicamente negativa, ya sea por el desarrollo de colores, olores,

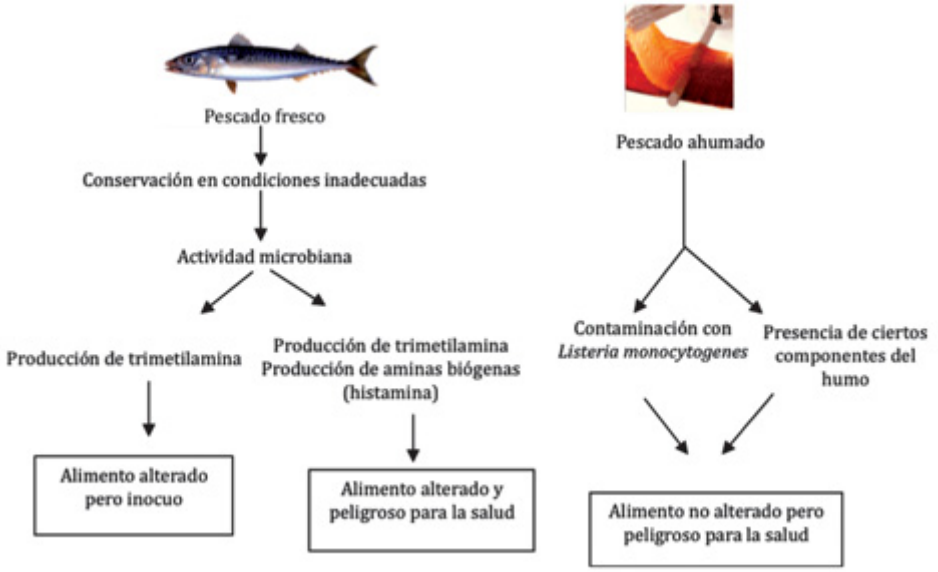


FIGURA 1. *La relación entre alteración y seguridad alimentaria no es siempre unívoca.*

texturas o sabores indeseables, por la reducción del valor nutricional del alimento o por la presencia de contaminantes que puedan representar un riesgo para la salud. Esta será básicamente la aproximación que se adoptará en este capítulo. Sin embargo, conviene tener presente que no siempre es así ya que algunos procesos alterativos son esenciales para que ciertos alimentos adquieran las propiedades organolépticas que les caracterizan. De hecho, el control de ciertas alteraciones que se producen de forma natural ha servido a la Humanidad para disponer de alimentos con una vida útil mucho mayor que la de las materias primas de partida, tal y como sucede con el amplio espectro de alimentos fermentados.

2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ALTERACIÓN DE LOS ALIMENTOS

La alteración alimentaria puede obedecer a diversas causas físicas, químicas y/o biológicas, entre las que destacan las siguientes (2): 1) lesiones físicas (por abrasiones, presiones, congelación, desecación…); 2) actividad enzimática de los propios alimentos y otras reacciones químicas inherentes a su composición química; 3) crecimiento y actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos; y 4) acción de insectos, roedores, aves y otros animales. A menudo estas causas no actúan aisladamente. Por ejemplo, las bacterias, los mohos, los insectos y la luz pueden actuar simultáneamente para deteriorar un alimento en un almacén. Igualmente, el calor, la humedad y el aire afectan tanto al crecimiento y actividad de los microorganismos como a la actividad química de las enzimas propias del alimento en cuestión. En consecuencia, las condiciones en las que se manipulan, procesan y almacenan los alimentos resultan críticas para su vida útil; sin embargo, las condiciones reales de conservación no suelen ser las más idóneas. Por ejemplo, el abuso en la temperatura sigue siendo relativamente común en la cadena de distribución y se convierte en práctica rutinaria en los hogares. Por este motivo, es importante que las industrias contemplen las características de un producto bajo el amplio espectro de condiciones de almacenamiento que, en la práctica, se observan en la cadena alimentaria.

Los factores que influyen en la velocidad y grado de alteración de un alimento se suelen clasificar en intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos se refieren a las propias características del producto y están influenciados por el tipo y calidad de las materias primas, la formulación y la estructura del producto. Entre ellos cabe citar la actividad de agua, el pH, el potencial redox, el oxígeno disponible, los nutrientes, la microbiota natural, los enzimas, los aditivos, etc. Los factores extrínsecos son aquellos a los que se expone el alimento según

avanza por la cadena alimentaria: tratamientos térmicos, temperatura durante el almacenamiento y la distribución, presión, exposición a la luz, tipo de atmósfera, contaminaciones microbianas… Como se ha comentado anteriormente, todos estos factores pueden operar de una forma interactiva y, a menudo, impredecible; de hecho, las interacciones que se establecen pueden estimular o inhibir (hasta un cierto límite) los procesos alterativos. Algunos de los principales mecanismos responsables de la alteración de diversos grupos de alimentos se muestran, a modo de ejemplos, en la Tabla 1. A continuación se describirán los factores físicos, químicos y microbiológicos más relevantes en el proceso de deterioro de los alimentos.

TABLA 1. *Mecanismos de deterioro de diversos alimentos*

Alimento	**Mecanismos**	**Cambios limitantes**
Fruta fresca	Degradación enzimática Crecimiento de mohos Pérdida de humedad	Ablandamiento de la textura Mohos visibles Apariencia seca
Mermeladas	Sinéresis Oxidación	Separación del suero Crecimiento visible de mohos Pérdida de flavor
Carnes frescas	Oxidación Crecimiento microbiano	Pérdida de color, rancidez Olor y flavor desagradables
Carnes congeladas	Oxidación Sublimación del hielo	Rancidez Quemaduras
Pescado fresco	Diversas reacciones químicas Crecimiento microbiano	Alteración del aspecto Olor y flavor desagradables
Pan	Retrogradación del almidón Migración de humedad	Alteración de textura y flavor Apariencia seca; crecimiento de mohos
Café	Pérdida de compuestos volátiles Oxidación	Alteración del flavor Rancidez
Leche	Oxidación Reacciones de hidrólisis Crecimiento microbiano	Rancidez Olor y flavor desagradables
Helado	Migración de humedad Oxidación	Formación de cristales de hielo Rancidez
Yogur	Sinéresis Oxidación	Separación del suero Rancidez

2.1. Factores físicos

2.1.1. *Transferencia de humedad y/o vapor de agua*

El agua es un componente muy importante de muchos alimentos ya que, no sólo ofrece un medio para reacciones químicas y bioquímicas, sino que también participa en ellas. Su presencia afecta notablemente a las propiedades sensoriales de los alimentos, que pueden verse alteradas cuando se produce una transferencia de humedad o vapor de agua entre el ambiente y el alimento o entre los propios ingredientes de un mismo alimento (Tabla 2). Además, el agua representa un factor crítico para el crecimiento microbiano.

2.1.2. *Transferencia física de otras sustancias*

La transferencia de otras sustancias, desde o al alimento, puede comprometer la calidad del producto. Por ejemplo, la pérdida progresiva de dióxido de carbono en las bebidas refrescantes carbonatadas envasadas en botellas de polietileno conlleva la pérdida de uno de sus atributos de calidad. Igualmente, la adsorción de aromas (limonenos y otros) por parte de los materiales que recubren los envases de los zumos de naranja disminuye la intensidad del aroma a

TABLA 2. *Cambios en la calidad de algunos alimentos debidos a la transferencia de humedad y/o vapor de agua*

Producto	Cambio	Mecanismo de deterioro
Verduras frescas	Marchitado	Pérdida de humedad
Frutas frescas	Aspecto seco y poco atractivo	Pérdida de humedad
Ensaladas aliñadas	Cambios en la textura de los vegetales; cambios en la consistencia del aliño	Migración de humedad de los vegetales al aliño
Galletas y cereales de desayuno	Reblandecimiento; pérdida de la textura	Ganancia de humedad
Caramelos	Se hacen pegajosos	Ganancia de humedad
Alimentos en polvo	Apelmazamiento	Ganancia de humedad
Carne congelada	Quemaduras por frío	Transferencia de vapor de agua; sublimación del hielo

cítricos de la bebida. En sentido contrario, ciertos alimentos pueden adquirir aromas extraños o desagradables del envase o del ambiente que le rodea; los derivados del chocolate suelen ser bastante susceptibles a estos cambios debido a su alto contenido en grasa.

2.2. Cambios químicos y/o bioquímicos

A excepción de las fermentaciones intencionadas o de la maduración de la fruta después de su recolección, la mayoría de los cambios químicos y bioquímicos que ocurren en los alimentos son indeseables y, en consecuencia, afectan a su calidad y/o seguridad. Los cambios químicos y bioquímicos más relevantes son la oxidación, la hidrólisis, el pardeamiento no enzimático, el pardeamiento enzimático y las interacciones alimento-envase.

2.2.1. *Oxidación de grasas y aceites*

La oxidación de las grasas y aceites provoca el desarrollo de olores y aromas no deseables ("a rancio") en los alimentos y el rechazo (o una menor aceptación) por parte del consumidor. La rancidez oxidativa (autooxidación) es una reacción química con una baja energía de activación y, por lo tanto, no se detiene bajando las temperaturas de almacenamiento del alimento. Puede tener lugar mediante tres mecanismos: 1) el mecanismo clásico que implica la presencia de radicales libres y precisa de un catalizador (por ejemplo, cobre); 2) la fotooxidación en presencia de un agente sensibilizante, por ejemplo mioglobina, y que se desencadena por acción de la luz; y 3) la vía de la lipoxigenasa, una enzima ampliamente distribuida en los alimentos, tanto en los de origen vegetal como animal. En todos los casos, el primer producto es un hidroperóxido lipídico, que es inodoro pero que se descompone en moléculas de menor tamaño que causan la rancidez.

La oxidación rancia disminuye la calidad nutritiva del alimento debido a que los radicales libres y los peróxidos generados destruyen los ácidos grasos poliinsaturados y las vitaminas liposolubles. Estos productos intermedios también reaccionan con los enlaces sulfonados de las proteínas, disminuyendo su calidad. Así mismo, se conoce que diversas sustancias presentes en la grasa oxidada tienen efectos tóxicos. Entre ellas se incluyen los ácidos grasos peroxidados y sus metabolitos, las sustancias poliméricas y los esteroles oxidados. Los

hidrocarburos policíclicos aromáticos derivados de la pirólisis de las grasas durante asado de las carnes y pescados son agentes carcinógenos conocidos (3).

2.2.2. *Oxidación de los pigmentos alimentarios*

Todos los pigmentos alimentarios son inestables. La pérdida o cambio del color natural de un alimento no significa necesariamente que su valor nutritivo se haya reducido pero tales variaciones pueden afectar a su aceptabilidad. Un buen ejemplo es el color de la carne fresca, debido a la presencia de mioglobina. Esta proteína puede existir de tres modos: la oximioglobina (roja), la mioglobina reducida (púrpura) y la metamioglobina (marrón). La pérdida de color de la carne se debe a que la oximioglobina y la mioglobina se oxidan para producir metamioglobina. Por ello el color de la carne se emplea como uno de los indicadores de frescura.

2.2.3. *Oxidación de las vitaminas*

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de sustancias, sin un mecanismo de destrucción común. En cualquier caso, diversas vitaminas hidrosolubles (C, B_1) y liposolubles (A, E) son sensibles al oxígeno y a la luz. Con el aumento del uso de vitaminas añadidas en muchos alimentos, como los cereales de desayuno y las bebidas isotónicas, los niveles de vitaminas declarados en el etiquetado pueden ser utilizados como indicadores de caducidad. De hecho, los productores suelen añadir una concentración superior de cada una de las vitaminas que constan en la etiqueta para compensar su degradación a lo largo de la vida útil. Esa diferencia entre la formulación y lo declarado en la etiqueta se conoce como “antienvejecimiento” del producto.

2.2.4. *Hidrólisis*

Consiste en la división de las moléculas en presencia de agua, un proceso que pueden afectar a la caducidad de algunos alimentos. Por ejemplo, el aspartano es un edulcorante de gran intensidad utilizado en los refrescos “*light*” y otros productos bajos en calorías. En condiciones adecuadas de temperatura y pH se hidroliza, lo que hace que el producto sea cada vez menos dulce. Esta pérdida de dulzor puede ser un factor limitante de la caducidad.

La hidrólisis de los triglicéridos libera ácidos grasos de cadena corta que confieren olores desagradables (rancio) a los alimentos. La enzima habitualmente implicada es una lipasa o estearasa. La rancidez hidrolítica afecta principalmente a productos que tengan aceites láuricos, como el de palma y coco. Entre los ácidos grasos que se liberan destacan el cáprico, el láurico y el mirístico, que confieren aroma a jabón. Por ello el enranciamiento hidrolítico se conoce también como rancidez jabonosa. Las lipasas también se encuentran en cereales y productos de molienda como el trigo integral, el salvado de trigo y arroz, la avena o el arroz integral. El tratamiento habitual para inactivar la enzima y estabilizar estos productos es el tratamiento térmico, que resulta inadecuado para los productos integrales. Cuando la rancidez se desarrolla en los productos lácteos, se suele deber o bien al uso de leche de baja calidad o a la contaminación de la leche durante o después del procesado. Las alteraciones hidrolíticas enzimáticas también pueden producirse en la carne cuando existe crecimiento microbiano, pero no son muy comunes. Ocasionalmente, este tipo de enranciamiento puede ser deseable, como sucede en la elaboración de algunos quesos de sabor fuerte tipo Stilton.

2.2.5. *Reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático)*

La reacción de Maillard es un mecanismo de pardeamiento no enzimático que se origina entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carbonilo de un azúcar reductor. Se trata de una de las reacciones más típicas en los alimentos calentados aunque también se ha observado en sistemas que no estaban expuestos a calentamiento, incluyendo productos almacenados a bajas temperaturas. Las características de estos productos, así como la tasa de pardeamiento que llegan a alcanzar, dependen de varios factores, como la naturaleza y la razón molar de los reactantes, contenido de humedad, pH y temperatura, entre otros. La reacción se ve facilitada a temperaturas altas, en condiciones alcalinas y en presencia de fosfatos. Se caracteriza por un pardeamiento acompañado de una pérdida del valor nutritivo del alimento, especialmente por la pérdida de lisina, un aminoácido esencial que reacciona rápidamente con los azúcares reductores. Además, algunos de los productos resultantes de la reacción de Maillard poseen efectos tóxicos y carcinogénicos. Entre los alimentos más sensibles a este proceso alternativo destacan las frutas y vegetales deshidratados, el puré de patata, el huevo en polvo y la leche en polvo. Las consecuencias de los productos de reacción de Maillard sobre la salud se contemplarán posteriormente.

2.2.6. *Pardeamiento enzimático*

El pardeamiento de algunas frutas, verduras, hortalizas y setas (manzanas peladas, plátanos, lechuga, champiñón laminado) es una alteración debida a la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos, un proceso catalizado por la enzima polifenoloxidasa o fenolasa. Los factores más importantes que afectan a la velocidad del pardeamiento son las concentraciones de fenolasa activa y de compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno en el tejido. En ciertos alimentos, como las uvas pasas o las hojas de té fermentadas, este pardeamiento es deseable ya que puede mejorar sus propiedades sensoriales.

2.2.7. *Cambios químicos inducidos por la luz*

En el caso de los cambios inducidos por la luz, los factores más importantes son la longitud de onda de la luz, su intensidad, la duración de la exposición, la presencia de agentes sensibilizantes, la temperatura y el oxígeno disponible. Los cambios finales dependen de cada alimento pero, en general, los más conocidos son los siguientes:

1. Fotooxidación de algunas vitaminas, como el ácido ascórbico, que se descompone rápidamente en presencia de luz y oxígeno.
2. Fotooxidación de los pigmentos óxido nítricos en el jamón cocido y productos similares. En presencia de cantidades mínimas de oxígeno, la luz induce la oxidación de los pigmentos óxido-nítricos, produciendo una alteración en el color de los productos.
3. Aceleración del enranciamiento oxidativo de los alimentos. Se produce tras exposiciones prolongadas a la luz artificial, como la de los tubos fluorescentes en los supermercados. Afecta a productos como las patatas fritas o las galletas. Por este motivo, la mayoría de los productos de aperitivo se envasan con papeles metalizados.
4. Fotodescomposición del aspartano. En solución acuosa tiene una estabilidad limitada y su descomposición se ve acelerada por la luz.

3. MICROORGANISMOS ALTERANTES

La alteración de los alimentos constituye un grave problema económico en todo el mundo y, en muchas ocasiones, se debe al crecimiento no deseado de

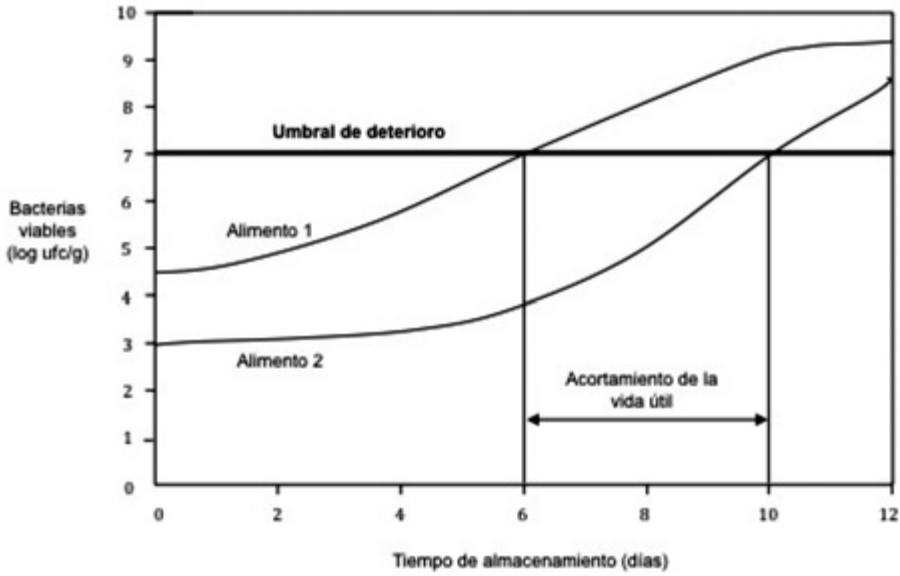
microorganismos que, durante su metabolismo, producen compuestos volátiles detectables por los sentidos del gusto y del olfato. En principio, y con las salvedades que se comentarán posteriormente, un alimento alterado no es peligroso pero carece de la calidad que de él esperan los consumidores; por lo tanto, se trata de un problema de calidad y no de seguridad. Los términos "alterado" e "inalterado" son subjetivos puesto que la aceptación alimentaria depende de lo que el consumidor espera. Así, la producción de ácido acético durante el almacenamiento del vino es rechazable pero su síntesis a partir del vino es necesaria para la obtención de vinagre.

Muchas materias primas empleadas en la elaboración de alimentos contienen su propia microbiota natural. Además, durante las operaciones de procesado y distribución, los alimentos pueden contaminarse con una gran variedad de microorganismos. Su composición química y las condiciones en las que se encuentren pueden favorecer el crecimiento y predominio de algunos de ellos y conducir a la alteración alimentaria. En general, cuanto mayor sea la carga bacteriana inicial del alimento, más breve será su vida útil debido al aumento de las actividades microbianas (Figura 2). La alteración no sólo se debe al crecimiento microbiano visible sino también a la producción de metabolitos finales que originan olores, colores y/o sabores repugnantes, gas, limosidad o pérdida de la textura normal. Obviamente, los signos de alteración varían notablemente dependiendo de los alimentos, su carga microbiana y las condiciones ambientales.

Entre las bacterias alterantes Gram-negativas destacan diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella* y *Aeromonas*. Durante el almacenamiento en frío, pueden alterar todos aquellos alimentos caracterizados por una gran actividad de agua y un pH cercano a la neutralidad y que se suelen conservar en un ambiente aerobio (leche y productos lácteos, carnes, pescados, mariscos, huevos...). Muchos de estos microorganismos producen pigmentos y proteasas y lipasas termoestables y, en consecuencia, son capaces de producir olores y sabores repugnantes incluso cuando las células vegetativas han sido destruidas mediante un tratamiento térmico (por ejemplo, en la leche después de la pasteurización). También producen pigmentos en la alteración de los huevos.

Por lo que respecta a las bacterias Gram-positivas no esporuladas, destacan las bacterias lácticas (*Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp.), las acetobacterias (*Acetobacter* spp.) y *Brocothrix thermosphacta*. Muchas de ellas tienen una importancia capital en la industria alimentaria ya que forman parte de cultivos iniciadores, adjuntos o probióticos. Sin embargo también existen numerosas cepas con capacidad para alterar los ali-

FIGURA 2. *Efecto de la carga microbiana inicial en la vida útil. Adaptado de Forsythe (4)*



mentos fermentados o aquellos envasados en atmósferas modificadas o al vacío. La causa suele ser la producción de dióxido de carbono, un exceso de acidificación debido a la producción de ácido láctico, la producción de exopolisacáridos que originan mucosidad, viscosidad o filamentosidad o la síntesis de sustancias indeseables, como las aminas biógenas. El envasado en atmósferas modificadas y al vacío suele fomentar el predominio de este tipo de bacterias.

Entre los microorganismos alterantes Gram positivos y esporulados, diversas especies de *Bacillus* y *Clostridium* constituyen importantes agentes alterantes de los alimentos procesados térmicamente, ya que las esporas sobreviven a estos tratamientos. Por ejemplo, *B. cereus* crece en la leche pasteurizada, almacenada a 5 °C y produce la "coagulación dulce" (coagulación sin acidificación) y la "nata amarga". *B. stearothermophilus* origina la "acidificación plana" de los alimentos enlatados ya que se desarrolla produciendo ácido pero no gas por lo que la lata no se abomba; por el contrario *Cl. thermosaccharolyticum* genera gas y altera los alimentos enlatados produciendo un abombamiento del envase. Por su parte, *Desulphotomaculum nigrificans* es responsable de la alteración "maloliente sulfurosa" debida a la producción de sulfuro de hidrógeno y al consiguiente abombamiento y mal olor. *Cl. tyrobutyricum* y *Cl. butyricum* causan

el hinchamiento tardío en quesos, que se caracteriza por la formación de ácido butírico que conduce a la formación de gases y olores anómalos, con pérdida de calidad.

Las levaduras y mohos, en general, toleran mejor que las bacterias las condiciones de baja actividad de agua y/o pH ácido. Consecuentemente son alterantes típicos de alimentos como frutas, hortalizas, cereales y productos horneados. Sintetizan enzimas pectolíticas que ablandan los tejidos de las frutas y verduras ocasionando las "podredumbres blandas". Así, se estima que las especies del género *Penicillium* son responsables de más del 30% de toda la fruta alterada. Los mohos producen también esporangios pigmentados que colorean visiblemente a los alimentos. *Rhizopus nigricans* es un moho alterante del pan ("pan florecido", con manchas negras) y también lo son *Neurospora sitophila* ("pan rojizo"), *Penicillium* ("moho azul") y *Aspergillus* ("moho verde"). Las levaduras osmófilas de los géneros *Saccharomyces* y *Torulopsis* crecen a concentraciones de azúcar elevadas (65-70%) y alteran zumos, mermeladas y miel. Los hongos también causan diversos tipos de alteración cárnica, como enmohecimiento "algodonoso" debido a diversas especies de *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. y *Thamnidium* spp.

4. METABOLISMO MICROBIANO EN LOS ALIMENTOS

En general, las fases de máximo crecimiento (proceso eminentemente anabólico) y máxima actividad metabólica (proceso eminentemente catabólico) de un microorganismo determinado no suelen acontecer al mismo tiempo. Este hecho es importante para comprender la cinética de deterioro de los alimentos. Seguidamente, se exponen las principales características del metabolismo de los microorganismos, prestando especial interés a su relación con la alteración de los alimentos.

4.1. Metabolismo de carbohidratos

Los principales alimentos frescos de origen vegetal tienen una actividad de agua elevada y contienen almidón u otros compuestos de peso molecular elevado, tales como celulosa y pectina. Por este motivo, suelen ser degradados por bacterias capaces de utilizar estos constituyentes como nutrientes. Los mohos y las levaduras suelen crecer más lentamente y, en consecuencia, su importancia

es menor. Únicamente adquieren protagonismo como agentes predominantes de la alteración en los alimentos ácidos y en aquéllos ricos en carbohidratos y con una actividad de agua inferior a 0,5. Estos microorganismos emplean diversas vías metabólicas y, por consiguiente, tanto el perfil de productos finales como las concentraciones a las que se encuentran son muy variables. Entre ellos, destacan los siguientes: ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, etanol, acetilmeti1carbinol y diacetilo. Además, se puede producir ácido galacturónico por disimilación microbiana de la pectina.

En las primeras fases de la alteración microbiana de diversos alimentos refrigerados, como las carnes, los microorganismos existentes en la superficie externa son capaces de emplear los escasos carbohidratos disponibles y de sintetizar exopolisacáridos, conduciendo al fenómeno de limosidad o viscosidad superficial.

4.2. Metabolismo de proteínas y péptidos

Los péptidos y aminoácidos libres son degradados por desaminación y descarboxilación. Entre los productos finales, destacan el amoníaco, sulfuro de hidrógeno, mercaptanos, disulfuros, dióxido de carbono, ácidos grasos volátiles y alcoholes. Un aminoácido dado puede ser atacado por vías metabólicas diferentes; por ejemplo, la lisina es descarboxilada por ciertas bacterias mientras que es desaminada por otras. En algunos casos, el metabolismo de proteínas y péptidos produce los compuestos característicos de la putrefacción de los huevos y de la alteración putrefactiva de los productos marinos y de la carne de aves. En otros, como en ciertos quesos blandos madurados, la degradación de la proteína por la microbiota forma parte del proceso normal de maduración y, de hecho, este proceso se considera como muy deseable. De modo similar, el sabor "a bravío" que se desarrolla durante el colgado de las aves de caza probablemente es debido, en gran medida, a cambios proteolíticos.

Los carbohidratos ejercen una actividad "ahorradora" de proteínas en la alteración de los alimentos. En cualquier alimento que contenga un 5-10% de carbohidratos, la alteración suele ser de tipo fermentativo más que de tipo putrefactivo. Este hecho se debe a que en tales alimentos los carbohidratos son degradados rápidamente por los microorganismos glucolíticos, dando lugar a concentraciones relativamente elevadas de diversos ácidos orgánicos y, en consecuencia, inhibiendo el desarrollo de los microorganismos proteolíticos. De este modo, no se originan los desagradables productos nitrogenados propios de la degradación proteica.

4.3. Lipolisis

Muchos microorganismos poseen enzimas lipolíticos que pueden originar la alteración lipolítica de la fase acuosa de un alimento. Las lipasas hidrolizan los lípidos a ácidos grasos libres (AGLs) y glicerol. El glicerol es metabolizado rápidamente por muchos microorganismos pero los AGLs se pueden acumular y, si son de peso molecular bajo, contribuir a la alteración conocida como enranciamiento o rancidez. Los microorganismos se diferencian por la especificidad de las lipasas que producen. Por lo tanto, la naturaleza, el porcentaje de los diferentes AGLs liberados y los efectos organolépticos de la lipolisis microbiana variará en función de las cepas implicadas, de la composición en ácidos grasos y de la estructura lipídica de los alimentos. La actividad de las lipasas también se ve influida por otros factores intrínsecos. Por ejemplo, la presencia de ácido oleico o de una concentración elevada de carbohidratos suele inhibir la actividad de las lipasas. Los factores extrínsecos que influyen en la actividad de las lipasas incluyen la temperatura de almacenamiento y la disponibilidad de oxígeno. Los cambios de la temperatura influyen en los porcentajes de los diferentes AGLs producidos, mientras que el aumento de la presión de oxígeno suele aumentar la actividad lipolítica general.

La producción de rancidez por oxidación o autooxidación, en vez de por hidrólisis de las grasas, suele considerarse como una reacción química espontánea más que un proceso microbiológico. Sin embargo, pueden estar implicados microorganismos que producen metabolitos con sabores y olores desagradables, tales como peróxidos, 2,4-dienos y metil cetonas. Los microorganismos que están implicados con mayor frecuencia en la lipolisis y rancidez de los alimentos son *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Yarrowia lipolytica, Geotrichum candidum, Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. y *Paecilomyces* spp. Aunque los productos de la degradación de los lípidos generalmente son considerados indeseables, algunos están implicados en el desarrollo de sabores deseables en productos tales como quesos, embutidos crudos madurados y jamón curado.

4.4. Otros metabolitos microbianos que afectan negativamente a la aceptabilidad de los alimentos

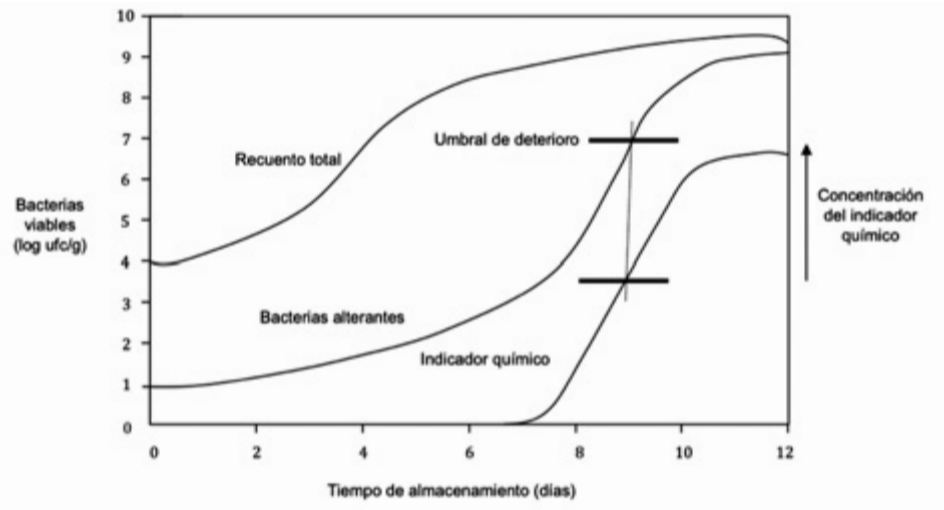
Además de los procesos anteriores, en los alimentos pueden tener lugar muchos otros cambios de origen microbiológico que contribuyen a la alteración.

Así, la adición de sorbatos como conservantes conduce, en ciertas circunstancias, a la aparición un olor "a petróleo" o "gasolina". Este hecho se debe a la existencia de cepas de *Penicillium* spp. capaces de descarboxilar el ácido sórbico y transformarlo en 1,3-pentadieno, un compuesto típico de la gasolina y el queroseno. Otro ejemplo es el olor anormal a "ahumado/fenólico" que se detecta en algunas leches chocolateadas o vainilladas y que es fruto de la producción de guayacol por parte de microorganismos de los géneros *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhanella*, *Rhodotorula* y *Streptomyces*.

5. INDICADORES DE VIDA ÚTIL

La vida útil es un atributo importante de todos los alimentos; guarda relación con la calidad total del alimento y depende de los ingredientes, del sistema de producción, del transporte y del almacenamiento (incluyendo el que se realiza en los hogares). La vida útil puede determinarse mediante una combinación de análisis microbiológicos y químicos en muestras del alimento tomadas a lo largo de su vida de almacén, siguiendo diversas estrategias (Figura 3). Por ejemplo, las pruebas de almacenamiento, en las que se toman muestras a ciertos intervalos de tiempo y se determina su carga microbiana total y la de ciertos microorganismos alterantes, como *Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta* o

FIGURA 3. *Indicadores de vida útil de un alimento. Adaptado de Forsythe (4).*



bacterias lácticas. Los recuentos de bacterias viables se comparan con la evaluación química y sensorial del producto, y se establecen correlaciones para identificar los indicadores clave de la alteración inicial de los alimentos. Además, cada vez tiene más relevancia la modelación predictiva, a pesar de que todavía la mayoría de los modelos predictivos tienen por objetivo a los microorganismos patógenos en vez de a los alterantes, que son los que más limitan la vida útil de cualquier producto alimenticio.

Diversos compuestos químicos se emplean como indicadores para determinar y predecir la vida útil de los alimentos. La mayoría son sustratos que emplean los microorganismos para crecer o bien metabolitos que se producen en la fase estacionaria del crecimiento microbiano (5). Entre ellos, destacan los siguientes (4):

(a) *Glucosa:* Representa el principal nutriente para los microorganismos en las carnes rojas, incluidas aquellas envasadas en atmósferas modificadas y a vacío. Tras su agotamiento, las *Pseudomonas* inician la utilización de los aminoácidos, lo que conduce a una rápida alteración.

(b) *Ácidos glucónico y 2-oxoglucónico:* Proceden del metabolismo de la glucosa por especies del género *Pseudomonas*.

(c) *Ácidos L-láctico, D-láctico, acético y etanol:* La producción de estas sustancias a partir de la glucosa podría ser un buen indicador de iniciación de la alteración de algunos alimentos, como la carne de cerdo o de vacuno.

(d) *Aminas biógenas o biológicamente activas:* Ciertas enterobacterias y bacterias lácticas producen aminas biógenas, como la tiramina o la histamina, en una amplia variedad de alimentos. Su producción no conlleva una alteración organoléptica manifiesta pero representa un riesgo para la salud debido, entre otras, a sus propiedades vasoactivas. Estas sustancias se tratarán en detalle posteriormente.

(e) *Compuestos volátiles:* La determinación de los compuestos volátiles resulta particularmente útil ya que no requiere el empleo de métodos de extracción a partir del alimento y permite la detección simultánea de productos derivados de la actividad microbiana y otros originados por reacciones químicas en las que no participan los microorganismos. Así, durante la alteración de la leche, se puede detectar 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, 2-propanol, etilhexanoato, etilbutanoato, 1-propanol, 2-metil propanol y 1-butanol. Por otra parte, se ha propuesto el empleo de la acetona, metil etilcetona, dimetil sulfuro y dimetil disulfuro como indicadores de alteración de la carne picada, de la acetoína y el diacetilo para el magro de cerdo y de la trimetilamina para el pescado.

6. ALTERACIONES DE DIVERSOS GRUPOS DE ALIMENTOS

A continuación, se analizará los procesos de alteración de diversos grupos de alimentos. Hay que señalar que no se pretende realizar una revisión exhaustiva ya que existen excelentes monografías (6, 7) sino simplemente presentar una serie de ejemplos que sirvan para ilustrar las relaciones entre los factores químicos y microbiológicos en los procesos alterativos o las existentes entre la alteración de los alimentos y la seguridad alimentaria.

6.1. Alteración de la carne

La carne es un buen sustrato para el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos ya que posee una elevada actividad de agua (0,99), es rica en proteínas, lípidos, diversos componentes solubles de bajo peso molecular, vitaminas y minerales y contiene una pequeña concentración de carbohidratos (0-1,2%). Además, la carne se puede contaminar fácilmente durante las operaciones de sacrificio, carnización, procesado y almacenamiento.

Durante la fase de rigor, cesa la respiración en las células musculares, que dejan de sintetizar ATP. Subsiguientemente, la glicolisis conduce a una acumulación de ácido láctico y, en consecuencia, descende el pH del tejido muscular. El pH final (5,5-5,8) y la concentración de glucógeno residual dependen del contenido inicial de glucógeno en el músculo. Inicialmente, los microorganismos crecen a expensas de los materiales de bajo peso molecular (glucosa, ribosa, glicerol, lactato, aminoácidos), algunos de los cuales resultan de la glicólisis anaerobia del glucógeno almacenado y de la hidrólisis del adenosintrifosfato (ATP) a inosinmonofosfato (IMP). Durante el almacenamiento de la carne, el IMP y la inosina continúan su degradación a hipoxantina, ribosa y ribosa fosfato, sustancias que sirven para el crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*, bacterias lácticas y bacterias Gram-negativas. La proteolisis microbiana de las proteínas estructurales se produce en las últimas fases de la alteración.

La concentración de glucógeno muscular en los animales vivos es variable pero se agota rápidamente con el ayuno, el ejercicio y/o el estrés previo al sacrificio. Una baja concentración de glucógeno muscular resulta en una menor producción de ácido láctico y un valor de pH más elevado. Cuando el pH es mayor de 6, el oxígeno penetra menos en la carne y disminuye la concentración de oximioglobina visible por lo que la carne aparece más oscura de lo normal y se se suele denominar carne “oscura, firme y seca” (DFD, del inglés *Dark,*

Firm and Dry). Las carnes DFD son más corrientes en vacuno pero pueden aparecen en otras especies de abasto. La alteración de estas carnes es más rápida que la de las carnes con un pH normal debido a la ausencia de glucosa en los tejidos. En estas circunstancias, las bacterias (y, en particular, las *Pseudomonas*) tienen que recurrir a los aminoácidos como primera fuente de carbono y su degradación es la responsable de la aparición de características sensoriales repugnantes.

La carne de cerdos sometidos a estrés (y, en menor medida la de otras especies) puede sufrir una glicolisis acelerada que hace que el músculo alcance su pH final mientras su temperatura es todavía elevada. Cuando esto sucede, las carnes reciben el apelativo de "pálidas, blandas y exudativas" (PSE, del inglés *Pale, Soft and Exudative*), ya que son sus principales características. En contraste con las carnes DFD, las PSE suelen observar un patrón de alteración similar al de las carnes normales.

Los microorganismos psicrotrofos son los responsables de la alteración de las canales en condiciones de refrigeración (Tabla 3). Entre la microbiota alterativa destacan los bacilos aerobios Gram-negativos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (que representa más del 50% de la microbiota alterante, destacando las especies *P. fragi*, *P. lundensis* y *P. fluorescens*), *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas* y *Psychrobacter* (8) mientras que *B. thermosphacta* suele representar una proporción minoritaria. La velocidad de la alteración aumenta con: 1) la concentración inicial de psicrotrofos que contaminan la canal, 2) el aumento de la temperatura de almacenamiento y 3) el aumento de la actividad de agua de la superficie de la canal (que depende de la velocidad del aire y de la humedad relativa). La alteración se manifiesta por cambios en el olor, flavor y aspecto de la carne, incluyendo la aparición de colonias bacterianas visibles macroscópicamente. En las canales magras, los olores repugnantes se aprecian cuando la concentración bacteriana alcanza, aproximadamente, 10^7 unidades formadoras de colonia (ufc)/cm^2. La viscosidad aparece cuando la actividad de agua está próxima a 0,99 y el recuento se sitúa en torno a 10^8 ufc/cm^2. Cuando la superficie permanece seca pueden aparecer colonias de micrococos, levaduras y mohos. A temperatura ambiente, la microbiota alterante está constituida por bacterias mesófilas, predominantemente clostridios (*C. perfringens*), enterobacterias y *Acinetobacter*.

Durante el almacenamiento de la carne en refrigeración y en condiciones aerobias, la glucosa termina desapareciendo y entonces las bacterias deben recurrir al ácido láctico y a los aminoácidos como fuentes de carbono. La degradación de los aminoácidos resulta en la producción de una mezcla compleja de

ésteres, alcoholes, compuestos azufrados, amoniaco, aminas, hidrocarburos insaturados, cetonas y otros compuestos, lo que origina la aparición de características sensoriales repugnantes (Tabla 3). Las cepas de *P. fragi* son las mayores productoras de ésteres etílicos, responsables del olor afrutado dulce característico de la fase inicial de deterioro (8). Estas y otras cepas pertenecientes a otras especies de *Pseudomonas* también producen putrescina a partir de la arginina y una serie de compuestos azufrados responsables de los olores pútridos de la fase avanzada de alteración. *B. thermosphacta* origina ácidos y alcoholes de cadena ramificada, acetoína y diacetilo mientras que las enterobacterias (*Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*) contribuyen a la formación de compuestos azufrados y de cadaverina a partir de la lisina. El crecimiento fúngico aparece tras un almacenamiento prolongado (2) y suelen estar implicadas especies de los géneros *Mucor, Rhizopus* y *Thamnidium* ("florecido algodonoso"), *Cladosporium y Penicillium* (manchas negras amarillas y verdes) o *Sporotrichum* y *Chrysospoium* (manchas blancas).

En la carne envasada al vacío, la atmósfera que se genera inhibe el crecimiento de la flora aerobia Gram-negativa y favorece el predominio de ciertas bacterias lácticas, fundamentalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc* (Tabla 3). El crecimiento de otras especies, como *B. thermosphacta*, *Clostridium laramie* o *Shewanella putrefaciens*, depende del pH, de la permeabilidad de la película y de la temperatura. El desarrollo de estas bacterias da lugar a una amplia variedad de productos finales de su metabolismo (Tabla 3) y origina la pérdida de sus propiedades organolépticas. Por ejemplo, el ácido sulfhídrico formado reacciona con la oximioglobina para originar sulfohemoglobina, sustancia responsable del enverdecimiento de estos alimentos.

6.2. Alteración del pescado fresco

El número de especies de pescados explotadas habitualmente como alimento es mucho mayor que el de especies de mamíferos utilizados para producir carne. Este hecho se refleja en la enorme variabilidad en la composición del pescado dependiendo de la especie, la fase de desarrollo, el caladero, la estación, la alimentación y los métodos de captura (o cultivo en el caso de la acuicultura) y manipulación. La composición media de las especies magras, como el bacalao, suele ser de un 80% de agua, un 18% de proteína, un 1% de carbohidratos y menos de un 1% de lípidos. En contraste, el contenido lipídico de los pescados grasos, como la caballa, puede variar entre un 1 y un 30%. En general, los componentes solubles no proteicos constituyen aproximadamente un

TABLA 3. *Bacterias alterantes de la carne: sustratos utilizados para su crecimiento y principales metabolitos finales*

	Sustratos para el crecimiento[a]		**Principales metabolitos finales**	
Microorganismo	**Aerobiosis**	**Anaerobiosis**	**Aerobiosis**	**Anaerobiosis**
Pseudomonas	Glucosa[1] Aminoácidos[2] Ácido láctico[3]	—	Exopolisacáridos (limo), sulfuros, ésteres, aminoácidos	—
Acinetobacter/ Moraxella	Aminoácidos[1] Ácido láctico[2]	—	Ésteres, nitrilos, oximos, sulfuros	—
Shewanella	Glucosa[1] Aminoácidos[2] Ácido láctico[3]	Glucosa[1] Aminoácidos[2]	Sulfuros volátiles	H_2S
Brochothrix	Glucosa[1] Ribosa[2]	Glucosa	Ácido acético, acetoína, ácido isovalérico, ácido isobutírico	Ácido láctico, ácidos grasos volátiles
Enterobacter	Glucosa[1] Glucosa 6- fosfato[2] Aminoácidos[3] Ácido láctico	Glucosa[1] Glucosa 6- fosfato[2] Aminoácidos[3]	Sulfuros, aminas	H_2S, aminas
Bacterias lácticas	—	Glucosa Aminoácidos	—	Ácido láctico, ácidos grasos volátiles

[a] Los superíndices indican el orden de preferencia en la utilización de sustratos.

1,5% del músculo del pescado y entre ellos se incluyen azúcares, minerales, vitaminas, aminoácidos libres, amoniaco, óxido de trimetilamina, creatina, taurina, anserina, ácido úrico, betaina, carnosina e histamina. Los elasmobranquios (rayas, tiburones) contienen una concentración más elevada de estos compuestos y particularmente de urea (2%).

Los cambios alterativos empiezan tan pronto como el pez muere o, incluso, antes si ha gastado parte de sus reservas de energía durante la resistencia a la captura. Los principales agentes de alteración son las enzimas y las bacterias endógenas. Se observan dos fases solapadas en el proceso de deterioro: la autólisis, debida a la rotura del equilibrio de las funciones metabólicas del pez, y la fase bacteriana, donde se producen los efectos más evidentes (9).

La actividad celular continúa después de la muerte, impulsada por las reservas de energía (fundamentalmente glucógeno). La degradación del glucógeno en glucosa y ácido láctico es similar a la que se produce en la carne de los mamíferos excepto en la fase inicial, en la que se produce glucosa fundamentalmente por vía hidrolítica y no por reacciones fosforolíticas. Aunque la caída del pH es más rápida en los pescados que en los mamíferos, la mayor parte de los peces vivos tienen menos glucógeno en los músculos y gran parte del mismo se pierde durante la captura, de manera que el pH final es relativamente alto. Hay diferencias significativas entre las diferentes especies de pescado y dentro de una misma especie el pH del músculo puede variar considerablemente, dependiendo de la estación del año y del estado biológico. Se han observado valores de pH por debajo de 6,0 en algunas especies, como el fletán, la caballa y el atún pero en la mayor parte de los demás pescados suele estar entre 6 y 7. Cuando el pH desciende, las proteínas del músculo se acercan a su punto isoeléctrico y comienza la desnaturalización, con un descenso de la capacidad de retención de agua y la liberación de pequeñas cantidades de exudado ("goteo"). En los casos más extremos, la carne se vuelve opaca ("yesosa") y adquiere una textura blanda.

La pérdida de las reservas de energía celular se traduce en un desequilibrio químico intracelular que activa ciertas enzimas endógenas proteolíticas, generando rupturas de los enlaces peptídicos que provocan el aflojamiento de la estructura muscular. En este momento termina el *rigor mortis* y es cuando el pescado presenta la mejor calidad para ser degustado. El sabor del pescado cocinado después del *rigor* difiere del cocinado antes o durante dicho proceso. En el caso de *pre-rigor,* el sabor es menos dulce pero suele tener una nota metálica y la textura suele ser más dura y algo "fibrosa". Inmediatamente después del *rigor* la textura es firme pero fácil de masticar y el sabor cambia haciéndose clara-

mente dulce con notas características que dan a las diferentes especies sus sabores típicos y reconocibles. Sin embargo, aunque el pescado *post-rigor* es más gustoso, hay también una pérdida de frescura ya que la actividad continuada de las enzimas endógenas ha provocado la degradación casi total de ATP, vía adenosina difosfato (ADP), a adenosina monofosfato (AMP), seguida de una rápida desaminación a inosina monofosfato (IMP). El dulzor del pescado fresco cocinado se debe principalmente a la presencia de azúcares, como la glucosa, la fructosa y sus fosfatos. El dulzor adicional y gran parte de los sabores característicos de las diversas especies procede del sinergismo entre el IMP y los aminoácidos libres. El IMP también hace su propia contribución al flavor.

A partir de este punto de máxima suculencia, se produce un descenso gradual del aspecto, olor, textura y sabor del pescado causado por la acción enzimática continuada. Los ojos se aplanan y la piel pierde la impresión visible de los paquetes musculares subyacentes, aunque la carne pueda mantenerse todavía suficientemente firme. La limosidad se hace más visible al perder su transparencia y desarrollar un tono lechoso diluido. El color de las agallas se marchita, los cambios en las concentraciones de alcoholes y de compuestos carbonilo provocan cambios en el aroma y la intensidad del flavor se reduce al disminuir la concentración de IMP.

Los cambios hasta ahora descritos, debidos casi exclusivamente a la actividad de las enzimas endógenas, son considerables en términos químicos y establecen la diferencia entre un producto muy atractivo y otro que, como mucho, puede calificarse de insípido. Una de las consecuencias más dramáticas de la actividad autolítica de las enzimas que puede producirse en el pescado no eviscerado, especialmente en las especies de pescados pelágicos pequeños que se han alimentado abundantemente antes de ser capturadas y almacenadas con poco o ningún hielo, es lo que se conoce como "reventón o explosión de tripa".

Solapándose con los fenómenos de autolisis, tiene lugar el deterioro de origen microbiano. La microbiota bacteriana de los pescados de aguas frías de las regiones árticas y templadas consiste fundamentalmente en psicrófilos aerobios Gram-negativos. La mayor parte de la flora externa del pescado consiste en microorganismos de dos grupos genéricos principales: *Pseudomonas-Alteromonas-Shewanella* y *Moraxella-Acinetobacter*. Otros aerobios encontrados en la carne fresca del pescado incluyen miembros de géneros *Vibrio, Flavobacterium* y *Cytophaga,* y también algunos Gram-positivos, como *Micrococcus* y *Corynebacterium*. También suele haber un pequeño número de anaerobios obligados como *Clostridium* spp. Entre estas bacterias las más corrientemente implicadas en la alteración son especies de los géneros *Shewanella* y *Pseudomonas*, sien-

do *Shewanella putrefaciens* la que predomina a bajas temperaturas (10). Las bacterias Gram negativas predominan en el pescado descompuesto a temperaturas relativamente elevadas (10-37 °C) y, en tales condiciones, destacan *Aeromonas* (en especial *Aeromonas hydrophila*) y *Vibrio* (11). La alteración del bacalao envasado se ha atribuido a *Photobacterium phosphoreum* que produce unas treinta veces más trimetilamina que *S. putrefaciens* (12).

Los olores y flavores más propios de la alteración son, en esencia, el resultado de la utilización bacteriana de moléculas relativamente pequeñas e hidrosolubles de los tejidos del pescado, en especial los constituyentes de nitrógeno no proteico de los tejidos del pescado: aminoácidos, péptidos pequeños y, en los pescados marinos, óxido de trimetilamina (TMAO). Al progresar la alteración, el pH del músculo aumenta y permite que se liberen cantidades cada vez mayores de amoníaco que contribuyen a crear el típico olor del pescado descompuesto. Sin embargo, la causa predominante del olor amoniacal es la trimetilamina (TMA), que se produce por degradación del TMAO. Se piensa que tiene una función osmorreguladora dado que el TMAO va desapareciendo del músculo de los salmónidos según avanzan desde el mar a los ríos para desovar. La mayor parte de los pescados de agua dulce contienen poco o ningún TMAO pero existen excepciones como el lucio. Las cantidades de TMAO de los pescados marinos varían mucho, desde cerca de 100 a más de 1.000 mg por cada 100 g. Otros productos del metabolismo bacteriano que contribuyen significativamente a la percepción sensorial de la alteración son los ácidos de cadena corta (láctico, butírico), los aldehídos y cetonas procedentes de los lípidos titulares, los sulfuros volátiles (sulfuro de hidrógeno, sulfuro de dimetilo, mercaptano de metilo) que derivan de los aminoácidos que contienen azufre (cisteína, metionina), las aminas (indol, escatol, histamina, putrescina, cadaverina) así como el amoníaco procedente de los aminoácidos y, más tarde, de las proteínas. La producción de proteinasas bacterianas está reprimida al principio pero se acelera en las últimas fases alterativas.

El factor principal del control de la alteración microbiana del pescado crudo es la temperatura (10). En general, cuando el pescado de las regiones templadas se mantiene a unos 0 °C hay una fase de latencia de 1 a 5 días, un crecimiento logarítmico de 6 a 14 días y una fase estacionaria después. Bajo la mayoría de las condiciones comerciales, la vida organoléptica inicia un rápido deterioro de la calidad a partir de los 12 días. Esto corresponde a la acumulación de los productos metabólicos bacterianos que varía de unas especies de pescado a otras.

La contaminación del pescado durante su manipulación y estiba a bordo afecta al deterioro (13). Esto es especialmente importante en los pescados que

tienen niveles altos de histidina libre endógena, como el atún o la caballa, ya que puede dar lugar a concentraciones peligrosas de histamina (véase más adelante). Cuando las temperaturas ambientales son altas los retrasos en la refrigeración acortan significativamente la vida útil durante el subsiguiente almacenamiento en refrigeración (11). Durante las operaciones de captura el pescado contacta con las redes, cuerdas, puente del barco y manos y ropas de los pescadores. Este contacto continúa durante las operaciones de estiba en las bodegas. No debe sorprender, por lo tanto, que el pescado fresco, excesivamente manipulado de las aguas templadas o frías, lleve un número elevado de bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen especies de los géneros *Corynebacterium*, *Micrococcus, Bacillus* y *Staphylococcus*. La contaminación microbiana del pescado también tiene lugar durante las operaciones de descarga de los barcos, las subastas públicas y la venta. Estibadores, subastadores, vendedores, compradores y espectadores pasean entre y alrededor de los recipientes del pescado al que aportan otros microorganismos. Aves, roedores, insectos y otros animales pueden tener acceso al pescado y contaminarlo. El ambiente del mercado de pescado contribuye a la incidencia de bacterias descarboxilantes de la histidina (14).

Durante el procesamiento del pescado, la contaminación más corriente procede de su manipulación directa (coliformes, estafilococos), de la transferencia directa de bacterias intestinales, de las agallas o de la piel a las superficies de los filetes y del paso al pescado de las bacterias del entorno (superficies contaminadas, cuchillos, máquinas, etc.). Este hecho puede acelerar el deterioro del pescado y/o implicar problemas para la seguridad del consumidor.

6.3. Alteración microbiana de la leche y productos lácteos

La leche es un excelente medio para el crecimiento de muchos microorganismos debido a su elevado contenido en agua, su pH cercano a la neutralidad y la variedad de nutrientes disponibles. Algunos microorganismos no pueden utilizar la lactosa por lo que dependen de los procesos de proteolisis o lipólisis para su crecimiento. Los productos lácteos representan ambientes sustancialmente distintos ya que algunos componentes de la leche pueden haber desaparecido mientras que otros pueden estar más concentrados; además sus valores de pH o actividad de agua pueden ser mucho menores que los de la leche.

La conservación de la leche cruda depende de unas buenas condiciones higiénicas y de que las operaciones de refrigeración inicial, pasteurización, enva-

sado y refrigeración de la leche pasteurizada se realicen adecuadamente. Las bacterias psicrotrofas que alteran la leche cruda y la pasteurizada pertenecen mayoritariamente a la Familia *Pseudomonadaceae* y, en menor medida, a miembros de la Familia *Neisseriaceae* y a los géneros *Flavobacterium* y *Alcaligenes* (Tabla 4). Las especies más asociadas con defectos en el flavor son *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas lundensis*. Son incapaces de utilizar la lactosa por lo que tales defectos son el resultado de

TABLA 4. *Principales defectos que se producen en la leche y los quesos como consecuencia del crecimiento microbiano*

Defecto	Microorganismos	Enzimas	Metabolitos
A. Leche			
Flavor amargo	Bacterias psicrótrofas, *Bacillus* spp.	Proteasas, peptidasas	Péptidos amargos
Flavor rancio	Bacterias psicrótrofas	Lipasas	Ácidos grasos libres
Flavor afrutado	Bacterias psicrótrofas	Esterasas	Ésteres de etilo
Coagulación	*Bacillus* spp.	Proteasas	Desestabilización de las caseínas
Flavor ácido	Bacterias lácticas	Enzimas glicolíticos	Ácido láctico, ácido acético
Flavor malteado	Bacterias lácticas	Oxidasas	3-metil-butanal
Textura viscosa	Bacterias lácticas	Polimerasas	Exopolisacáridos
B. Quesos			
Fisuras	Lactobacilos heterofermentativos		Dióxido de carbono
Gas temprano	Coliformes, levaduras		Dióxido de carbono, hidrógeno
Gas tardío	*Clostridium* spp.		Dióxido de carbono, hidrógeno
Rancidez	Bacterias psicrótrofas		Ácidos grasos libres
Afrutamiento	Bacterias lácticas		Ésteres de etilo
Depósitos blanquecinos	*Lactobacillus* spp.		Excesivo D-lactato
Descoloración rosa	*Lactobacillus* spp.		Alto potencial redox

la producción de proteasas (flavores amargos y pútridos; coagulación), lipasas (rancidez, flavores afrutados), fosfolipasa y otras enzimas hidrolíticas.

Las proteasas formadas en la leche cruda representan una de las principales causas de alteración (amargor, formación de precipitados, coagulación) de la leche UHT (comercialmente estéril). Este tipo de leche es más sensible que la cruda a los defectos inducidos por las proteasas, seguramente por los cambios que el tratamiento térmico provoca en la estructura micelar de las caseínas y/o por la inactivación de los inhibidores de las proteasas. El efecto de las proteasas producidas por las bacterias psicotrofas sobre la calidad del queso y otros productos lácteos fermentados es mínima ya que la combinación de bajo pH y baja temperatura inhibe su actividad y, además, la mayor parte de las proteasas se eliminan con el suero. Sin embargo, el crecimiento de bacterias proteolíticas en la leche cruda disminuye el rendimiento quesero ya que los productos de la degradación de las caseinas se pierden con el suero en vez de incorporarse al queso.

Por lo que respecta a las lipasas bacterianas, su actividad suele afectar la leche y productos lácteos con una vida útil larga y/o que se almacenan a una temperatura elevada, como la leche UHT, algunos quesos, mantequilla y leche entera en polvo. El flavor a rancio se debe normalmente a la liberación de ácidos grasos de la serie C_4-C_8. Los ácidos grasos de tamaño mayor producen un flavor "jabonoso". *P. fragi* origina un flavor afrutado debido a la esterificación de ácidos grasos libres con etanol; los ésteres mayoritarios suelen ser el etil butirato y el etil hexanoato. Los quesos son más susceptibles a los defectos causados por lipasas que a los provocados por las proteasas ya que las primeras se concentran, junto con la grasa, en la cuajada. La acidez de muchos quesos limita (aunque no inactiva) la actividad lipásica. Por este motivo, aquellos quesos cuyo pH aumenta hasta casi la neutralidad durante su maduración (Camembert, Brie…) son más proclives a este tipo de defectos.

La alteración de la leche y productos lácteos por el crecimiento de bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* o *Enterococcus* tiene lugar cuando las temperaturas de almacenamiento son lo suficientemente altas como para que se impongan sobre las psicrotrofas o cuando la composición del producto inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-negativas aerobias citadas anteriormente (Tabla 4). Así, la presencia de ácido láctico en leche es un buen indicador de que este fluido se expuso a temperaturas de almacenamiento inaceptablemente elevadas ya que permitieron el crecimiento de bacterias lácticas. La acidificación de la leche por bacterias lácticas produce un olor y sabor desagradables, que derivan fundamentalmente de las pequeñas cantidades de ácido acético y propiónico formadas más

que del ácido láctico, que es el metabolito mayoritario. Otros defectos que pueden aparecer son el flavor "malteado", debido al crecimiento de ciertas cepas de *Lactococcus lactis* capaces de producir 3-metil-butanal, 2-metil-butanal y los correspondientes alcoholes, y la aparición de viscosidad, debido a la producción de exopolisacáridos. Algunos coliformes, fundamentalmente de los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella*, también pueden alterar la leche pero se trata de un problema raro debido al predominio de bacterias psicrotrofas a temperaturas de refrigeración o de bacterias lácticas a temperaturas más elevadas.

Diversas bacterias lácticas pueden provocar defectos en el aspecto y flavor de los quesos por diversos mecanismos (Tabla 4). En el caso de algunos lactobacilos heterofermentativos (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*…) se debe a la producción de gas y diversos metabolitos durante la maduración. El crecimiento de ciertas cepas de *Lactobacillus delbrueckii* (que no pueden reducir el potencial redox del queso) o propionibacterias (que producen pigmentos) puede aparejar la aparición de una coloración rosacea. Finalmente, algunos lactococos producen esterasas y dan lugar a flavores afrutados.

La leche recién obtenida suele contener bacterias Gram-positivas formadoras de esporas, predominantemente del género *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*) y, en menor medida, del género *Clostridium*. La germinación de esporas tras la pasterización conduce a la coagulación dulce, ya que la actividad de una proteasa similar a la quimosina hace que la leche se corte sin generar de gas y sin desarrollar un flavor anómalo. Este mismo defecto se puede observar en la leche condensada. Eventualmente, la enzima degrada la caseína suficientemente como para producir un sabor amargo. Por lo que respecta a los quesos, el mayor defecto causado por estas bacterias es la formación de gas, normalmente por crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* y, ocasionalmente, de *Clostridium butyricum* o *Clostridium sporogenes* (Tabla 4). Este defecto, que altera tanto el aspecto como el flavor, se conoce como "hinchamiento tardío" ya que se presenta cuando el queso lleva varias semanas de maduración y afecta más a quesos con elevada humedad y pH y bajas concentraciones de sal en su interior (Emmental, Swiss, Gouda, Edam…). El hinchamiento tardío implica la fermentación del ácido láctico y la subsiguiente formación de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno.

Finalmente, el crecimiento de mohos (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Hormodendrum*…) y levaduras (*Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Torulospora*, *Pichia*) es una causa común de alteración de los productos lácteos fermentados debido

a su capacidad para crecer en ambientes acídicos. Se manifiesta por la aparición de olores anómalos y la formación de gas.

6.4. Alteración microbiana de los cereales

Los carbohidratos de los cereales constituyen la mayor fuente de energía de que disponen los seres humanos; además, estos alimentos contienen cantidades significativas de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas, especialmente de los grupos B, D y E. Todo ello, unido a su pH cercano a la neutralidad, hace que sean alimentos muy propicios para el crecimiento microbiano, que se previene desecándolos hasta que alcanzan una actividad de agua inferior a 0,7.

Todos los cereales están expuestos a una gran variedad de microorganismos, que pueden proceder del suelo, agua, fertilizantes, plantas enfermas o animales mientras están en el campo o del polvo, contenedores, cintas, sacos, depósitos, manipuladores o vectores durante su transporte y almacenamiento. Los principales microorganismos que hay que considerar en estos productos son los mohos y las bacterias esporuladas. Los primeros causan los principales problemas asociados a la producción de cereales. Los mohos "del campo", presentes en los granos al recolectarlos, suelen ser específicos de cada especie, al contrario que los mohos "de almacenamiento". En cualquier caso, pueden provocar manchas, escoriaciones, decoloraciones o apelmazamientos, reduciendo su calidad. Los granos muy infectados desprenden un olor "a moho" muy característico. Algunos mohos provocan la pérdida de calidad del gluten en las harinas y en las masas que se hagan con ellas. Los granos mohosos tienen una escasa capacidad de germinación y bajas propiedades de malteado por lo que igualmente son inaceptables para la elaboración de bebidas alcohólicas. En general, también pueden reducir considerablemente su valor nutritivo. Si el crecimiento fúngico no se controla adecuadamente, la temperatura de los granos puede elevarse hasta valores que provoquen la pérdida de la capacidad de germinación, decoloraciones masivas e incluso su combustión espontánea.

El crecimento de los mohos lleva aparejado ciertos cambios químicos que colaboran en los procesos alterativos de los granos. Así, puede haber un aumento del índice de acidez como consecuencia de la actividad de las lipasas de los mohos sobre los triglicéridos. De hecho, el índice de acidez se emplea como medida de la actividad fúngica. La cantidad de dióxido de carbono que se libera a la atmósfera y la pérdida de materia seca también se relacionan bien con la concentración de mohos contaminantes. Además, la alteración del flavor y el

aroma es debida, en parte, a la producción de compuestos aromáticos volátiles, entre los que destacan el 3-metil-butanol, 3-octanona, 3-octanol y 1-octanol.

Por otra parte, muchos de los hongos que contaminan a los cereales son micotoxigénicos (Tabla 5) y representan un grave problema mundial para el abastecimiento de cereales y derivados ya que, una vez formadas, no se pueden controlar con las técnicas habituales de manipulación post-cosecha y de almacenamiento. Una vez más, se establece una asociación entre alteración y seguridad alimentaria.

Las bacterias que se encuentran en los granos pertenecen fundamentalmente a las familias *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Bacillaceae*. Las bacterias esporuladas forman parte de la microbiota característica de los cereales y, algunas de ellas, como *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, pueden sobrevivir a la cocción. De hecho, esta última especie es la más importante como causa de intoxicaciones alimentarias asociadas al consumo de arroz cocido. Los granos y harinas pueden actuar como portadores de bacterias patógenas, como *Salmonella* spp., cuando se contaminan a partir de vectores, manipuladores, utensilios, etc. Estas bacterias no suelen crecer en condiciones de baja actividad de agua pero si las harinas contaminadas se emplean para la elaboración de un alimento húmedo, entonces se puede producir una toxiinfección. En general, los problemas alterativos son infrecuentes en las masas refrigeradas. Sin embargo, si las condiciones de almacenamiento son inadecuadas puede haber un crecimiento de bacterias lácticas (especialmente del género *Leuconostoc*) y levaduras, que pueden originar diversos problemas, desde viscosidad a cambios indeseables en la textura aroma o flavor.

TABLA 5. *Principales mohos toxigénicos que contaminan los cereales*

Cereal	Mohos	Micotoxinas
Maíz	*Fusarium moniliforme* *Aspergillus flavus*	Fumonisinas, fusarinas Aflatoxinas
Trigo	*Fusarium graminearum* *Alternaria alternata*	Deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona Ácido tenuazónico
Centeno	*Fusarium poae* *Fusarium sporotrichioides*	T-2 T-2
Sorgo	*Alternaria alternata*	Ácido tenuazónico
Cebada	*Penicillium verrucosum*	Ocratoxina A

7. LA ALTERACIÓN COMO INDICADORA DE LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Los alimentos se contaminan frecuentemente con microorganismos potencialmente patógenos y, sin embargo, las tasas de toxiinfecciones alimentarias son relativamente bajas en los países desarrollados. Este hecho se debe a dos factores: 1) el estado de salud de los hospedadores y 2) el rechazo a la ingestión de alimentos alterados. Muchos microorganismos saprofitos se multiplican más rápidamente que los patógenos cuando se encuentran en los alimentos y, además, suelen tener un metabolismo más activo en este tipo de sustratos. De este modo, se produce una serie de metabolitos que alteran las características organolépticas del alimento antes de que los patógenos hayan alcanzado una dosis infecciosa. En consecuencia, el consumidor rechazará ese alimento. Paradójicamente, se considera que cuanto menor es la concentración de los microorganismos alterantes activos, mayor es el riesgo de que pase desapercibida la contaminación con patógenos (15). Por ejemplo, se ha observado que la conservación de los espárragos en atmósferas modificadas restringe el crecimiento de los alterantes y aumenta su vida útil; de esta manera, se permite que *Listeria monocytogenes* alcance una concetración mucho mayor que la que tendría tras un almacenamiento aerobio tradicional (16).

Obviamente, la alteración de los alimentos es una señal "imperfecta" ya que en algunas ocasiones, los patógenos pueden alcanzar concentraciones clínicamente relevantes antes en los alimentos antes de que éstos muestren signos de alteración. Por ejemplo, en el caso de alimentos tratados térmicamente y que sufren una recontaminación posterior por un patógeno. El tratamiento o procesado de los alimentos destruye o reduce al mínimo la concentración de microorganismos contaminantes en los alimentos preparados. En este contexto, un contaminante fortuito, como *Staphylococcus aureus* o *Salmonella* spp., ni tendrá la competencia de los alterantes ni producirá cambios organolépticos que revelen su presencia. En consecuencia, es necesario seguir unos estrictos procedimientos de higiene para evitar la recontaminación de los alimentos procesados.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la dosis infectiva no es la misma para todas las personas, existiendo grupos de población para los que una concentración baja de ciertas especies, como *Listeria monocytogenes*, puede desarrollar una enfermedad grave e incluso mortal. Por este motivo, la primera prioridad de un estudio de caducidad es garantizar la seguridad del alimento evaluado (6) sobre la base de la correcta implantación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), en el que se tenga en cuenta la

población diana a la que va destinada el alimento en cuestión. Los grupos de consumidores de riesgo incluyen a los niños menores de 5 años, las mujeres embarazadas, las personas mayores de 65 años y las personas inmunodeprimidas.

Finalmente, algunos tipos de alteraciones pueden incluso suponer un aumento de los riesgos microbiológicos al crear un microambiente favorable para el crecimiento de patógenos. En este sentido, se ha observado que *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* crece mejor en tomates, patatas y cebollas en presencia de mohos alterativos de los géneros *Botrytis* o *Rhizopus* que cuando éstos están ausentes (17).

8. EFECTOS NEGATIVOS DE LA ALTERACIÓN ALIMENTARIA EN LA SALUD DE LOS CONSUMIDORES

Tradicionalmente, se ha considerado que los alimentos deteriorados tenían unas propiedades organolépticas indeseables para los consumidores pero no comprometían su salud. Actualmente, se sabe que numerosos compuestos originados durante distintos procesos alterativos son potencialmente perjudiciales para la salud tras una exposición más o menos prolongada. Por ejemplo, los lípidos del pescado correctamente conservado son importantes desde el punto de vista nutricional pero su oxidación conlleva efectos negativos sobre diversos procesos fisiológicos. Sin embargo, la principal consecuencia del consumo del pescado que ha perdido las atractivas propiedades del producto fresco puede ser el rechazo por parte de los consumidores de una parte muy valiosa de una dieta variada.

Dado que la simple enumeración de las reacciones alterativas, sustancias resultantes y posibles efectos asociados resultaría demasiado extensa, se tomarán como ejemplo dos grupos de compuestos que se pueden presentar en un amplio espectro de alimentos. En primer lugar, los productos derivados de la reacción de Maillard (PRM), procedentes de un proceso alterativo que, en general, no depende de la presencia de microorganismos; en segundo lugar, las aminas biógenas derivadas del metabolismo de ciertos microorganismos.

8.1. Reacción de Maillard

La gran complejidad química que entraña la reacción de Maillard, así como la frecuencia con la que se produce en los alimentos, ha suscitado un enorme

interés. Esta reacción es especialmente importante para la industria alimentaria, ya que se da frecuentemente en los alimentos durante procesos como el horneado, tostado, fritura, etc. La reacción les confiere nuevos colores, olores, sabores y texturas que pueden ser agradables para el consumidor pero, al mismo tiempo, puede originar sustancias que los alteren o que sean peligrosos para la salud. Además la reacción de Maillard puede disminuir el valor nutritivo de los alimentos aunque las consecuencias nutricionales de la reacción no están estandarizadas debido a que varían en función de una serie de parámetros como, por ejemplo, la estructura química de los reactantes, sus concentraciones, la temperatura, el pH, la presión, el tiempo y la actividad de agua (18).

La reacción de Maillard puede dividirse en tres etapas (Figura 4):

1) *Etapa temprana:* esta etapa corresponde a una serie de reacciones químicas, conocidas y caracterizadas, en las que aún no se produce pardeamiento. Comienza con la condensación entre el grupo carbonilo del azúcar reductor o un lípido oxidado y el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína, originando la base de Schiff, que sufre una reorganización llamada de Amadori. Esto origina ya una pérdida de valor nutritivo, porque el grupo amino queda bloqueado y no es disponible. El producto que se obtiene se llama compuesto de Amadori (N-sustituido-l-amino-1-deoxi-2-cetosa) y se ha detectado en alimentos calentados, liofilizados y almacenados (19).

2) *Etapa avanzada:* en condiciones de temperatura más extremas se forman gran cantidad de compuestos que son los responsables de los olores que desprenden los alimentos cocinados. En esta etapa se produce la fragmentación de los azúcares y la degradación de los aminoácidos, formándose compuestos coloreados y fluorescentes. El pH influye decisivamente en el desarrollo de la reacción, de manera que pueden seguirse tres rutas diferentes a partir del compuesto de Amadori: 1) Pérdida de moléculas de carbono por escisión que da lugar a la formación de compuestos que pueden contener nitrógeno y reaccionar con otros productos intermedios de la reacción, responsables de los aromas característicos. 2) Deshidratación dando reductonas y dihidrorreductonas que pueden reaccionar con aminoácidos que sufren la denominada degradación de Strecker dando lugar a piracinas y aldehídos componentes del olor y sabor de los alimentos cocinados (20). El compuesto de Amadori puede degradarse y originar precursores de los PRM (21). En concreto la hidroxiacetona es un precursor de la piracina mientras que el gliceraldehído y el metilglioxal son más propensos a participar en los

mecanismos de pardeamiento. 3) Deshidratación fuerte que produce furfural y derivados responsables del aroma.

3) *Etapa final:* incluye una serie de reacciones de condensación, originando oligómeros y polímeros insolubles de elevado peso molecular. Se trata de pigmentos pardos llamados melanoidinas, difíciles de aislar y cuya estructura y caracterización todavía son objeto de estudio.

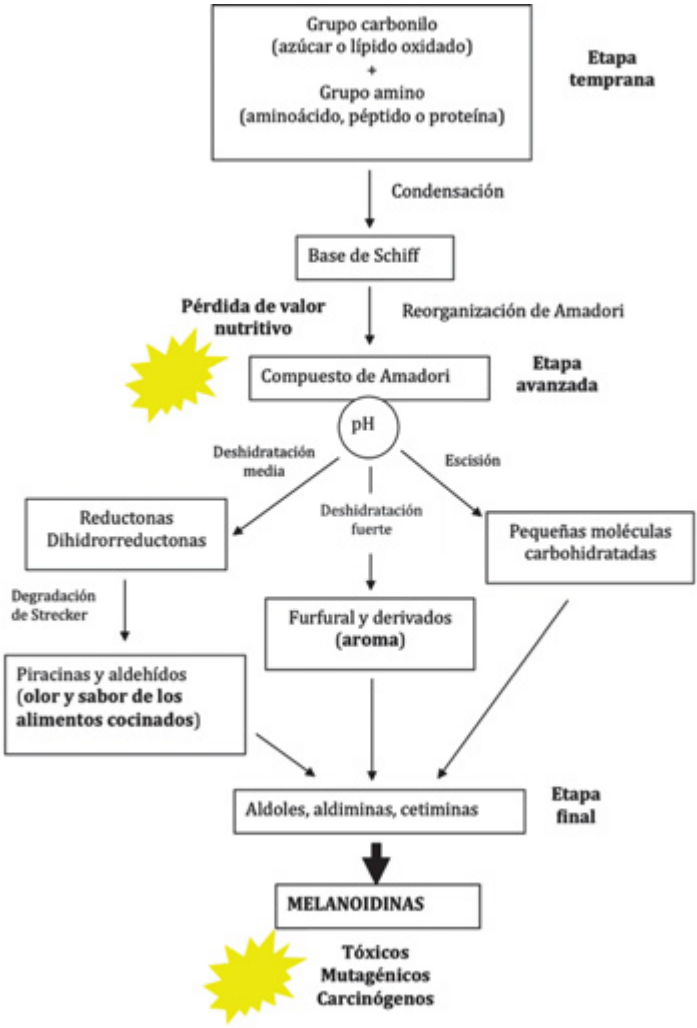


FIGURA 4. *Esquema básico de la reacción de Maillard*

8.1.1. Efectos en la ingesta

Algunos estudios *in vivo* han mostrado que la presencia de PRM en la dieta afecta negativamente a la ingesta y al peso, produciendo su disminución con respecto a los que no los consumen. En ratas, la disminución en la ingesta alimentaria aumenta paralelamente al incremento del calentamiento y, en consecuencia, del pardeamiento (22). Otros autores también han observado una disminución de peso en ratas alimentadas con fórmulas infantiles líquidas esterilizadas con respecto a las que consumieron las fórmulas en polvo. Esto puede deberse a que durante la esterilización de la leche, la lactosa se hidroliza dando lugar a la formación de un azúcar denominado lactulosa (23), que puede modificar el f1avor y el olor de la leche haciéndola menos aceptable.

8.1.2. Efectos en las proteínas y aminoácidos

Una de las consecuencias más importantes de la reacción de Maillard es la degradación de las proteínas producida durante el calentamiento de los alimentos, ya que supone la interacción de grupos amino terminales con grupos carbonilo asociados a azúcares reductores o lípidos oxidados, produciéndose, por tanto, el bloqueo del aminoácido. La disminución en la calidad nutritiva de la proteína se produce debido a: a) la reducción de la disponibilidad de aminoácidos, ya que éstos pueden quedar retenidos por muchos compuestos derivados de la descomposición de los productos de Amadori impidiendo su absorción (24); b) la inhibición de la actividad de determinadas enzimas implicadas en su digestión, y/o c) por la reducción de la digestibilidad de la proteína debido a cambios estructurales de la misma (25).

Aminoácidos como la metionina, el triptófano, la arginina o la histidina pueden afectarse durante el tratamiento térmico de los alimentos pero el aminoácido más sensible es la lisina, debido a la reactividad de su grupo e-amino incluso cuando forma parte de una cadena peptídica (26). Aun cuando el calor aplicado no sea excesivo, la pérdida de lisina disponible puede traducirse en una disminución del valor biológico. Sin embargo, cuando la intensidad del tratamiento térmico es máxima, la reducción de la calidad de la proteína puede ser mayor que la consecuente a la pérdida aparente de lisina disponible. Estudios en alimentos como la leche y sus derivados con un elevado contenido en lisina, indican que cuando este aminoácido reacciona con el grupo carbonilo de la lactosa, queda bloqueado y, por tanto, no es biodisponible, de manera que el valor nutricional de este alimento desciende considerablemente. Rerat *et al*., (24) eva-

luaron las consecuencias de la ingesta de leche con un alto contenido en lactulosil-lisina en la dieta de los cerdos, pudiendo comprobar que la lisina unida a la lactosa no era biodisponible y que la pérdida del valor nutritivo de la proteína era proporcional al deterioro de la lisina durante el calentamiento de la leche y, en menor grado, a la disminución de su digestibilidad. La disponibilidad de la lisina también puede afectarse durante el tratamiento térmico de otros alimentos como el pan, las galletas, las pastas, fórmulas infantiles, etc. (24, 26). No obstante, el grado de reducción del valor nutricional de la proteína depende de muchos factores comentados anteriormente, tales como la naturaleza de los azúcares y proteínas, temperatura, tiempo, actividad de agua, etc. (27).

Existen numerosos estudios *in vivo* encaminados a dilucidar los posibles mecanismos implicados en la disminución de la digestibilidad de la proteína (24). Las melanoidinas procedentes del sistema modelo glucosa-glicina pueden modificar la absorción de algunos aminoácidos y reducir la digestibilidad de la proteína mientras que, otras veces, ésta reducción puede deberse a la inhibición de determinadas enzimas implicadas en su digestión, como las enzimas pancreáticas o las enzimas proteolíticas intestinales como la aminopeptidasa N (28). Estudios recientes realizados en humanos manifiestan que la ingesta de dietas ricas en PRM afecta negativamente la digestibilidad de la proteína, y tiende a mermar la utilización global del nitrógeno de la dieta (29).

8.1.3. Efectos en los carbohidratos

El desarrollo de la reacción de Maillard produce también el bloqueo progresivo de los azúcares presentes en los alimentos y además afecta a las enzimas intestinales implicadas en su digestión. Los PRM de bajo peso molecular, procedentes de mezclas calentadas de glucosa-lisina, inhiben débilmente la actividad de enzimas como la lactasa, invertasa, maltasa y trealasa, mientras que los PRM de elevado peso molecular se comportan como potentes inhibidores de esas disacaridasas, siendo las más afectadas la sacarasa y lactasa. La inhibición de la actividad de estas enzimas por parte de los PRM, con la consecuente disminución en la absorción de los hidratos de carbono, puede causar diarrea y un descenso en el peso de ratas alimentadas con dietas ricas en PRM, debido posiblemente a un efecto osmótico de los carbohidratos no absorbidos en el intestino. Estos efectos varían en función de la naturaleza de los productos de la reacción y son más pronunciados cuanto mayor sea su grado de pardeamiento. Además, se ha observado que en la elaboración y almacenamiento de fórmulas enterales se producen cambios en la composición de los carbohidratos, con la

consiguiente disminución de la biodisponibilidad de nutrientes esenciales para el organismo (30, 31).

8.1.4. Efectos en las vitaminas

Se ha observado que durante el calentamiento de alimentos como la leche, en la que se forman PRM, se produce un aumento en la pérdida de vitaminas, como es el caso de algunas del grupo B y el ácido pantoténico mientras que otras como el ácido nicotínico y la biotina apenas se ven afectadas. La destrucción de vitaminas también se ha estudiado en alimentos, como la leche en polvo, almacenados a elevadas temperaturas en la que se observaron pequeñas pérdidas de tiamina, vitamina B6 y B12, descensos que aumentaron con el avance del pardeamiento (32). De igual modo, determinados procesos utilizados en la tecnología alimentaria como la extrusión, en la que llegan a aplicarse temperaturas superiores a 200 ºC, favorecen el desarrollo de la reacción de Maillard generando productos que pueden reducir la biodisponibilidad de las vitaminas (33). Las vitaminas A, E, C, los tocoferoles y el β-caroteno pueden degradarse durante la aplicación de un calor excesivo en el proceso de extrusión (34).

8.1.5. Efectos en los minerales

Numerosos autores han sugerido que la capacidad quelante de los PRM se debe a que estos compuestos se comportan como polímeros aniónicos capaces de formar complejos con ciertos iones metálicos pudiendo alterar el proceso de absorción o afectar su normal metabolismo y excreción y reduciendo, en definitiva, su biodisponibilidad.

Las dietas que contienen PRM producen un aumento en la excreción urinaria de cobre, hierro y zinc, tanto en animales de experimentación como en humanos (35). Estudios en alimentos como el tomate, indican que determinados productos de Amadori como la D-fructosa-L-histidina, se comportan como potentes quelanles de cobre a pH fisiológico, capaces de formar complejos más estables que otros ligandos de reconocida actividad quelante y antioxidante como la L-histidina y la L-carnosina (36). Además, se ha observado que tanto las melanoidinas solubles como las insolubles, obtenidas tras el calentamiento de diferentes sistemas modelo aminoácido-azúcar, son capaces de quelar calcio y magnesio. El calcio puede ser quelado débilmente por los productos pardos pre-

sentes en el pan tostado. La adición de lactosa al pan y su posterior tostado incrementa la afinidad de estos PRM por el calcio, llegando a afectar significativamente su solubilidad (37). El hierro es uno de los minerales más sensible a la presencia de los PRM, tanto de bajo como de elevado peso molecular. La progresiva disminución de la solubilidad de hierro en relación con el calentamiento se debe a una disminución de la lisina libre y a la formación de melanoidinas insolubles (38).

8.1.6. Efectos mutagénicos y carcinogénicos

Dada la escasa información disponible sobre la relación entre estructura-efecto de los PRM de la dieta tanto en el propio alimento como en el organismo humano, se han fomentado diversas acciones europeas (COST 919: "Melanoidins in Food and Health" y COST 927: "Thermally Processed Foods: Possible Health Implications"), cuyo objetivo principal es el de investigar los métodos para obtener alimentos procesados más saludables y conocer más ampliamente los riesgos y beneficios de los compuestos que se forman durante el tratamiento térmico de los mismos, entre los que destacan los PRM (39).

Las aminas heterocíclicas procedentes de la reacción entre aminoácidos, monosacáridos y creatinina durante el tratamiento térmico de los alimentos representan un potencial factor de riesgo en la etiología del cáncer en humanos (40). En concreto, los procedentes de las carnes rojas asadas o del pescado a la parrilla, que se han relacionado, junto con otros metabolitos tóxicos, con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de colon y cáncer hepático (41). Además, estas aminas, una vez absorbidas pueden ser transformadas a nivel hepático en compuestos incluso más tóxicos y reactivos y ser reabsorbidos por la microbiota intestinal.

Otro compuesto clasificado como neurotóxico y carcinógeno es la acrilamida. En 2002, investigadores de la Universidad de Estocolmo realizaron un descubrimiento sorprendente: la formación de acrilamida en los alimentos (42). Desde entonces se ha encontrado esta sustancia en una amplia variedad de alimentos procesados a temperaturas elevadas. La acrilamida puede formarse en algunos alimentos durante el proceso de calentamiento, cuando se alcanzan temperaturas de 120 °C o más al freír, tostar o asar. Por ejemplo, inicialmente se descubrió que las patatas fritas, las galletas dulces y saladas, el pan tostado, los cereales de desayuno, las patatas asadas, ciertos productos de confitería y el café la contenían. Las investigaciones posteriores también han hallado acrilamida en

las frutas deshidratadas, las verduras asadas, las aceitunas negras y en algunos frutos secos tostados.

Muchos datos de la bibliografía sugieren efectos mutagénicos o genotóxicos de diferentes mezclas de PRM o melanoidinas capaces de inducir aberraciones cromosómicas en las células ováricas de hamster, conversión de genes en levaduras y mutaciones en *Salmonella typhimurium*.

8.1.7. Efectos alérgicos

Son numerosos los estudios que han demostrado la asociación entre los PRM y el desarrollo de alergias alimentarias, especialmente en la leche (43) y en los cacahuetes (44). Por el contrario, algunas proteínas presentes en frutas como la cereza, la manzana y en horalizas como el apio pueden perder su alergenicidad debido a su unión con carbohidratos reductores durante su tratamiento térmico (45).

8.1.8. Reacción de Maillard in vivo

La reacción de Maillard *in vivo* da lugar a compuestos conocidos como "productos de glicación avanzada" o AGE (del inglés, *Advanced Glication End-products*), que serían realmente los homólogos endógenos de los PRM de la dieta. La formación de estos compuestos en el organismo se produce de forma mucha más lenta, debido a las menores temperaturas, viéndose favorecida por la presencia de hidratos de carbono y proteínas endógenas como el colágeno y las enzimas (39). Su presencia ha sido relacionada con ciertas enfermedades como diabetes, neuropatías, retinopatías, desórdenes oculares como formación de cataratas, glaucoma y degeneración macular, impotencia, fibrosis pulmonar, enfermedades cardiovasculares, o enfermedades neurodegenerativas. Se postula que inducen el estrés oxidativo con el consecuente daño neuronal, provocan la muerte celular programada o apoptosis y están relacionados con el envejecimiento. La relación entre los PRM de la dieta y los AGE endógenos es hoy día motivo de estudio, ya que aún se desconoce si poseen efectos sinérgicos o antagónicos.

8.2. Aminas biógenas

Las aminas biógenas (AB) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos (46).

Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermita, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterociclicas (histamina, triptamina) y, en función del número de grupo aminos de la molécula, podemos hablar de monoaminas (histamina, feniletilamina, tiramina), diaminas (putrescina, cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina). Desde un punto de vista biológico, las AB son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos. En plantas, la putrescina y algunas poliaminas, como la espermidina y la espermina, están implicadas en diversos procesos celulares de respuesta al estrés y al envejecimiento. En animales están implicadas en procesos tan relevantes como la división celular o la transmisión nerviosa (47). Sin embargo, la descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, puede provocar la presencia de concentraciones altas de AB en los alimentos, de forma que tras su ingestión pasan a la circulación sanguínea desde donde ejercen diversos efectos tóxicos. Las AB más frecuentes en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, β-feniletilamina, espermina y espermidina, si bien, las intoxicaciones alimentarias más frecuentes están relacionadas con la histamina y la tiramina, cuyos aminoácidos precursores son la histidina y tirosina, respectivamente.

La intoxicación por histamina es la más conocida, existiendo referencias desde finales del siglo XIX sobre la incidencia de esta enfermedad, conocida como enfermedad escombroide debido se producía tras la ingestión de pescados escómbridos. La intoxicación producida por tiramina se conoce también como reacción del queso, debido a los altos niveles que esta AB presenta en algunos quesos. Además de su propia toxicidad, estudios recientes han demostrado que la tiramina favorece la adhesión de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 a la mucosa intestinal (48). Por otro lado, diaminas como putrescina y cadaverina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a la formación de nitrosaminas de conocido efecto cancerígeno. Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las AB debido a que los enzimas responsables de su destoxificación, la monoamino oxidasa (MAO) o la diamino oxidasa (DAO) no son funcionales, bien por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresivos. Por tanto, es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las AB ya que depende de la eficacia de los sistemas de destoxificación y por lo tanto varía de unos individuos a otros. Además, también depende de la presencia de otras AB ya que pueden tener efectos sinérgicos. Sin embargo, aunque en la actualidad no existe una ninguna legislación sobre las concentraciones permitidas en los alimentos, las autoridades sanitarias recomiendan reducir al máximo la ingestión de estos compuestos. En el caso de personas con tratamientos antidepresivos basados en inhibidores de la MAO está

contraindicado el consumo de queso, debido a los altos niveles de tiramina que puede contener. No obstante, es necesario subrayar que las concentraciones de AB varían no sólo de un tipo de alimento a otro, sino también dentro de un mismo tipo de alimento. Así por ejemplo, se han encontrado dentro de un mismo tipo de queso, variaciones que van desde 90 mg/kg hasta 2.100 mg/kg (49).

La presencia de AB en alimentos debe de atribuirse a la acción microbiana sobre la fracción proteica de la materia prima y más específicamente a las reacciones de descarboxilación de los aminoácidos precursores llevadas a cabo por determinadas bacterias. Por lo tanto, hay dos factores clave para su acumulación en los alimentos: la presencia de las bacterias con actividad aminoacil-descarboxilasa y la disponibilidad de los sustratos de la reacción. Los alimentos que presentan una mayor posibilidad de contener AB son aquellos que contienen una elevada carga proteica, aunque también en este aspecto será necesaria la intervención de los microorganismos y de su maquinaria proteolítica para liberar los aminoácidos precursores. La presencia de actividad aminoacil-descarboxilasa implicada en la síntesis de AB es una característica que depende de cada cepa bacteriana y no de la especie. Pueden ser bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y se pueden encontrar representantes en especies de diversos géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigellla*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus, Kocuria*, *Morganella, Vibrio* e incluso en bacterias reconocidas generalmente como seguras, como las pertenecientes a los generos *Lactobacillus*, *Pediococcus* o *Lactococcus*. En el caso de alimentos no fermentados serán bacterias contaminantes, principalmente Gram negativas, las responsables de la síntesis de AB. Algunos autores han sugerido que en este tipo de alimentos la concentración de AB podría ser considerada como un indicador de la carga microbiana. Por lo tanto, la solución pasa por una correcta manipulación y conservación de los alimentos, de forma que se evite la contaminación y proliferación microbiana. Mención aparte merecen los alimentos y bebidas fermentados en los que intervienen bacterias lácticas (vino, sidra, productos lácteos, encurtidos, embutidos...) donde, además de a los microorganimos contaminantes, la actividad descarboxilasa puede estar asociada a las bacterias que forman parte del cultivo iniciador o de la microbiota secundaria. Por lo tanto, la incapacidad de sintetizar AB debe ser incluida entre los criterios de selección de los cultivos iniciadores (50-52).

La sintomatología más frecuente de la intoxicación histamínica (Tabla 6) es una ligera hipotensión arterial, picor, enrojecimiento y edema facial, dolor de cabeza, e incluso diarrea. La aparición de estos síntomas varía entre algunos minutos y varias horas desde la ingestión. Normalmente, todos los síntomas remi-

ten entre las 12 y las 24 horas sin dejar secuelas. En los casos más graves puede producir calambres, náuseas sin vómitos y diarrea, así como espasmos bronquiales, sofoco y trastornos respiratorios graves que suelen confundirse con una crisis alérgica.

La histamina es común en muchos alimentos como pescado, quesos, vinos o embutidos. Para el pescado existe una normativa específica que fija los límites entre 100 y 200 ppm. Esta concentración puede doblarse en productos de pesca salados; por ejemplo, las semiconservas de anchoa y productos similares. Este aumento se debe a que el proceso de elaboración en estos alimentos se basa en la acción de microorganismos y enzimas sobre el producto fresco. Las especies de pescado más implicadas son el atún, las sardinas, las caballas, los arenques y los boquerones, todas ellas de elevado consumo en nuestro país, tanto frescos como en conserva o en sal.

Analizadas las causas de la intoxicación, es evidente la importancia del control y prevención de la contaminación por manipulación del pescado. Se debe tener en cuenta que en nuestro país el consumo de este producto es muy elevado y se suman las altas temperaturas estivales, con lo que el riesgo de su presencia en pescado fresco durante el verano es muy alto.

TABLA 6. *Principales aminas biógenas en los alimentos y sus efectos en humanos*

Amina biógena	**Efectos**
Histamina	Síntesis de noradrenalina y adrenalina Palpitaciones Vómitos, náuseas
Tiramina	Hipertensión Migrañas Vasoconstricción Lacrimación y salivación Aumento de la glucemia Parálisis de las extremidades
Putrescina y cadaverina	Rigidez mandibular Bradicardia Hipotensión Potencia el efecto de otras aminas
β-feniletilamina	Hipertensión Migrañas
Triptamina	Hipertensión

Por lo que respecta a los quesos, los aminoácidos libres presentes en elevadas concentraciones en los quesos fuertemente proteolizados pueden ser descarboxilados a aminas biógenas por enzimas de microorganismos presentes en el queso, con los consiguientes efectos perjudiciales sobre la salud del consumidor. Así, se han encontrado concentraciones de histamina próximas a 1000 mg/kg en algunos quesos españoles tales como Cabrales, Idiazábal y Roncal (53), cifras elevadas teniendo en cuenta que se considera que 75 mg de histamina son suficientes para provocar síntomas en el 50% de voluntarios sanos (54). En cualuier caso, resulta difícil pronunciarse sobre unos niveles de histamina en queso que sean tolerables para garantizar la seguridad del producto, ya que son diversos los problemas añadidos: 1) No ha habido pronunciamiento alguno por parte ningún organismo sobre un límite de este tipo en queso. 2) No hay consenso en la literatura científica sobre cuáles son los niveles de histamina en queso que serían seguros para el consumo, a pesar de que se ha sugerido un límite máximo legal de 100 mg de histamina por Kg de alimento. 3) Se sabe que la toxicidad de la histamina es potenciada por la presencia de otras aminas biógenas que normalmente se encuentran también en cantidades muy variables en los quesos y otros alimentos.

En los vinos se han detectado hasta 24 aminas diferentes, siendo la putrescina la más abundante, seguida de la isoamilamina, histamina, tiramina y feniletilamina en concentraciones decrecientes. El rango de concentración de aminas totales en vinos se extiende desde pocos miligramos a 50 mg/L, dependiendo del vino (24, 39). En general, los vinos tintos contienen una concentración más alta de aminas que los vinos blancos. Recientemente, se han descrito cantidades de hasta 48 mg/L de aminas biógenas en vinos españoles o portugueses. En relación con la reglamentación, en España no existe una norma específica para el contenido de aminas en vinos, a diferencia de otros países europeos en los que sí que existen recomendaciones sobre límites máximos para la histamina en vino: Alemania (2 mg/L), Bélgica (5-6 mg/L), Francia (8 mg/L) y Suiza (10 mg/L). Esta situación ha hecho aparecer barreras a la exportación de algunos vinos españoles a dichos países. Además, la presencia de estas sustancias afecta a las propiedades organolépticas del vino. Así, los consumidores habituales de vino, cuando son sometidos a una disciplina de cata, son capaces de detectar defectos organolépticos presentes en el vino, asociados a ciertos compuestos químicos originados por una fermentación maloláctica sin control, como es el caso de la putrescina y la cadaverina.

Como en el resto de alimentos, la síntesis de aminas biógenas en los vinos supone la coincidencia de tres factores diferentes: la existencia de precursores

(aminoácidos), la presencia de bacterias lácticas con la actividad descarboxilasa correspondiente y la concurrencia de las condiciones ambientales adecuadas (55, 56). La existencia de aminoácidos se encuentra cualitativa y cuantitativamente ligada a las materias primas y a la tecnología de vinificación. Para empezar, depende lógicamente de la concentración inicial en el mosto y está en función de la variedad de uva, del momento de la vendimia, del estado de maduración de la uva, entre otros factores de producción. Un segundo origen puede estar en la adición de nutrientes en forma de aminoácidos o de nitrógeno inorgánico utilizado por las levaduras para su producción. La maceración del mosto con piel y semilla de la uva permite la transferencia de más compuestos nitrogenados a la fracción líquida, tanto más cuanto más larga e intensa es la maceración. Esta transferencia se incrementa en el momento del prensado. La adición de pectinasas y proteasas también aumenta la concentración de aminoácidos. Cuando hay lisis de microorganismos, especialmente de las levaduras, hay una liberación de proteínas, péptidos y aminoácidos tanto más importante como intensa es la lisis. Finalmente, la crianza sobre lías acaba por redondear el escenario de las situaciones que originan la presencia de aminoácidos libres en el vino.

El segundo factor mencionado al principio es la presencia de los microorganismos con actividades descarboxilásicas adecuadas. Los que contribuyen en mayor medida son las bacterias lácticas, pero de manera diferente. En cuanto a la histamina, *Oenococcus oeni* es la especie con un porcentaje más alto de cepas que poseen el gen *hdc*, codificante para la histidina descarboxilasa y catalizador de la síntesis de histamina (aproximadamente un 80% de las cepas). Afortunadamente, estas cepas suelen tener actividades de histidina descarboxilasa bajas y no aumentan demasiado la cantidad de histamina en el vino. Raramente producen más de 5 mg/L en el vino. Por el contrario, *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus hilgardii* (16 y 27% de cepas productoras de histamina, respectivamente) pueden producir entre 40 y 50 mg/L en el vino. Algunos lactobacilos, e incluso leuconostocs, también pueden producir cantidades intermedias de histamina. En relación con la tiramina, tenemos una situación similar, a excepción de no encontrarse cepas de *O. oeni* productoras de tiramina. Un 78% de cepas de *Lactobacillus brevis* producen tiramina, y un 25% de *L. hilgardii*. Se ha visto, además, que existe una correlación entre la síntesis de tiramina y feniletilamina, quizá porque el mismo enzima cataliza ambas actividades. Por lo que refiere a la putrescina, esta es la amina biógena más abundante, pero también se ha observado que hay una notable producción por parte de la vid, de modo que en mosto ya se puede encontrar en cantidades significativas. En ocasiones, también se produce síntesis microbiana, pero no es tan habitual.

En general, desde un punto de vista científico parece claro que la presencia de cantidades elevadas de histamina y otras aminas puede indicar una mala práctica de elaboración, ya sea porque se han utilizado materias primas de baja calidad higiénica o porque se han dado contaminaciones microbianas a lo largo del proceso de elaboración o de distribución. Dado que se ha estimado que un 20% de la población puede ser sensible a la histamina, sería bueno que las industrias alimentarias aceptaran el reto de elaborar alimentos con niveles bajos de histamina y otras aminas biógenas y, eventualmente de la misma manera que se hace con la presencia de alérgenos, considerar la declaración del contenido de histamina en el etiquetado. En esta línea, ya se comercializan en Europa algunos productos que declaran en la etiqueta, como alegación de calidad, la ausencia de histamina o su presencia en niveles bajos. En España, esta práctica ya se lleva a cabo en ciertos tipos de vinos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. IFST (1993) *Shelf life of foods. Guidelines for its determination and prediction*. London: Institute of Food Science & Technology.
2. Forsythe, S. J. & Hayes, P. R. (1998) *Food hygiene, microbiology and HACCP*. Gaithersburg: Aspen Publishers.
3. Sanders, T. A. B. (1994) Nutritional aspects of rancidity. In J. C. Alien, & R. J. Hamilton (Eds.), *Rancidity in food* (pp.128-140). London: Blackie Academic & Professional.
4. Forsythe, S. J. (2000) *Alimentos seguros: microbiología*. Zaragoza: Editorial Acribia.
5. Dainty, R. H. (1996) Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology,* 33: 19-33.
6. ICMSF (1998) *Microorganismos de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
7. Kilcast, D. & Subramanian, P. (2003) *The stability and shelf-life of food*. Boca Raton: CRC Press.
8. Dainty, R. H. & Mackey, B. M. (1992) The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*. **73:** 103S-114S.
9. Ruiter, A. (1999) *El pescado y los productos derivados de la pesca: composición, propiedades nutritivas y estabilidad*. Zaragoza: Editorial Acribia.
10. Kraft, A. A. (1992) *Psychrotrophic bacteria in foods: disease and spoilage*. Boca Raton: CRC Press.

11. Liston, J. (1992) Bacterial spoilage of seafood. In H. H. Huss, M. Jacobsen, & J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the fish industry* (pp. 93-105). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

12. Dalgaard, P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*. **26:** 319-333.

13. Ward, D. R. & Baj, N. J. (1988) Factors affecting the microbiological quality of seafoods. *Food Technology*. **42(3):** 85-89.

14. Subburaj, J., Darunasagar, I. & Karunasagar, I. (1984) Incidence of histidine decarboxylating bacteria in fish and market environs. *Food Microbiology*. **1:** 263-267.

15. Mossel, D. A. A., Moreno, B. & Struijk, C. B. (2006) *Microbiología de los alimentos* (2ª ed.). Zaragoza: Editorial Acribia.

16. Berrang, M. E., Brackett, R. E. & Beuchat, L. R. (1989) Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. *Journal of Food Protection*. **52:** 702-705.

17. Wells, J. M. & Butterfield, J. E. (1999) Incidence of *Salmonella* on fresh fruits and vegetables affected by fungal rots or physical injury. *Plant Diseases*. **83:** 722-726.

18. Friedman, M. (1996) Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44:** 631-653.

19. Yaylayan, V. A. (1997) Classification of the Maillard reaction: A conceptual approach. Trends *in Food Science and Technology*. **8:** 13-18.

20. Cremer, D. R. & Eichner, K. (2000) The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry*. **71:** 37-43.

21. Weenen, H. (1998) Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chemistry*. **62:** 393-401.

22. Delgado-Andrade, C., Seiquer, I. & Navarro, M. P. (2006) Changes in calcium absorption and subsequent tissue distribution induced by Maillard reaction products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86:** 271-278.

23. Sarriá, B. & Vaquero, M. P. (2004) Iron bioavailability from powdered and in-bottle-sterilized infant formulas in suckling and weanling rats. *Nutrition*. **20:** 788-793.

24. Rerat, A., Calmes, R., Vaissade, P. & Finot, P. A. (2002) Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *European Journal of Nutrition*. **41:** 1-11.

25. Kato, Y., Matsuda, T., *Kato*, N., Watanabe, K. & Nakamura, R. (1986) Browning and insolubilization of ovalbumin by the Maillard reaction with some aldohexoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **34:** 351-355.

26. Finot, P. A. (1993) Toxicology of non enzymatic browning. In Macrae, R., Robinson, R., & Sadler, K. M. J. *Encyclopedia of food science, food technology, and nutrition*. London: Academic Press.

27. Dworschak, E. (1980) Nonenzyme browning and its effect on protein nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **13:** 1-40.

28. Oste, R. E., Miller, R., Sjostrom, H. & Noren, O. (1987) Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. **35(6):** 938-942.

29. Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., Muñoz, A., Galdó, G. & Navarro, M. P. (2006) Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *American Journal of Clinical Nutrition*. **83(5):** 1082-1088.

30. Lowry, K. R., Fly, A. D., Izquierdo, O. A. & Baker, D. H. (1989) Effect of heat processing and storage on protein quality and lysine bioavailability of a commercial enteral product. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. **14:** 68-73.

31. García-Baños, J. L, Del Castillo, M. D., Sanz, M. L., Olano, A. & Corzo, N. (2005) Maillard reaction during storage of powder enteral formula. *Food Chemistry*. **89:** 555-560.

32. Ford, J. E., Hurrell, R. F. & Finot, P. A. (1983) Storage of milk powders under adverse conditions. 2. Influence on the content of water-soluble vitamins. *British Journal of Nutrition*. **49:** 355-364.

33. Singh, S., Gamlath, S. & Wakeling, L. (2007) Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science and Technology*. **42:** 919-929.

34. Killeit, U. (1994) Vitamin retention in extrusion cooking. *Food Chemistry*. **49:** 149-155.

35. Navarro, P., Aspe, T. & Seiquer, I. (2000) Zinc transport in Caco-2 cells and Zinc in rats: Influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*. **48:** 3589-3596.

36. Mossine, V. V. & Mawhinney, T. P. (2007) Nα-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-L-histidine (D-Fructose-L-histidine): a potent copper chelator from tomato powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55:** 10373-10381.

37. Rendleman, J. A. (1987) Complexation of calcium by the melanoidin and its role in determining bioavailability. *Journal of Food Science*. **6:** 1699-1705.

38. Delgado-Andrade, C., Seiquer, I. & Navarro, M. P. (2004) Bioavailability of iron from a heat treated glucose-lysine model food system: assays in rats and in Caco-2 cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **84:** 1507-1513.

39. Somoza, V. (2005) Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Molecular Nutrition & Food Research*. **49:** 663-672.

40. Skog, K. I., Johansson, M. A. & Jägerstad, M. I. (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Journal of Food Chemistry and Toxicology*. **36:** 879-896.

41. Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. & Nagao, M. (2004) Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*. **95:** 290-299.

42. Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Törnqvist, M. (2002) Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50(17):** 4998-5006.

43. Kaminogawa, S., Kumagai, Y., Yamauchi, K., Iwasaki, E., Mukoyoma, T. & Baba, M. (1984) Allergic skin reactivity and chemical properties of allergens in two grades of lactose. *Journal of Food Science*. **4:** 529-35.

44. Chung, S. Y. & Champagne, *E. (*1999) Allergenicity of Maillard reaction products from peanut protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **47:** 5227-5231.

45. Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J. & Hofmann, T. (2004) Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52:** 4002-4007.

46. Fernández, M. & Álvarez, M. A. (2005) Las aminas biógenas en los alimentos. *CTC Alimentación*. **26:** 84-90.

47. Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. & Huis in´t Veld, J. H. J. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in food. *International Journal of Food Microbiology*. **11:** 73-84.

48. Lyte, M. (2004) The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *Journal of Food Protection*. **6:** 878-883.

49. Roig-Sagués, A. X., Molina, A. P. & Hernández-Herrero, M. M. (2002) Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*. **215:** 96-100.

50. Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M. C. (2000) Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *Journal of Food Protection*. **63:** 237-243.

51. Lonvaud-Funel, A. (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiological Letters*. **199:** 9-13.

52. Suzzi, G. & Gardini, F. (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. **88:** 41-54.

53. Fernández, M., del Río, B., Linares, D. M., Martín, M. C. & Alvarez, M. A. (2006) Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *Journal of Dairy Science*. **89:** 3763-3769.

54. Wohrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K. & Jarisch R. (2004) Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy and Asthma Proceedings*. **25:** 305-311.

55. Ferrer, S. & Pardo. I. (2005) Prevenció de l'aparició d'amines biògenes en vins. *ACE Revista d'Enologia*. **70:** 6-8.

56. Woller, R. (2005) Amines biògenes: presencia en el vi i efectes en l'organisme. *ACE Revista d'Enologia*. **70:** 9-13.