

# Premezcla conservante con ácido fumárico para uso en la industria de panificación

## Preservative Premix With Fumaric Acid for Use in the Bakery Industry

Mariana Cardona Betancur<sup>1</sup> y Francia Elena Valencia Garcia<sup>2</sup>

### Resumen

Soluciones innovadoras saludables como alternativas para la conservación de alimentos que permitan prevenir el desperdicio de los mismos es uno de los focos de las empresas alimentarias, ya que los microorganismos cada vez son más resistentes a las alternativas actuales. Por ello, este estudio buscó comparar el efecto antimicrobiano del ácido fumárico (AF) con otros conservantes sobre mohos que deterioran alimentos, evaluar su eficiencia y posible sinergia *in vitro* así como su acción en la elaboración de muffins. Se emplearon propionato de calcio (PC), sorbato de potasio (SP), ácido cítrico (AC), ácido láctico (AL), evaluando su capacidad inhibitoria solos y en mezclas con ácido Fumárico sobre tres especies de mohos, midiendo el radio de crecimiento en placas de Petri y calculando el porcentajes de inhibición (% I). Al seleccionar la mejor mezcla, esta fue adicionada a muffins que fueron evaluados por 17 días mediante recuento de mohos y levaduras. Los % I más altos fueron para *Penicillium* sp. 89 % con SP. Para *A. flavus* de 54 % con AC y AL y para *A. niger* 70 % I con AL. La mejor mezcla fue AF 2000 ppm con SP 300 ppm. El % I fue diferente para cada conservante y especie de moho a las concentraciones evaluadas y se evidenció el efecto antimicrobiano del AF solo y en mezcla con SP para el control de diferentes especies de mohos. Al aplicar la mezcla en muffins, no pudo establecerse el efecto inhibitorio de los mohos en el tiempo, aunque se evidenció menor diversidad de colonias aisladas.

**Palabras clave:** ácido fumárico, control de microorganismos, conservación de alimentos, sinergismo entre conservantes.

### Abstract

Innovative healthy solutions as alternatives for food preservation that prevent food waste, is one of the focuses of food companies, since microorganisms are increasingly resistant to current alternatives. For this purpose, the antimicrobial effect of fumaric acid (FA) with preservatives and organic acids on food spoilage molds and evaluate their efficiency and possible synergy *in vitro* and applied in Muffins. Calcium propionate (CP), potassium sorbate (PS), citric acid (CA), lactic acid (LA) were used to evaluate their inhibitory capacity alone and in mixtures with (FA) on three species of molds, measuring the growth radius in Petri dishes and calculating inhibition percentages (% I). When the best mixture was selected, it was added to muffins, that were evaluated for 17 days by counting molds and yeasts. The highest % I was for *Penicillium* sp. 89 % with SP. For *A. flavus* 54 % with AC and AL and for *A. niger* 70 % I with LA. The highest variability in antimicrobial effects was for *Penicillium* sp. The selected mixture was AF 2000 ppm with SP 300 ppm. When applied to muffins, the effect on storage time could not be established, although it presented less diversity of isolated colonies. The % I was different for each preservative and mold species at the concentrations evaluated, and the antimicrobial effect of FA alone and in mixture with potassium sorbate for the control of different mold species was evident.

**Keywords:** control of microorganisms, fumaric acid, food preservation, preservative activity, synergism among preservatives.

**Recepción:** 21-jul-2022

**Aceptación:** 13-dic-2022

<sup>1</sup>Ingeniera química. Magíster en Ingeniería, Coordinadora de Investigación, Desarrollo y Calidad de Addimentum (Andercol International SAS), Colombia. Correo electrónico: mariana.cardona@addimentum.co. ORCID: 0000-0002-9011-0865.

<sup>2</sup>Ph. D. en Farmacia y Alimentos obtenido en la Universidad de Antioquia. M Sc. en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional. Profesora e investigadora del programa de Microbiología Industrial y Ambiental de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Correo electrónico: Francia.valencia@udea.edu.co. ORCID: 0000-0002-4167-2167.

## 1 Introducción

La creciente necesidad por encontrar alternativas sostenibles de sustancias conservantes, los estilos de vida acelerados y la pérdida y el desperdicio de alimentos son actualmente los temas que retan a la industria alimentaria [1]. Con relación a lo primero, las megatendencias apuntan al desarrollo de aditivos alimenticios como los conservantes que sean más naturales, innovadores y con una producción más limpia, con lo segundo, los consumidores buscan productos con mayor vida de anaquel que les permitan optimizar tiempo a la vez que consumen alimentos más saludables, por último, las industrias buscan alternativas que permitan inhibir de manera óptima microorganismos causantes del deterioro [2], alineado a lo establecido por la Organización de las Naciones Unidas (FAO) al 2030, *reducir a la mitad el desperdicio de alimentos per cápita mundial en la venta al por menor, a nivel de los consumidores y en las cadenas de producción y suministro*, dado que actualmente el índice de pérdidas de alimentos se encuentra alrededor del 14% en todo el mundo [3].

Teniendo en cuenta las tendencias del mercado, el Codex Alimentarius ha incluido dentro de sus recomendaciones 22 compuestos como conservantes alimenticios, entre estos se encuentran algunos ácidos, sales y mezclas de estos, así como compuestos de síntesis química y de origen biológico [4], en cualquiera de los casos, la acción antimicrobiana de estos compuestos varía dependiendo del microorganismo, de su metabolismo y de su estructura celular, entre otros; igualmente su acción depende de la matriz alimentaria donde se aplica. No existe un conservante eficaz sobre un espectro contaminante amplio, aunque la combinación de estos compuestos entre sí o con otros compuestos como ácidos orgánicos podrían mejorar la capacidad antimicrobiana y además, aportan ventajas como son: tener bajo costo, bajo nivel de toxicidad, además que se emplean como reguladores de pH, potenciadores de sabor, e inhibidores de las reacciones de oscurecimiento o pardeamiento en los alimentos [5, 6, 7].

Entre los ácidos orgánicos empleados como conservantes se encuentran los ácidos fumárico, cítrico, láctico, sórbico, propionico y algunas de sus sales

de calcio y sodio, los cuales son empleados en diferentes aplicaciones donde una de los mercados más importantes es la industria de panadería y repostería, el cual se encuentra en crecimiento y representa cerca de 358 mil millones de dólares en el mundo [8]. Dentro de este mercado se encuentran alimentos como tortillas y panes planos, panes de molde, panes dulces, galletas, entre otros, que incluyen dentro de su formulación el ácido fumárico y otros conservantes [9]. Es así como, el uso de premezclas permite a los productores una mejor manipulación de los aditivos al momento de elaboración, y la posibilidad de mejorar el espectro de acción de los conservantes y las propiedades funcionales de los alimentos [10].

Por su lado, el ácido fumárico está categorizado como acidulante y regulador de pH (Codex Alimentarius, 2015) [4] y es reconocido como seguro por la FDA, sin embargo, no existen trabajos que evalúen su capacidad antimicrobiana, ni su eficacia sobre los diferentes grupos de microorganismos, por esta razón, esta investigación se centró en comparar el efecto antimicrobiano del ácido fumárico con otros compuestos químicos sobre mohos causantes del deterioro en alimentos y evaluar su eficiencia y posible sinergia con otros conservantes, así como, su uso en un alimento específico (Muffins), para ofrecer alternativas naturales de conservación.

## 2 Metodología

Microorganismos y conservantes empleados. Los microorganismos empleados en el estudio fueron los mohos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.*, los cuales son comunes en el deterioro de los productos de panificación y repostería. Estos mohos fueron donados por el Grupo de investigación de Microbiología Ambiental de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia. Las esporas de los cultivos fueron conservadas en refrigeración. En el momento requerido, los mohos se cultivaron en agar papa dextrosa PDA (Oxoid, España), a 25 °C durante 6 días y las esporas fueron colectadas adicionando Tween 80 estéril (PanReac ApliChem) al 0,01% y diluidas hasta alcanzar una densidad de 10<sup>6</sup> conidios/mL, contados mediante cámara de Neubauer. Las suspensiones fueron almacenadas a -20 °C por 3 h hasta su uso en las pruebas antagónicas.

Los ácidos orgánicos y las sales empleados fueron ácido fumárico al 99,9% (Addimentum), propionato de calcio al 99%, sorbato de potasio al 99,9%, ácido cítrico al 99%, ácido láctico al 99%, los últimos cuatro obtenidos en mercados especializados en alimentos. Para cada uno de estos conservantes, se evaluaron las concentraciones de acuerdo con los valores máximos, mínimos y recomendados según la norma Icontec - NTC 1453:2012 y la última revisión del Codex Alimentarium.

**Etapa I.** Capacidad antimicrobiana individual del ácido fumárico y otros conservantes. Para este ensayo se evaluaron y compararon tres concentraciones diferentes de las sales, propionato de calcio (PC) y sorbato de potasio (SP) (Obtenidos de un distribuidor especializado en materias primas para alimentos). Y tres ácidos orgánicos, ácido cítrico (AC), ácido láctico (AL) (Obtenidos de otros distribuidores especializado en materias primas para alimentos) y ácido fumárico (AF) (fabricado por Addimentum), como se muestra en la Tabla 1. Cada concentración fue evaluada de manera individual con cada especie de los mohos.

**Tabla 1.** Concentraciones de cada conservante evaluadas individualmente con cada uno de los tres mohos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp*

Conservante	Concentraciones mínimas, intermedias y máximas empleadas para los ensayos (ppm)		
Ácido fumárico (AF)	1000	2000	3000
Ácido cítrico (AC)	1000	2000	3000
Ácido láctico (AL)	1000	2000	3000
Propionato de calcio (PC)	1000	2000	3000
Sorbato de potasio (SP)	300	600	1000

Para evaluar la actividad antifúngica de los conservantes fue propuesto el método en Placas de Petri a partir de un cribado preliminar. Para la evaluar cada conservante, se prepararon soluciones stock con una concentración mayor a la evaluada de manera que, al pipetear la solución para el ensayo en las cajas de Petri, las concentraciones finales en el agar se encontraran dentro de los valores descritos en la Tabla 1. Para ello, 1 mL de cada conservante preparado fue mezclado con 20 mL de agar PDA (Oxoid, España) y puesto en cajas de Petri estériles hasta su solidificación y se hizo un pozo en el centro del agar con un sacabocados, dentro del pozo, se adicionó 20 µl de

la suspensión de esporas con  $10^6$  conidios/mL. Las cajas fueron incubadas a temperatura de  $24 \pm 2$  °C y durante 48 h, 120 h y 196 h. En estos tiempos, se realizó la medición del radio de crecimiento de las colonias de los mohos en mm con un pie de rey, los valores obtenidos para cada moho fueron promediados. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Los porcentajes de inhibición fueron calculados con base al radio de crecimiento del control en los diferentes tiempos evaluados (ecuación 1):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{RCr_{\text{Conservante}} (\text{mm})}{RCr_{\text{Control}} (\text{mm})} * 100 \quad (1)$$

dónde *RCr*: Radio de crecimiento (mm).

**Etapa II.** Capacidad antimicrobiana del ácido fumárico en mezclas con otros conservantes. Teniendo en cuenta el efecto antimicrobiano presentado por cada conservante en las diferentes concentraciones empleadas en la etapa anterior, se seleccionaron las mejores mezclas de compuestos como se muestra en la Tabla 2. Igualmente, las mezclas de estas concentraciones de conservantes fueron previamente preparadas para que se ajustaran a las concentraciones definidas, donde 1 mL de la mezcla de conservantes fue mezclada con 20 mL de agar PDA (Oxoid, España) y la mezcla fue puesta en cajas de Petri estériles. Después de solidificado el agar, se hizo un pozo en el centro de la caja con un sacabocados y se adicionó en el pozo 20 µl de la suspensión de esporas con  $10^6$  conidios/mL. Las cajas fueron incubadas a temperatura de  $24 \pm 2$  °C y durante 48 h, 120 h y 196 h. En estos tiempos, se realizó la medición del radio de crecimiento de las colonias de los mohos en mm con un pie de rey, los valores obtenidos para cada moho fueron promediados. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

**Tabla 2.** Concentraciones empleadas de ácido fumárico en mezcla con diferentes conservantes.

Premezcla	Concentración de los conservantes				
	Ácido fumárico	Propionato de calcio	Sorbato de potasio	Ácido cítrico	Ácido láctico
1	2500 ppm	2000 ppm	0	0	0
2	2500 ppm	0	300 ppm	0	0
3	2500 ppm	0	0	2000 ppm	0
4	2500 ppm	0	0	0	2000 ppm

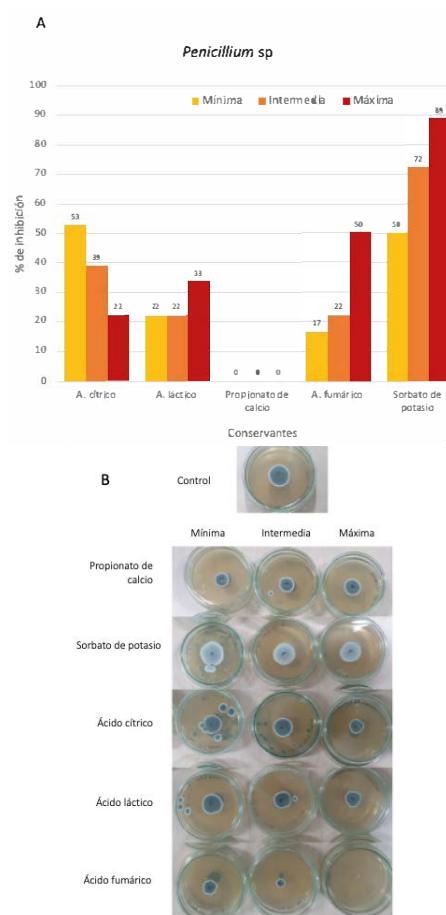
**Etapa III.** Evaluación de la eficiencia de la mejor mezcla de conservantes obtenida en una matriz alimentaria. Para evaluar la mezcla que presentó la mejor actividad antifúngica, fueron elaborados muffins empleando una formulación base que contenía 100% de harina de trigo, 75% de azúcar micropulverizada, 60% de huevos; 43,5% de leche, 28% de mantequilla y 28% de margarina, 0,6% de esencia y 0,3% de sal [11], empleando la mejor mezcla obtenida en la etapa anterior de ácido fumárico a 2000 ppm y Sorbato de potasio a 300 ppm; adicionalmente, se comparó esta premezcla con dos premezclas que se emplean en algunas formulaciones comerciales en las mismas concentraciones (2000 ppm ácido/300 ppm sorbato) pero empleando los ácido cítrico y láctico. las tres premezclas fueron comparadas con un muffin patrón (control) al que no se le adicionó ningún conservante, cada lote de muffins se realizó de forma aleatoria por duplicado. El recuento de mohos y levaduras fue realizado almacenando los muffins entre  $28 \pm 3$  °C, tomando muestras en cuatro tiempos diferentes 0, 4, 8 y 17 días, durante el almacenamiento para evaluar el efecto de los conservantes sobre la vida útil del producto terminado.

Recuentos de mohos y levaduras en los muffins. La determinación de mohos y levaduras fue realizada empleando agar oxitetraclina glucosa yeast (OGY) (Merck-Millipore, Alemania), suplementado con gentamicina 0,05% empleando la metodología de la Norma Técnica Colombiana NTC 5698-1 [12]. Los recuentos de mohos y levaduras fueron realizados por duplicado para cada muestra evaluada.

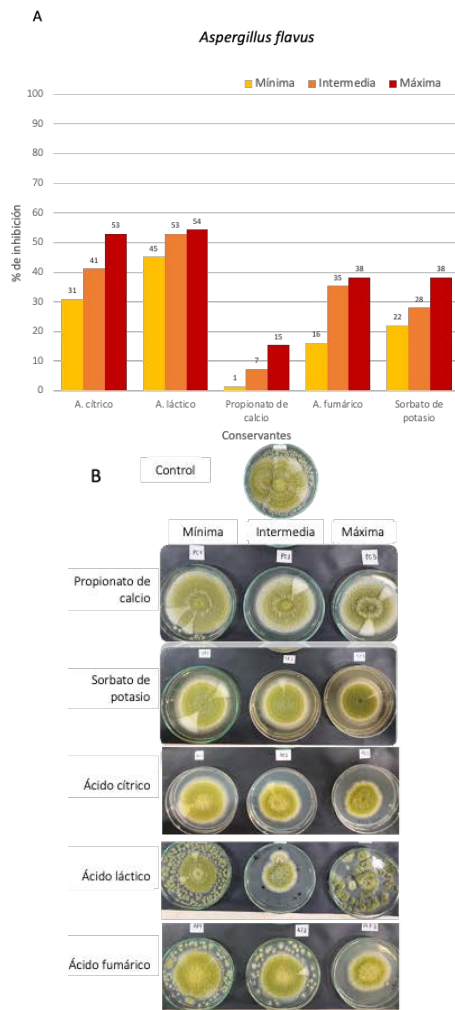
### 3 Resultados

**Etapa I.** Capacidad antimicrobiana del ácido fumárico y otros conservantes frente a diferentes mohos.

El promedio del porcentaje de inhibición de los halos de crecimiento de los tres mohos *Penicillium sp.*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* frente a las diferentes concentraciones de los conservantes evaluados de manera individual, y las imágenes de algunas de las cajas de Petri con el crecimiento que presentaron los hongos después de las 192 h incubación, se presentan en las figuras 1, 2 y 3.



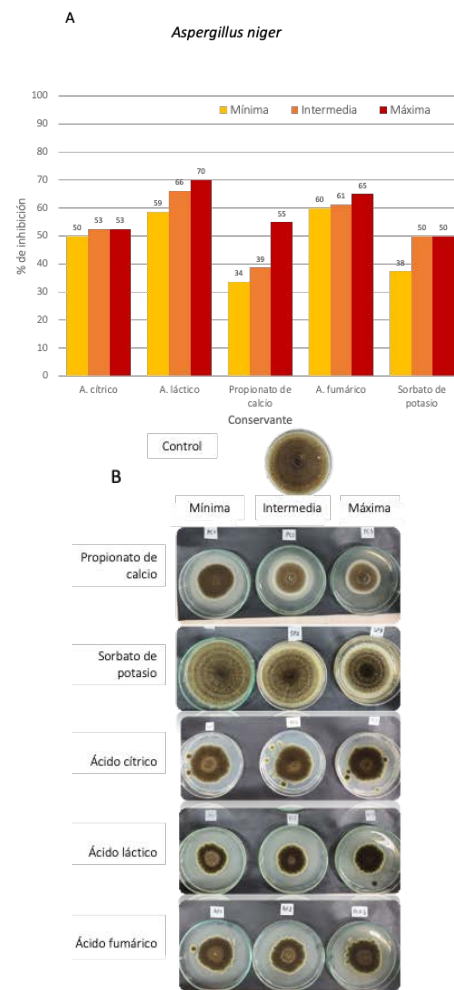
**Figura 1.** Resultados del porcentaje de inhibición de crecimiento del moho *Penicillium sp.* frente a diferentes concentraciones de conservantes. B. Crecimiento presentado por *Penicillium sp.* para las tres concentraciones de conservantes después de 192 h incubación.



**Figura 2.** Resultados del porcentaje de inhibición de crecimiento del moho *Aspergillus flavus* en las tres concentraciones de conservantes evaluadas. B. Crecimiento presentado por *A. flavus* para las tres concentraciones de conservantes después de 192 h incubación.

En el caso de *Penicillium* sp. El porcentaje de inhibición (% I) estuvo entre 0 y 89% para todos los conservantes, presentando la mayor variabilidad en los efectos antimicrobianos en comparación a los otros mohos evaluados.

Al evaluar cada uno de los conservantes se encontró, que el propionato de calcio no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre este moho a ninguna de las concentraciones empleadas (0% I) (Figura 1A), presentando un comportamiento similar al control al evaluar las imágenes de la Figura 1B. Por su parte, el ácido cítrico, a diferencia de todos los conservantes, tuvo mayor efecto de inhibición a la menor concentración de 1000 ppm (53% I) que la concentración más alta de 3000 ppm (22% I), esto puede deberse a que algunos mohos



**Figura 3.** Resultados del porcentaje de inhibición de crecimiento del moho *Aspergillus niger* en las tres concentraciones de conservantes evaluadas. B. Crecimiento presentado por *Aspergillus niger* para las tres concentraciones de conservantes después de 192 h incubación.

pueden producir ácido cítrico como subproducto de su metabolismo y a mayor concentración puede tener un efecto de inhibición. Se ha observado, durante la producción industrial de AC se tiene un alto rendimiento de éste cuando existe una alta acumulación de este ácido en el micelio [13], lo que les puede conferir resistencia. Por otro lado, el sorbato de potasio tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre *Penicillium* sp. a las concentraciones más altas 600 ppm (72% I) y 1000 ppm (89% I). Mientras que el ácido fumárico presentó casi tres veces mayor poder inhibitorio sobre *Penicillium* sp a la mayor concentración empleada (3000 ppm) (50% I) que a la concentración más baja (1000 ppm) (17% I). Al comparar todos los conservantes se puede concluir que los conservantes que mejor efecto inhibitorio

presentaron fueron el ácido fumárico y el sorbato de potasio en sus máximas concentraciones (3000 ppm y 1000 ppm, respectivamente).

Para *A. flavus*, el ácido cítrico presentó a mayor concentración de uso mayor efecto inhibitorio sobre este hongo, a diferencia del efecto que tuvo sobre la cepa *Penicillium* sp empleado en esta experimentación. Por otro lado, el ácido láctico no presentó mayor diferencia entre el efecto inhibitorio alcanzado para este hongo a las dos concentraciones más altas empleadas de 2000 ppm (53 % I) y 3000 ppm (54 % I). Por su parte, el propionato de calcio presentó un efecto inhibitorio bajo, que fue aumentando al aumentar la concentración de uso, alcanzando 15 % de I a la mayor concentración de uso (3000 ppm). Con relación al ácido fumárico (AF), éste obtuvo el tercer puesto en el % I y las dos concentraciones más altas (2000 ppm y 3000 ppm) presentaron resultados de inhibición cercanos (35 % y 38 %). Por último, el sorbato presentó casi un 50 % menos de inhibición a las tres concentraciones empleadas, que el % I presentado para el hongo *Penicillium* sp. Para este moho las diferentes concentraciones de ácido láctico (AL) y el ácido cítrico (AC) fueron las que mejor porcentaje de inhibición presentaron (Figura 2A).

Para el *Aspergillus niger*, los conservantes AL, PC y AF presentaron mejor inhibición que la inhibición que se obtuvo para los otros mohos evaluados y los conservantes que indujeron a un mayor % I en moho *A. niger*, fueron el ácido láctico y el ácido fumárico (Figura 3A) con porcentajes de inhibición para el láctico entre el 59 y 70 % y el para el ácido fumárico entre 60 y 65 % (Figura 3A), Para el AC el % de I fue muy similar a las tres concentraciones evaluadas (50, 53, 53 % I). Igualmente, el % de I obtenido fue similar en las dos menores concentraciones de AF evaluadas (60, 61 % I), así como para las dos concentraciones de SP más altas empleadas (50 y 50 % I). Con relación al PC para este hongo presentó mejor % de I a las tres concentraciones usadas (34, 39 y 55) que, para los otros mohos evaluados. Igualmente, SP para *Aspergillus niger* presentó una inhibición media con relación a la inhibición obtenida de este conservante para *Penicillium* sp y *A. flavus* (Figura 3A).

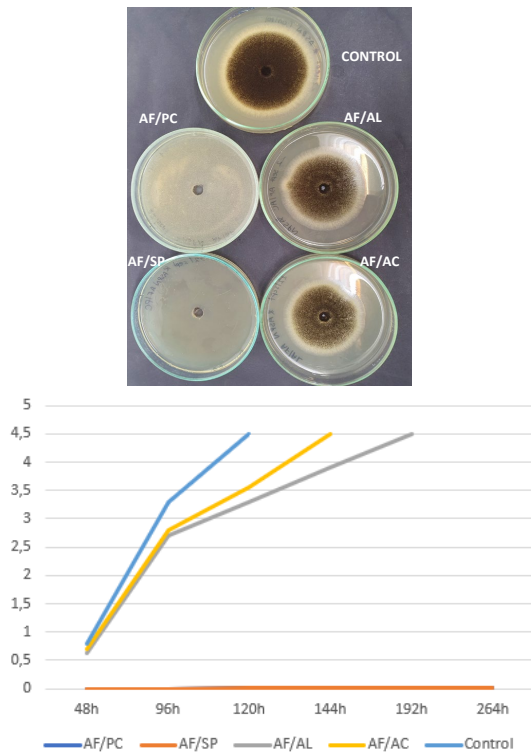
En general, las especies de mohos *A. flavus* y *A. niger* presentaron el mayor radio de crecimiento en

las cajas de agar frente a las diferentes concentraciones de conservantes evaluadas y el de menor radio de crecimiento fue *Penicillium* sp. (Figuras 2B, 3B y 1B). Llama la atención la poca formación de esporas sobre la colonia presentada con el PC, lo que se evidencia por el color blanquecino de la colonia, indicando la actividad de hifas vegetativas y la poca inhibición causada por el compuesto (Figura 1B). Se menciona que, en el ciclo de vida de *Penicillium* se considera que la fase logarítmica corresponde al extendimiento de las hifas y cuando llegan a fase estacionaria se da un equilibrio entre el incremento y decrecimiento de las hifas y luego estas se diferencian en conidióforos que producen los conidios. La extensión de hifas es un ejemplo extremo de crecimiento celular polarizado [14].

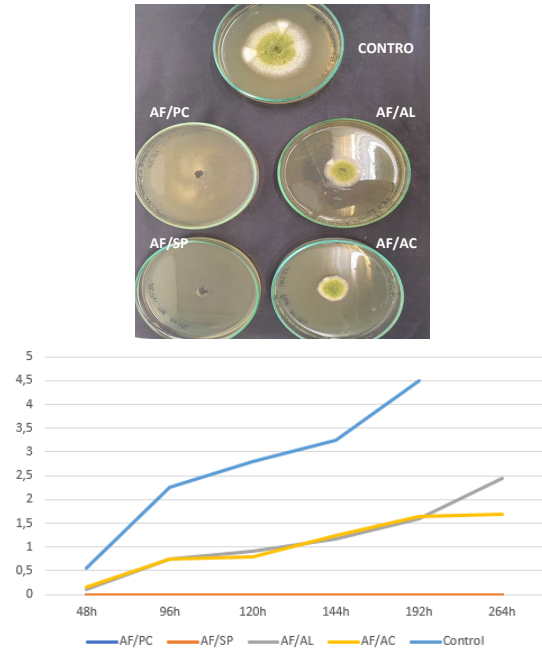
En el caso del *A. flavus*, las fotos muestran que el mejor efecto sobre el diámetro de la colonia fue presentado por el AC y el AF a las mayores concentraciones. Igualmente, para *A. niger* se observa claramente que todos los conservantes empleados en los ensayos, excepto el SP, presentaron inhibición sobre este moho. Con el SP, los mohos presentaron amplios radios de crecimiento, con relación a los radios de crecimientos obtenidos de este moho con los otros conservantes, lo que indica el menor efecto inhibitorio del SP sobre los *Aspergillus* (Figura 2B y 3B), caso contrario sucedió para el *Penicillium* sp. que a la concentración de 1000 ppm presentó la mejor inhibición alcanzada por los conservantes, observándose un diámetro muy pequeño en su crecimiento (Figura 1B).

**Etapa II.** Efecto sinérgico del ácido fumárico en premezcla con otros conservantes frente a diferentes microorganismos. Para este ensayo se evaluaron premezclas con diferentes concentraciones de los compuestos, estas fueron seleccionadas, teniendo en cuenta el efecto antimicrobiano presentado por las diferentes concentraciones empleadas de manera individual (Tabla 2). El efecto sinérgico del ácido fumárico en mezcla con otros conservantes se muestra en la Figura 4, 5 y 6. Se observa que, al evaluar las mezclas a las concentraciones propuestas, el 50 % de las preparaciones logran inhibir indistintamente el crecimiento de los tres mohos, mezclas que fueron preparadas con ácido fumárico

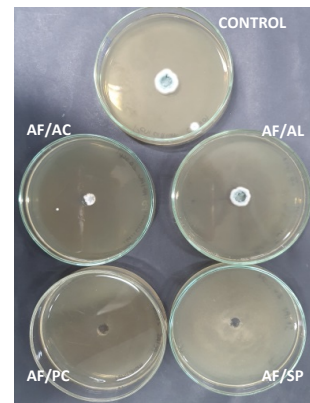
2500 ppm combinado por un lado con propionato de calcio 2000 ppm y por el otro con sorbato de potasio 300 ppm. Mientras que en el otro 50 %, mezclas de AF 2500 ppm con AC 1000 ppm y AL 1000 ppm, se observa un halo de crecimiento con menos diámetro que el control, lo que indica que logran frenar el crecimiento del hongo, pero no inhibir el crecimiento (Figura 4, 5 y 6).



**Figura 4.** Capacidad antimicrobiana de mezclas de conservantes sobre *Aspergillus niger*. Control: hongos inoculados en el medio sin conservante. AF: Acido fumárico, AC: Ácido cítrico, AL: Ácido láctico, PC: Propionato de calcio, SP: Sorbato de potasio. AF/AC (2500/2000 ppm). AF/AL (2500/2000 ppm). AF/PC (2500/2000 ppm) y AF/SP (2500/300 ppm).



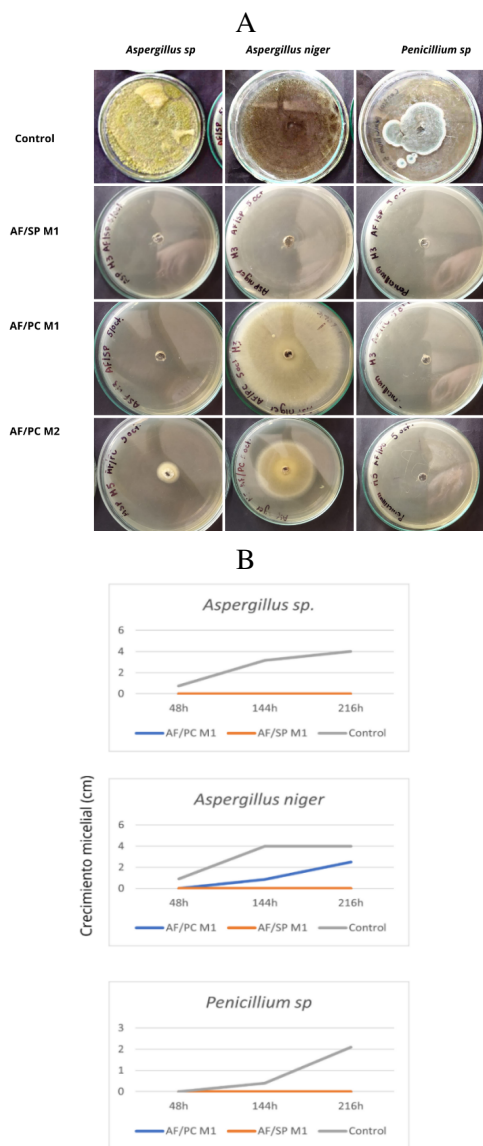
**Figura 5.** Capacidad antimicrobiana de mezclas de conservantes sobre *Aspergillus Flavus*. Control: hongos inoculados en el medio sin conservante. AF: Acido fumárico, AC: Ácido cítrico, AL: Ácido láctico, PC: Propionato de calcio, SP: Sorbato de potasio. AF/AC (2500/2000 ppm). AF/AL (2500/2000 ppm). AF/PC (2500/2000 ppm) y AF/SP (2500/300 ppm).



**Figura 6.** Capacidad antimicrobiana de mezclas de conservantes sobre *Penicilium sp.* Control: hongos inoculados en el medio sin conservante. AF: Acido fumárico, AC: Ácido cítrico, AL: Ácido láctico, PC: Propionato de calcio, SP: Sorbato de potasio. AF/AC (2500/2000 ppm). AF/AL (2500/2000 ppm). AF/PC (2500/2000 ppm) y AF/SP (2500/300 ppm).

Por su parte, la mezcla ácido fumárico/propionato de calcio 2000/2000 ppm pierde efectividad sobre el *Aspergillus niger*, el cual presenta crecimiento del radio a las 144 horas evaluadas (Figura 7A), pero no se observa el desarrollo de micelios aéreos en la colonia

comparado con el control. Mientras que la mezcla de ácido fumárico/sorbato de potasio 2000/300 ppm, presenta inhibición sobre los mohos evaluados hasta las 216 h evaluados (Figura 7B). En el caso del *Penicillium* sp, ambas mezclas tuvieron efecto en la inhibición de este moho (Figura 7A).



**Figura 7.** Capacidad antimicrobiana de mezclas de conservantes sobre especies de hongos presentes en alimentos. Control hongos inoculados en el medio sin conservante. M1 Ácido fumárico/propionato de calcio 2000/2000 ppm. M1 Ácido fumárico/sorbato de potasio 2000/300 ppm. A. fotografías a las 216 h. B gráficos de los datos en los diferentes tiempos evaluados.

La mezcla de ácido fumárico 2000 ppm con propionato de calcio 2000 no presentó efecto inhibitorio sobre las dos especies de *Aspergillus* evaluadas, pero

si mejoró el efecto del PC sobre el *Penicillium* sp. al cual le fue inhibido su crecimiento en las 296 h evaluadas. Por el contrario, la mezcla de Ácido fumárico/Sorbato de potasio a 2000 ppm y 300 ppm inhibió completamente el crecimiento del moho. Por lo anterior, para la siguiente fase se decide utilizar la mezcla Ácido fumárico/Sorbato de potasio a 2000 ppm y 300 ppm que corresponde al prototipo seleccionado.

**Etapa III.** Eficiencia del prototipo de conservante en una matriz alimentaria. Los resultados de los recuentos de mohos y levaduras para los tratamientos con conservantes adicionados a los muffins, en los diferentes tiempos de almacenamiento se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 6.

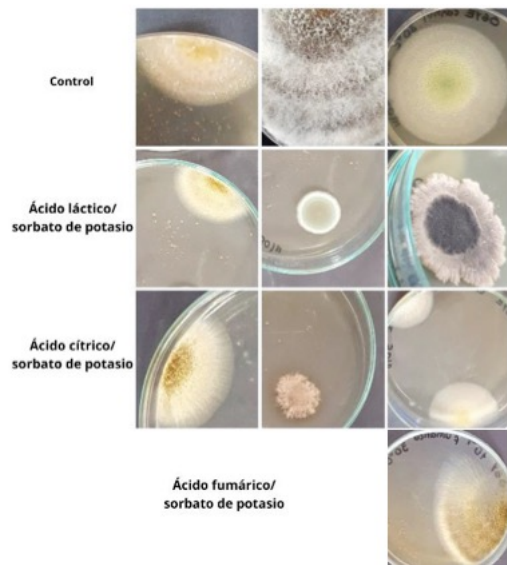
En los recuentos de mohos y levaduras realizados en el tiempo día 8 de almacenamiento se logra observar en el control, el crecimiento de colonias de mohos en un número muy bajo, microorganismos que persisten en el tiempo, pero a los 17 días mantiene controlado su crecimiento. Con la mezcla de AF 2000 ppm / SP 300 ppm, se logró retrasar un poco el conteo de microorganismos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Recuentos de los recuentos de mohos y levaduras en los diferentes tiempos de almacenamiento.

Días de almacenamiento	UFC mohos y levaduras			
	AF 2000 ppm / SP 300 ppm	AC 2000 ppm / SP 300 ppm	AL 2000 ppm / SP 300 ppm	Control
0	< 10	< 10	< 10	< 10
4	< 10	< 10	< 10	< 10
8	< 10	15	20	10
17	10	10	20	15

Además, en los diferentes tratamientos se logró observar entre 3 y 4 tipos de morfologías diferentes de mohos aislados de los muffins, mientras que, con ácido fumárico, únicamente se observan 1 morfología aisladas en los muffins sembrados en el día 17. A diferencia de los tratamientos con ácido cítrico, ácido láctico con sorbato de potasio, lo que podría indicar que el ácido fumárico es eficaz para controlar el crecimiento de algunas especies de mohos (Figura 8).





**Figura 8.** Morfologías de los mohos aislados de los muffins tratados con diferentes conservantes.

#### 4 Discusión

Los conservantes alimentarios son importantes para reducir el deterioro de los alimentos causado por microorganismos, evitando pérdida de su calidad y valor nutritivo. Así mismo, los microorganismos han desarrollado resistencia a muchos conservantes existentes y estos están siendo poco efectivos para el control. Este trabajo evaluó varios conservantes aprobados por el codex alimentario y el efecto de varios de los ácidos orgánicos más empleados en panificación y otras aplicaciones similares donde el uso de conservantes es frecuente, así como, mezclas de estos con el ácido fumárico, sobre algunas especies de mohos que con frecuencia contaminan alimentos. Se logró mostrar que la efectividad de los conservantes difiere sobre la especie de microorganismos, en este caso de los mohos contra los que se realizó la evaluación. Estudios han demostrado, que la actividad no solo difiere de los tipos de mohos [13], sino también de otras condiciones como son la temperatura [15], la actividad de agua y el pH [16].

De los conservantes evaluados el que mejor actividad inhibitoria presentó fue sorbato de potasio, aunque en ninguna de las concentraciones evaluadas se presentó el 100% de inhibición. Este porcentaje de inhibición fue mucho más bajo sobre *A. niger*, coincidiendo con lo encontrado por M. Stratford [16] y colaboradores en 2009 donde mencionan que *A.*

*niger* es capaz de descarboxilar el sorbato de potasio disociado en 1-3 pentanodieno, compuesto volátil al cual este moho exhibe resistencia y es posible que por esta razón no se vea completamente inhibido su crecimiento. Aun así, el sorbato de potasio, se ha reportado como uno de los conservantes de mayor uso en alimentos debido a sus deseables propiedades fisiológicas, su sabor neutro y su eficacia contra muchos de los microorganismos, incluso a un valor de pH de 6,5 (Sofos y Busta, 1981; Thakur et al., 1994) citado por [17].

Por otra parte, los ácidos orgánicos fumárico, láctico y cítrico fueron más efectivos para inhibir las especies de *Aspergillus*, probablemente debido a que estos ácidos orgánicos disminuyen el crecimiento fúngico basado en su carácter débil, es decir, poseen un pKa más alto por lo que en su forma neutra o protonada del ácido (no disociada) difunden pasivamente en el citoplasma a través de la membrana. Una vez dentro del citoplasma, el pH neutro hace que el ácido se disocie, lo que conduce a la acidificación del citosol y la acumulación de especies aniónicas [18]; provocando cambios homeostáticos en el interior que conllevan a la inhibición y muerte de los mohos [19]. Esto va en vía contraria a lo reportado por [20], quien menciona que existen diferencias metabólicas entre los dos géneros de mohos, donde *A. niger* produce una amplia gama de productos metabólicos, entre ellos ácidos, lo que probablemente lo hace capaz de resistir en mayor medida las condiciones de estrés generadas por los ácidos orgánicos.

Además, durante la experimentación, se observó que el propionato de calcio proporciona un mayor crecimiento a los mohos, en especial a la especie *Aspergillus*, lo que concuerda con lo encontrado en [21], donde el propionato de calcio a la mayor concentración (3000 ppm) tampoco fue eficiente para inhibir especies de mohos entre los que se encuentran *Eurotium rubrum*, *Aspergillus Niger* y *Penicillium roqueforti* [22]. Otro estudio menciona que solo el 7% del conservante se mantiene en su forma no disociada a pH de 6 o mayores frente al 71% a un pH de 4,5 y que, además, al usar este conservante a niveles subinhibitorios puede estimular la producción de metabolitos tóxicos como el ácido micofenólico generado por una cepa de *Penicillium roqueforti* [23],

más aún, concentraciones de propionato de calcio del 0,1 % y 0,3 % no afectan su crecimiento en la industria panadera [24]. Sin embargo, dichos resultados dependen de las especies, el medio, las condiciones y concentración del conservante [21]. Por lo que se corrobora que el propionato de calcio por sí solo no es adecuado para garantizar la seguridad de los productos de panadería.

Por otra parte, cuando se emplearon combinaciones del ácido fumárico se observó que los conservantes potencializaron su efecto, siendo más evidente en la mezcla con sorbato de potasio. Este mayor efecto inhibitorio previamente sea debido a que el ácido fumárico tiene un pKa de 3,05, muy bajo comparado con el pKa del sorbato de potasio 4,76 y el del propionato de calcio pKa 4,87 lo que lleva a presentar una ventaja al usar compuestos orgánicos con diferentes pKa, que aseguren su disociación a diferentes pH's, contribuyendo a un efecto sinérgico [25] como se observó en estos resultados, donde la mezcla con sorbato de potasio no presentó crecimiento para ninguna de los mohos después de las 216 h en que se hizo la evaluación.

Para finalizar, al evaluar el prototipo seleccionado de ácido fumárico/sorbato de potasio sobre los muffins durante 17 días de almacenamiento, no se logró apreciar el efecto inhibitorio de la mezcla con los otros controles, pero se logró apreciar una menor diversidad de los mohos aislados, esto probablemente por el poco tiempo de almacenamiento durante el cual se dejaron los muffins. Estudios hechos en cakes se observa que es mejor realizar inoculaciones previas a los productos para evaluar la efectividad de las condiciones propuestas [18].

## 5 Conclusiones

En este trabajo se logró verificar el efecto antimicrobiano del ácido fumárico frente a mohos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) y mayormente encontrados en productos de panadería. Además, fue posible reconocer al ácido fumárico/sorbato de potasio como una mezcla eficaz para el control de diferentes especies de mohos, mostrando mejores resultados que los conservantes usualmente utilizados como el sorbato de potasio, propionato

de calcio, ácido cítrico, ácido láctico, ácido sórbico sin sobrepasar las cantidades permitidas por las autoridades.

## Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado gracias a la cooperación del Laboratorio de microbiológico del Tecnoparque SENA sede Medellín.

## Referencias

- [1] D. Gauna, S. Oviedo, S. Kanadani Campos, M. A. Gómez Peña, A. Vial & J. Szostak. "Síntesis del estudio prospectivo: el Cono Sur ante una instancia crucial del desarrollo tecnológico global: megatendencias, incertidumbres críticas e preguntas claves para el futuro de los sistemas agropecuarios y agroalimentarios". Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur (PROCISUR). Inst Int de Cooperación para la Agric (IICA). 2020. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/13245>.
- [2] L. D. Martínez Angulo. "Principales bacterias transmitidas por alimentos, preservación y control". *Agrobiol*, vol. 56, no. 1, 2021. 10.4322/mp.2020.001.04
- [3] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FAO. El estado mundial de la agricultura y alimentación: Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. FAO, 2019. <https://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf>
- [4] Codex Alimentarius. *Norma general para los aditivos alimentarios Codex Stan 192-1995*. Última revisión 2019. [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B192-1995%252FCXS\\_192s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B192-1995%252FCXS_192s.pdf).
- [5] J.J. Villada Moreno & L. I. Fuentes Lara. "Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria". Universidad Autónoma Agraria Antonio narro. Buenavista, Saltillo

- Coahuila, México, Diciembre de 2010. <https://docplayer.es/129684314-Universidad-autonoma-agraria-antonio-narro-conservadores-quimicos-utilizados-en-la-industria-alimentaria.html>
- [6] K. Seetaramiah, A. Anton-Smith, R. Murali, R. Manavalan, R. “Preservatives in Food Products”. *I. J. of Pharm & Biolog. Archives (IJPBA)* vol. 2, no. 2, pp. 538-539, marzo, 2011. [https://www.researchgate.net/profile/Anton-Smith-Arul-Gnana-Dhas/publication/272495111\\_Preservatives\\_in\\_Food\\_Products\\_-\\_Review/links/55a7584d08ae51639c577567/Preservatives-in-Food-Products-Review.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Anton-Smith-Arul-Gnana-Dhas/publication/272495111_Preservatives_in_Food_Products_-_Review/links/55a7584d08ae51639c577567/Preservatives-in-Food-Products-Review.pdf)
- [7] K. Papoutsisa, M. M. Mathioudakis, J. H. Hasperuéd, V. Ziogas. “Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of T citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold)”. *Trends in Food Sci. & Technol.* vol. 86, no. 1, pp. 479-491, 2019. 10.1016/j.tifs.2019.02.053
- [8] Industria de la panadería 4.0: “el pan hecho a máquina puede ser artesanal”. Publicado el 2021/10/28, (Online). <https://www.hmfood.com/es/news/baking-industry-4-0/>. <https://es.mintel.com/tendencias-globales-de-consumidores>.
- [9] R. M. G. García, “Agentes bactericidas/bacteriostáticos a partir de sorbato de potasio, carvacrol y timol”. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla. 2005. (Internet). Disponible en [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/mca/garcia\\_g\\_rm/](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/garcia_g_rm/)
- [10] J. D. Ochoa, M. Cardona y E. Sandoval. “Efecto del ácido fumárico en las características de calidad de muffins”. *Rev. Lasallista Investig*, vol. 14, no. 2, pp. 9-19, 2017. (Online). Disponible en <https://doi.org/10.22507/rli.v14n2a1>.
- [11] Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Icontec. Norma Técnica Colombiana 5698-1 del 2009.
- [12] I. Reyes-Ocampo; M. González-Brambila; F. López-Isunza. “Un análisis del metabolismo de *aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido”. *Rev. Mex. de Ingeniería Química*, vol. 12, no. 1, pp. 41-56, 2013. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62028007005.pdf>.
- [13] J. G. Macias Camacho. “Modelo macro cinético de la producción de conidios en fermentación sumergida por lotes a partir de *Penicillium pinophilum*”. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, 2017.
- [14] M. C Belz, R. Mairinger, E., Zannini, L. A., Ryan, K. D., Cashman, & E. K. Arendt. “The effect of sourdough and calcium propionate on the microbial shelf-life of salt reduced bread”. *Applied Microbiol and Biotechnol*, vol. 96, no. 2, pp. 593-501, October, 2012. 10.1007/s00253-012-4052-x.
- [15] C. Montesinos-Herrero, M. Ángel del Río, C. Pastor, O. Brunetti, L. Palou. “Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *penicillium* decay on major citrus species and cultivars, Postharvest”. *Biolog and Technol.*, vol. 52, no. 1, pp. 117-125, April, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.012>.
- [16] M., Stratford, A., Plumridge, G., Nebon-Caron, & D. B. Archer, “Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory”. *Intern J of Food Microb*, vol. 136, no. 1, 37-43, 2009. 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.025 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.025
- [17] L.P. Morassi, M. Silva, M. Furtado, L. Freire, L P. Santos, R. D. Chaves, G. D. Peña, E. L. Wilmer., S. Anderson. “Growth/no-growth

- modeling to control the spoilage of chocolate cake by *Penicillium citrinum* LMQA\_053: Impact of pH, water activity, temperature, and different concentrations of calcium propionate and potassium sorbate”, *Food Control*, vol. 139, no. 1, pp 151- 157, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109064>
- [18] S., Siedler, M. H., Rau, S., Bidstrup, J.M. Vento, S.D. Aunbjerg, E. F., Bosma, L. M. Mcnair, C. L., Beisel & A. R., Neves “Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of lactobacilli against fungal spoilage in fermented milk products”. *Applied and Envir. Microb.* vol. 86, no. 7, pp. 02312-19, 2020. [https://doi.org/10.1128/AEM.02312-19/SU\\_PPL\\_FILE/AEM.02312-19-S0001.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.02312-19/SU_PPL_FILE/AEM.02312-19-S0001.PDF)
- [19] L. Salas, J., Mounier, F., Valence, M., Coton, A., Thierry, & E. Coton. “Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation” A Review. *Microorg.* vol. 5, no. 3, pp. 1-37, 2017. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5030037>
- [20] P. Loke Show, K. Opeyemi Oladele, Q. Yan Siew, F. Abdul Aziz Zakry, J. Chi-Wei Lan, J., & T. Chuan Ling. “Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*”. *Frontiers in Life Sci.* vol. 8, no. 3, pp. 271-283, 2015. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>
- [21] P. Lavermicocca, F. Valerio, A. Evidente, S., Lazzaroni, A., Corsetti, & M., Gobetti, M. “Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B”. *Applied and Envir. Microbiol.* vol. 66, no. 9, pp. 4084-4090, 2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>.
- [22] K. I. Suhr, & P. V. Nielsen. “Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values *Int. J of food microb.* vol. 95, no. 1, pp, 67-78, 2004. [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004).
- [23] L. A. M. Ryan, F. Dal Bello & E. K. Arendt. “The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread”. *In J. of Food Microbiol.*, vol. 125, no. 3, pp- 274-278, 2008. [10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.013](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.013).
- [24] [25] R. C. Baptista, C. N., Horita, & A. S. Sant’Ana, “Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review”. *Food research international*, vol. 127, no. 1, pp. 1-23, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108762>.