



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

PROCESOS TECNOLÓGICOS

SOBRE EL AZAFRÁN

Autor: María Soledad Palmero Augusto

D.N.I.: 47468999N

Tutor: Dr. Rafael Lozano

Convocatoria: 23-Junio- 2016

Resumen.

El azafrán es una especia obtenida mediante el secado de los estigmas de la flor de *Crocus sativus* L. Es muy valorada en el ámbito culinario por sus propiedades colorantes y aromáticas. Dentro de su composición cabe destacar tres componentes bioactivos mayoritarios, que son el safranal, las crocinas y la picrocrocina. Estos tres metabolitos son los principales responsables de las propiedades sensoriales y terapéuticas atribuidas al azafrán. Dado el actual problema que supone la irradiación como método de higienización de las hebras de azafrán, el presente estudio tiene como **objetivo** estudiar las condiciones óptimas de esterilización para eliminar la microbiota del azafrán sin influir significativamente en los compuestos responsables de la calidad sensorial y las propiedades terapéuticas de esta especia.

Para llevar a cabo este estudio se analizaron dos lotes distintos de azafrán (P43 y P45). Las muestras de ambos lotes fueron sometidas a distintos tratamientos de autoclavado, codificados con letras de la A a la E. Tras la realización de los tratamientos de autoclavado, se llevó a cabo un análisis microbiológico, siguiendo la normativa ISO 3632 (análisis colorimétrico), y análisis cromatográficos para evaluar la afectación de estos tratamientos en los compuestos bioactivos.

Los resultados indicaron que en todos los tratamientos de estudio se consiguió eliminar la microbiota del azafrán, teniendo especialmente en cuenta la temperatura y el tiempo ya que es crítico en cuanto a la concentración de crocinas y safranal, produciéndose una disminución mayor de crocinas cuanto mayores son los tiempos y/o temperaturas, y un aumento significativo del safranal en algunos de los tratamientos estudiados. Los niveles de picrocrocina apenas sufren variación en ninguno de los procesos evaluados.

Introducción y antecedentes.

El azafrán (*Crocus sativus* L.) es una especia que se obtiene mediante el secado de los estigmas de la flor de *Crocus sativus* L. Es muy valorado en el ámbito culinario por sus propiedades sensoriales, principalmente colorantes, saborizantes y aromáticas. Además, es conocido por sus múltiples aplicaciones terapéuticas en medicina tradicional, entre las que destacan sus potenciales propiedades antitumorales, antiinflamatorias y pro-memoria¹.

La calidad del azafrán viene determinada por distintos factores, principalmente agronómicos y tecnológicos, que pueden influir notoriamente en las principales moléculas responsables de la calidad organoléptica y las propiedades bioactivas del azafrán, destacando:

- **Safranal:** Es un aldehído terpénico cíclico (2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien-1-carboxaldehído - $C_{10}H_{14}O$; Fig. 1) que representa el 70% de los compuestos volátiles del azafrán y, por lo tanto, es el principal responsable del aroma. Su nombre proviene de Kuhn y Winterstein, que fueron los primeros investigadores en obtenerlo por hidrólisis de la picrocrocina^{2,3}.
- **Crocinas:** Pertenecen a un grupo de carotenoides inusuales por su solubilidad en agua, y son los principales responsables del color rojizo del azafrán. Son ésteres mono y diglicosilados de la crocetina ($C_{44}H_{64}O_{24}$), donde D-glucosa y D-gentobiosa se encuentran como residuos carbohidratos (Fig. 2). Entre los distintos isómeros de crocina que se pueden encontrar en los estigmas de azafrán, el isómero *trans*-crocina-4 es el componente mayoritario⁴.
- **Picrocrocina:** Se trata de un aldehído monoterpénico de la crocina ($C_{16}H_{26}O_7$; Fig. 3). Su formación está relacionada con la degradación de la zeaxantina⁵ y es el compuesto responsable del sabor amargo del azafrán. Su descomposición da lugar a otros compuestos responsables del aroma del azafrán. La picrocrocina fue cristalizada y separada por primera vez por Winterstein y Teleczky en 1922⁶.

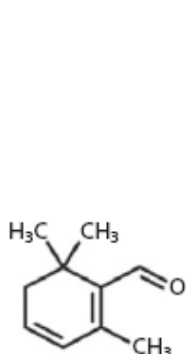


Figura 1. Safranal.

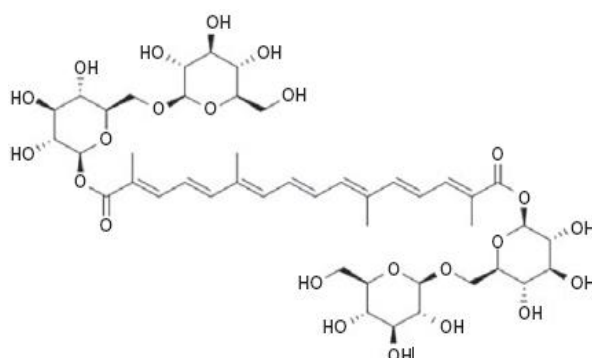


Figura 2. Crocina.

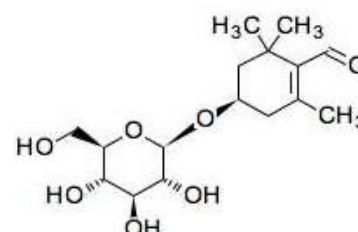


Figura 3. Picrocrocina.

Los compuestos aromáticos, entre los que destaca el safranal, derivan de procesos enzimáticos o de la degradación oxidativa de la picrocrocina⁶. La eliminación del resto azúcar se lleva a cabo durante el procesamiento (secado, almacenamiento) del azafrán^{7,8,9,10,11,12,13} o incluso durante el desarrollo de la flor¹⁴.

Los estudios muestran que temperaturas altas en tratamientos de secado pueden aumentar las cantidades de safranal en la muestra, bien por la conversión de la picrocrocina o por concentración del propio safranal¹. La pérdida de crocinas que ocurre cuando se usan estas temperaturas más altas sería el resultado de una degradación térmica no enzimática, y cuando el tratamiento térmico se realiza durante tiempos cortos la pérdida de crocinas es mínima.

Durante la etapa de secado parte de la picrocrocina puede experimentar una transformación en safranal (Figura 4). Esta transformación puede darse de dos maneras diferentes:

- Por deshidratación directa a temperaturas elevadas o pH extremos: A elevadas temperaturas también se ven afectadas las crocinas que pierden sus azúcares (gentobiosa) dando lugar a crocetina⁶.
- Mediante hidrólisis enzimática donde la β -glucosidasa da lugar a la formación del intermediario 4R-hidroxi- β -ciclocitral (HCC), y una posterior deshidratación que producirá safranal.

Himeno y Sano (1987) estudiaron el contenido de picrocrocina en los estigmas de azafrán intactos durante el desarrollo de la flor y observaron un incremento gradual de este compuesto antes de la floración. Coincidiendo con la aparición de compuestos volátiles, se produce una disminución apreciable del nivel de picrocrocina¹⁴.

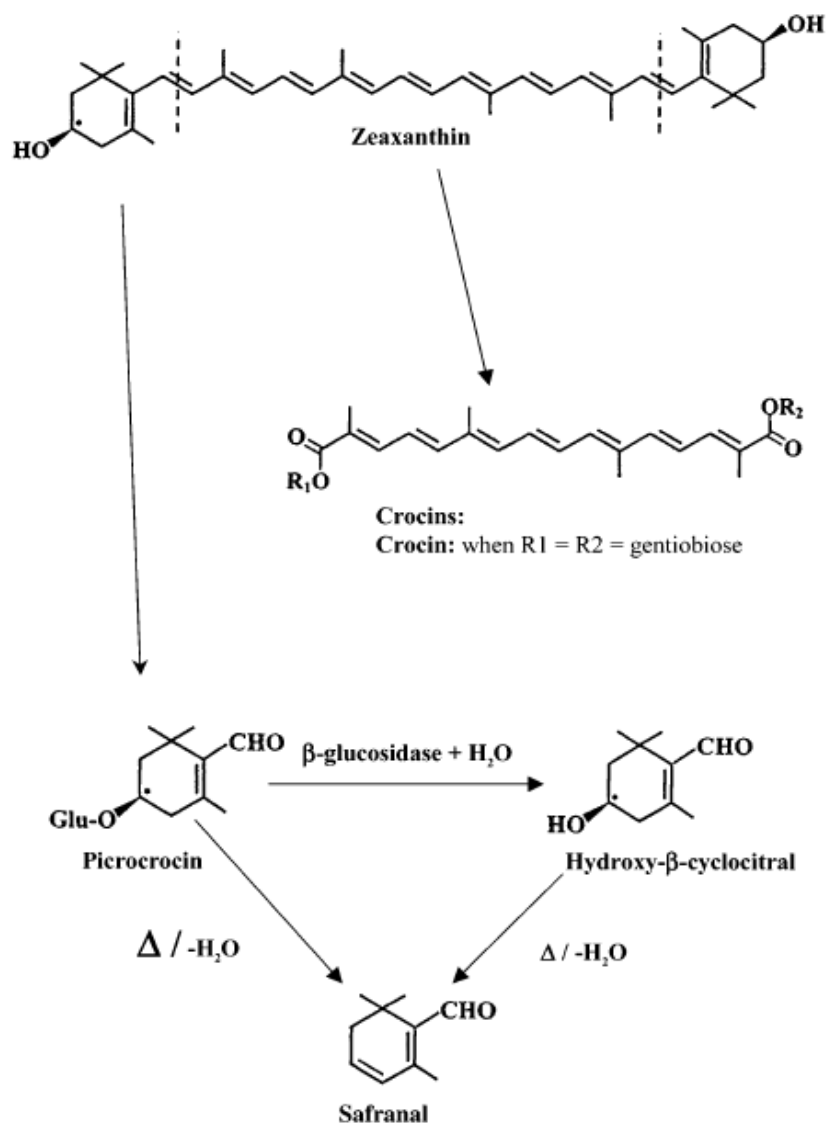


Figura 4. Esquema de la biodegradación de zeaxantina para producir los principales metabolitos responsables del color (crocinas), sabor (picrocrocina) y aroma (safranal) del azafrán.

Los principales criterios para determinar la calidad del azafrán son de tipo organoléptico, físico-químico y botánico, junto con la higiene microbiológica. La Organización Internacional de Normalización (ISO) publicó una norma de calidad específica ISO 3632 para azafrán en 1975, revisada en 1980 que, técnicamente, se mejoró en 1993^{6,15}.

De acuerdo con las especificaciones ISO 3632, los valores de absorción espectrofotométrica a longitudes de onda 330 nm y 257 nm son relacionados con la presencia de safranal y picrocrocina, respectivamente, y se utilizan como índices de

aroma y amargor, mientras que la absorción a 440 nm se relaciona con crocinas y se utiliza como índice de coloración¹⁶.

Este método ha generado bastante controversia en bibliografía científica en cuanto a si es un método adecuado o no para determinar concentraciones objetivas de estas moléculas a la hora de evaluar bioactividades⁵. Es por este motivo que se han desarrollado otros métodos para analizar la presencia de compuestos bioactivos en esta especia, principalmente métodos cromatográficos.

Con respecto a la calidad microbiológica, el azafrán al igual que cualquier especia suele estar contaminada por mohos, levaduras, bacterias, así como células vegetativas o esporas que provengan de plantas, suelo o incluso heces de aves, roedores, insectos, etc., aumentando la carga microbiana hasta 10^3 - 10^8 ufc por gramo. La contaminación puede ocurrir durante la recolección, manipulación, transporte o almacenamiento, y para su descontaminación se emplean varios métodos, entre los que destacan el tratamiento químico con óxido de etileno, uso de fumigantes como el óxido de propileno y el bromuro de metilo, esterilización con vapor de agua caliente e irradiación, siendo este método el más empleado y legalizado en la actualidad¹⁷. Este método de higienización por irradiación presenta varias desventajas debido a la formación de iones y radicales libres que pueden ser perjudiciales para la calidad de la especia¹⁷ y, por lo tanto, es necesario resolver este problema con alternativas tecnológicas. Una de las alternativas más eficientes a la hora de eliminar estos microorganismos es el tratamiento por calor para alcanzar temperaturas de esterilización que acaben con la microbiota autóctona del azafrán.

A la hora de llevar a cabo el tratamiento de esterilización hay que tener en cuenta el tiempo equivalente (F_0), que permite juzgar la efectividad del proceso de esterilización¹⁸ (Figura 5). Matemáticamente, podemos definir al tiempo equivalente (F) como la integral de la letalidad (L) con respecto al tiempo (t), lo cual significa que en un gráfico de temperatura vs. tiempo, el valor F puede calcularse como el área bajo la curva:

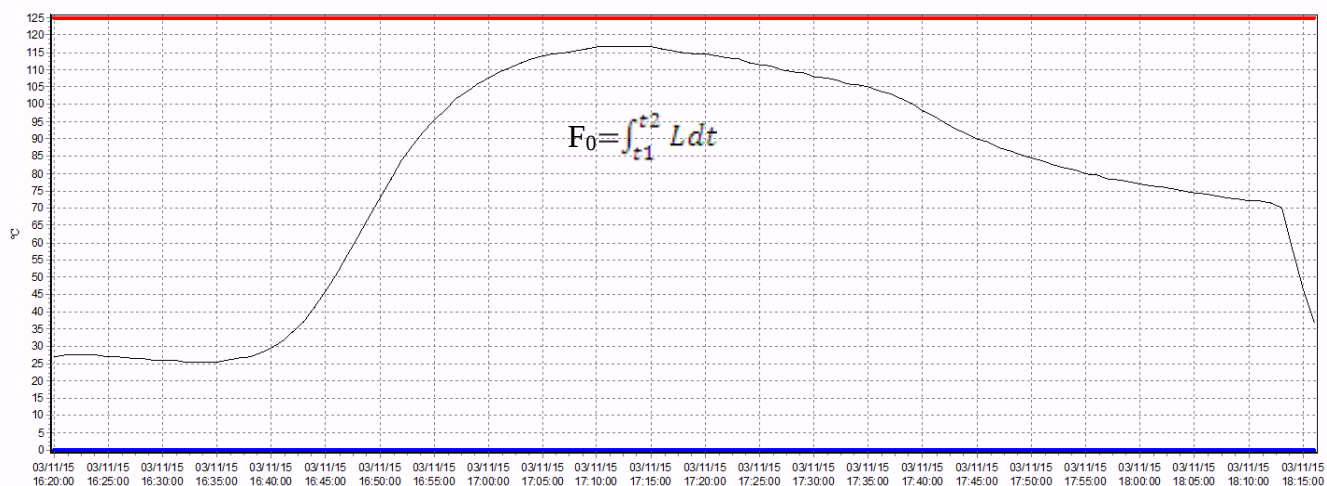


Figura 5. Gráfico de temperatura vs. tiempo.

La determinación del perfil de temperatura y el cálculo de los valores de F_0 acumulado permite conocer y evaluar la efectividad del proceso de esterilización, así como la letalidad que se obtiene¹⁸.

Objetivos.

Dado el actual problema que existe con los métodos de irradiación tanto en la calidad como en la seguridad del azafrán, el principal objetivo de este trabajo de investigación fue determinar las condiciones óptimas de esterilización de esta especie que consiguiesen eliminar por completo la microbiota del azafrán sin afectar de forma significativa a la concentración de las moléculas bioactivas responsables de sus propiedades organolépticas y terapéuticas.

Materiales y métodos.

Muestras

Dos lotes de muestras de estigmas de azafrán ya deshidratados y con una humedad inferior al 10% (P43 y P45), suministrados por Pharmactive Biotech Products SL, fueron sometidos a diferentes ensayos de tratamiento térmico a distintos tiempos (Tabla 1). Se estudiaron cinco condiciones de ensayo sobre las hebras de azafrán, que se codificaron con letras de la A a la E.

Para llevar a cabo el tratamiento térmico a distintos tiempos se cogieron aproximadamente 5 gramos de cada muestra y se introdujeron en botellas de borosilicato totalmente cerradas junto a un termobotón para controlar el proceso de esterilización a las distintas temperaturas y tiempos de tratamiento.

Tabla 1. Esquema de temperaturas y tiempos de tratamiento térmico.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
A	X	1
C		2
B		3
D	Y	
E	Z	

Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos en los dos lotes de azafrán se llevaron a cabo al inicio y tras la aplicación de los diferentes tratamientos de estudio. Se analizaron enterobacterias totales según la normativa ISO 7402 y *Escherichia coli* según la normativa ISO 7251¹⁹, aerobios totales siguiendo la normativa recogida en AFNOR 1999 y, por último, mohos y levaduras según AFNOR 1995 (Figuras 6 y 7 respectivamente).

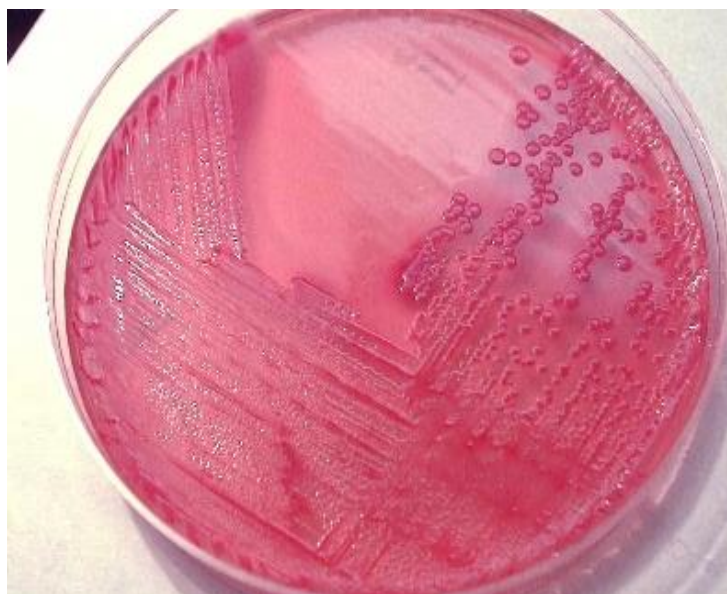


Figura 6. Agar MacConkey para recuento de enterobacterias totales y *E. coli*.

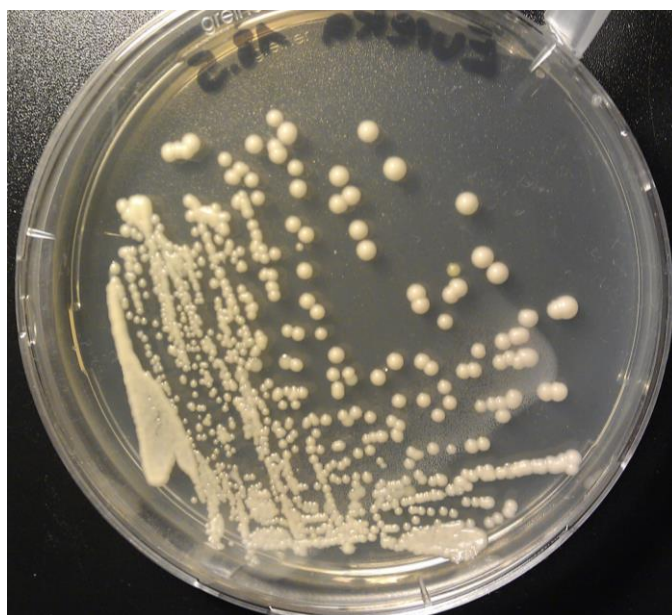


Figura 7. Placa de agar para recuento de mohos y levaduras.

Análisis colorimétrico

Los dos lotes de azafrán sometidos a las distintas pruebas tiempo-temperatura de esterilización fueron analizados siguiendo el método ISO 3632 utilizando un espectrofotómetro Beckman Coulter Serie DU® 730 Life Science UV / Vis espectrofotómetro de barrido (CA, EE.UU).

La concentración de picrocrocina, safranal y crocinas se llevó a cabo a 257, 330 y 440 nm respectivamente (Figura 8.), teniendo en cuenta las correspondientes absorptividades específicas²⁰.

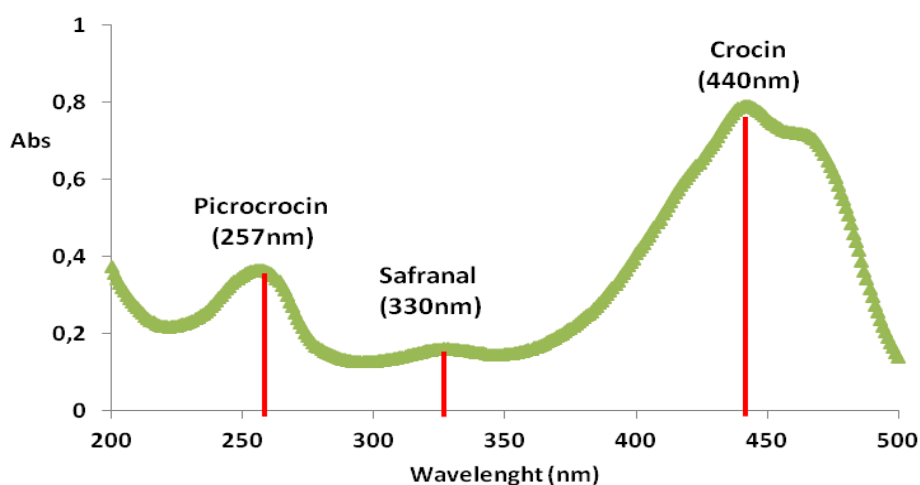
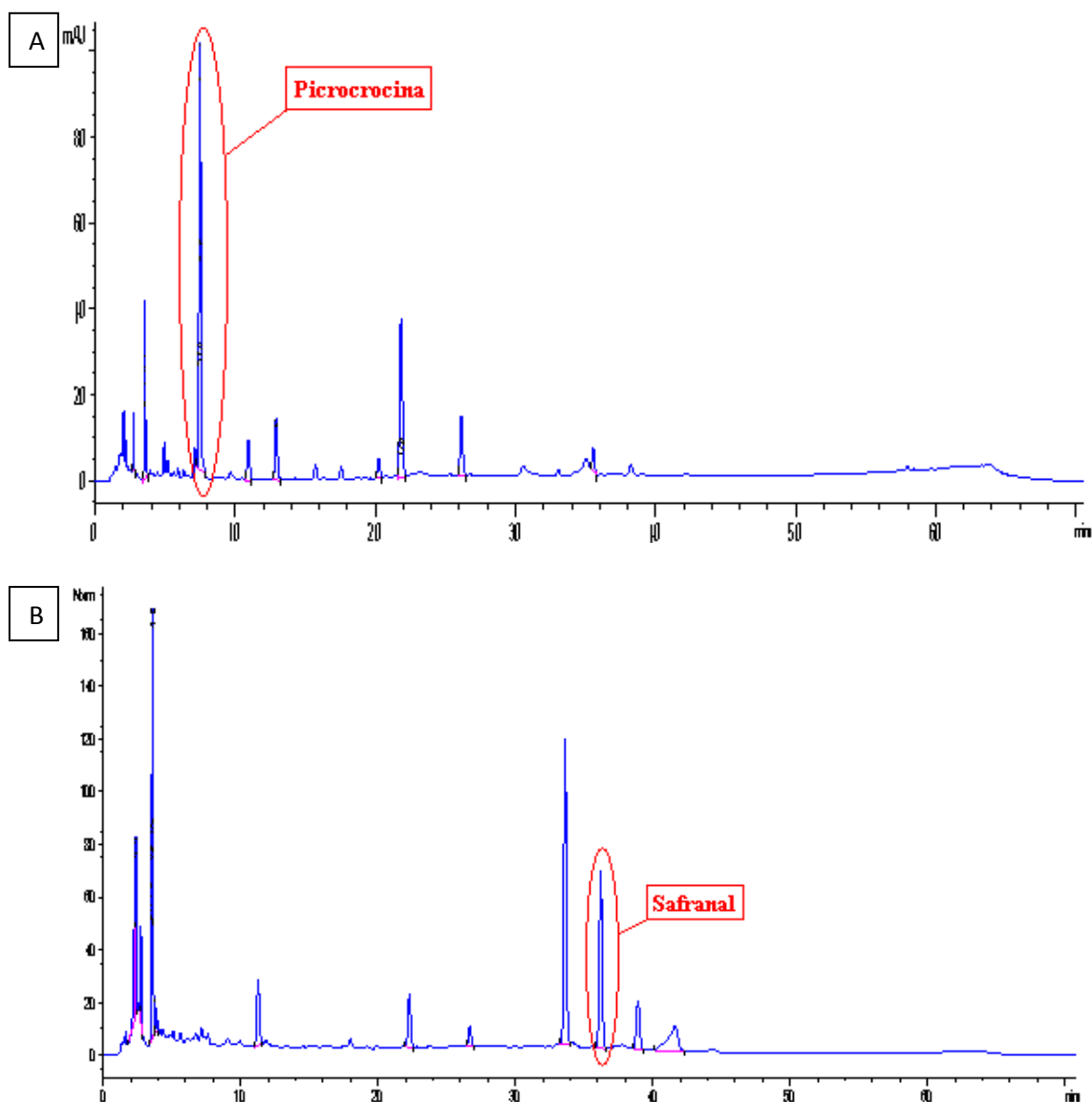


Figura 8. Espectro UV-Vis del análisis ISO 3632 de estigmas de Azafrán.

Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de las muestras de azafrán se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), mediante el equipo Agilent Technologies 1220 (CA, EE.UU), siguiendo el método propuesto por Caballero-Ortega et al., (2007). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18-PFP Ultra-Inert HPLC (ACE, Escocia 250x4.6mmx5µm). La fase móvil fue una mezcla de agua / metanol (50:50 v / v) (disolvente A) y metanol (disolvente B). El protocolo de elución fue el siguiente: min 0, 90% (A), 10% (B); min 60, 0% (A), 100% (B); min 70, 90% (A), 10% (B). Los compuestos bioactivos picrocrocina, safranal y crocinas se cuantificaron mediante rectas de calibrado externas de p-nitroanilina (250 nm; Figura 9A), safranal (330 nm; Figura 9B) y trans-crocina-4 (440 nm; Figura 9C) respectivamente.



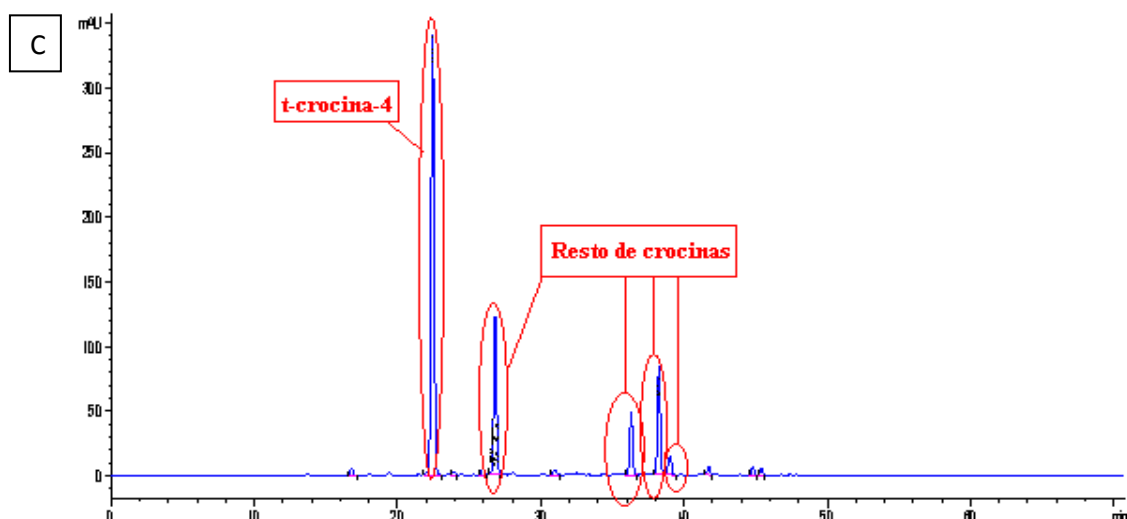


Figura 9. Cromatogramas obtenidos tras el análisis por HPLC de muestras de azafrán.
A) Determinación de picrocrocina (250 nm), B) Determinación de safranal (330 nm) y
C) Determinación de trans-crocina-4 (440 nm).

Análisis estadístico

La evaluación estadística de los resultados se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con la ayuda del programa estadístico SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Se consideraron diferencias significativas para el caso $p < 0,05$.

Resultados y discusión.

El parámetro F_0 junto a los perfiles de temperatura permiten conocer y evaluar la efectividad del proceso de esterilización, así como la letalidad que se obtiene¹⁸. Como puede verse en la tabla 2 con los distintos tratamientos se alcanzan diferentes temperaturas y varían los valores de F_0 obtenidos, siendo este dato mayor en el caso del tratamiento E.

Los resultados del control microbiológico recogidos en la Tabla 3 evidencian que no hay rastro de microorganismos en las muestras por lo que el proceso de esterilización ha sido efectivo para ambos lotes y en los cinco tratamientos.

Tabla 2. Resultados de temperaturas mínima, máxima y F_0 registradas por el termobotón en las distintas pruebas de tratamiento térmico.

Parámetros Autoclavado	Tratamientos				
	A	B	C	D	E
F_0	1,3±0,1	7,3±1,2	19,9±0,8	1,6±0,1	31,9±1,2
Temp. Mínima	20,8±0,4	25,0±0,7	23,5±0,7	24,3±1,8	24,5±0,7
Temp. Máxima	108,8±0,4	116,8±0,4	119,5±0,0	109,8±0,4	123,0±1,7

Tabla 3. Estudio microbiológico (ufc/g) de los dos lotes de azafrán al inicio (control) y después de los distintos tratamientos térmicos.

P43 (ufc/g)	Control	Tratamientos				
		A	B	C	D	E
Aerobios totales	<10 ⁴					
Mohos	<10 ²					
Levaduras	<10 ²		0			0
Enterobacterias	<10 ²					
<i>E coli</i>	Negativo		Negativo			Negativo
P45 (ufc/g)	Control	Tratamientos				
		A	B	C	D	E
Aerobios totales	<10 ⁴					
Mohos	<10 ²					
Levaduras	<10 ²		0			0
Enterobacterias	<10 ²					
<i>E coli</i>	Negativo		Negativo			Negativo

El proceso de autoclavado a altas temperaturas puede aumentar las cantidades de safranal en la muestra bien porque la picrocrocina se convierta por un proceso de deshidratación directa o bien por retención del propio safranal¹. Durante este proceso a temperaturas elevadas puede producirse una pérdida de crocinas por degradación térmica no enzimática. Esta pérdida va a variar en función del tiempo que dure el tratamiento térmico^{1,6}.

Observando los resultados expuestos en la Tabla 4 tras la cuantificación de los tres compuestos bioactivos mediante el método colorimétrico ISO 3632 vemos que no hubo

diferencias significativas con respecto a los distintos tratamientos en los dos lotes (P43 y P45) para picrocrocinas.

En el caso del safranal no hubo una variación significativa en el lote P45 mientras que en el lote P43 si que se produjo un incremento a tener en cuenta con los tratamientos B, C y E.

Las crocinas en el lote P43 disminuyeron significativamente respecto al control con los tratamientos C y E. En el lote P45 disminuyeron respecto al control con todos los tratamientos habiendo un mayor descenso con los tratamientos C y E.

Se explica que la pérdida de crocinas sea mayor con los tratamiento C y E porque en estos fue donde las condiciones de tiempo y temperatura fueron más extremas, siendo en el caso del tratamiento C un tiempo mucho más prolongado y en el E una temperatura más alta que en el resto de tratamientos.

Tabla 4. Cuantificación de picrocrocina, safranal y crocinas (%) mediante el método colorimétrico ISO3632 de los dos lotes de azafrán al inicio (control) y después de los distintos tratamientos térmicos.

P43	Control	Tratamientos				
		A	B	C	D	E
Picrocrocina(%)	23,0±0,1 ^a	23,8±2,3 ^a	23,5±0,6 ^a	22,7±0,3 ^a	22,8±2,5 ^a	22,0±0,7 ^a
Safranal(%)	8,3±0,0 ^a	9,4±1,3 ^a	10,0±0,1 ^b	10,2±0,1 ^b	8,9±0,9 ^a	10,0±0,3 ^b
Crocinas(%)	10,9±0,9 ^b	10,1±0,8 ^b	10,4±0,1 ^b	8,7±0,1 ^a	10,1±0,4 ^b	8,0±0,4 ^a
P45	Control	Tratamientos				
		A	B	C	D	E
Picrocrocina(%)	22,8±1,9 ^a	22,5±1,8 ^a	22,3±0,2 ^a	20,8±0,3 ^a	20,7±1,6 ^a	21,6±0,5 ^a
Safranal(%)	9,0±0,8 ^a	9,3±1,1 ^a	9,8±0,2 ^a	9,4±0,0 ^a	8,6±1,3 ^a	9,6±0,3 ^a
Crocinas(%)	8,4±0,6 ^c	7,4±0,7 ^{ab}	8,1±0,3 ^{ab}	6,0±0,2 ^a	7,2±0,6 ^b	5,9±0,2 ^a

Según podemos observar en la tabla 5, al analizar las muestras por cromatografía confirmamos lo ya visto al cuantificar con el método colorimétrico. La mayor disminución de crocinas se da con los tratamientos C y E para ambos lotes debido a las condiciones empleadas. Por HPLC podemos ver los niveles de las distintas crocinas pero remarcamos por separado la trans-crocina-4 por ser la mayoritaria.

El safranal aumenta en mayor medida para el lote P43 con los tratamientos B y C mientras que para el lote P45 el aumento es igual de significativo respecto al control con todos los tratamientos.

Tabla 5. Cuantificación de picrocrocina, safranal y crocinas (%) mediante análisis cromatográfico de los dos lotes de azafrán al inicio (control) y después de los distintos tratamientos térmicos.

P43	Control	Tratamientos				
		A	B	C	D	E
Picrocrocina	5,7±1,3 ^b	1,3±0,3 ^a	1,5±0,1 ^a	0,3±0,0 ^a	0,4±0,0 ^a	1,2±0,1 ^a
Safranal	0,4±0,1 ^a	0,6±0,2 ^b	1,0±0,0 ^d	0,9±0,0 ^{cd}	0,8±0,0 ^{bc}	0,9±0,0 ^{bc}
t-crocina-4	2,0±0,5 ^b	1,5±0,2 ^{ab}	1,5±0,2 ^{ab}	1,1±0,0 ^a	1,7±0,0 ^b	1,0±0,0 ^a
Crocinas	3,2±0,8 ^c	2,6±0,4 ^{abc}	2,8±0,4 ^{abc}	2,2±0,1 ^{ab}	3,0±0,1 ^{bc}	2,0±0,0 ^a
P45	Control	Tratamientos				
		A	B	C	D	E
Picrocrocina	1,4±0,2 ^b	1,5±0,1 ^b	1,6±0,0 ^b	0,3±0,0 ^a	0,4±0,0 ^a	1,4±0,3 ^b
Safranal	0,3±0,0 ^a	0,6±0,0 ^b	0,8±0,1 ^b	0,7±0,1 ^b	0,6±0,0 ^b	0,7±0,2 ^b
t-crocina-4	1,4±0,0 ^c	1,1±0,0 ^b	1,1±0,0 ^b	0,7±0,1 ^a	1,1±0,1 ^b	0,8±0,2 ^a
Crocinas	2,3±0,1 ^c	2,0±0,0 ^{bc}	2,2±0,0 ^{bc}	1,4±0,3 ^a	2,0±0,1 ^{bc}	1,7±0,5 ^{ab}

*Picrocrocina analizada como *p*-nitroanilina

Conclusiones.

- Se ha conseguido eliminar por completo la microbiota del azafrán en todos los tratamientos aplicados aunque no con todos ellos conseguimos mantener los compuestos bioactivos.

-A la vista de los resultados, el tratamiento más eficaz es el tratamiento B ya que reúne las condiciones óptimas de autoclavado que permiten eliminar la microbiota presente en el azafrán sin afectar prácticamente a las crocinas y aumentando significativamente la concentración de safranal.

Agradecimientos.

Gracias a la Facultad Invisible que en conjunto con la Facultad de Farmacia sacaron las becas de colaboración con empresas que hicieron posible que pudiera hacer el trabajo de fin de grado en una empresa.

Gracias, sobre todo, a Pharmactive Biotech Products SL por aportarme los medios y la ayuda necesarios para llevar a cabo este estudio y al Dr. Antonio Manuel Inarejos-García por haber sido mi tutor en la empresa.

Bibliografía.

- 1.- Gregory M.J., Menary R.C. and Davies N.W. (2005). Effect of Drying Temperature and Air Flow on the Production and Retention of Secondary Metabolites in Saffron. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5969-5975.
- 2.- Martín G. (2014). Azafrán I (*Crocus sativus* L.). Reduca (Biología). Serie Botánica. 7 (2): 71-83.
- 3.- Christodoulou E., Kadoglou N.P., Kostomitsopoulos N., Valsami G. (2015). Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. *J Pharm Pharmacol.* 67(12):1634-49. doi: 10.1111/jphp.12456
- 4.- López-Montes A., Espejo T., Vilchez J.L., Blanc R. (2008).. Notas sobre la identificación mediante técnicas de análisis químico del amarillo de azafrán envejecido artificialmente. *Opt. Pura Apl.* 41 (3) 261-265.
- 5.- Pfander H. and Schurtenberger H. (1982). Biosynthesis of C20-Carotenoids in *Crocus sativus*. *Biochemistry* 21: 1039–1042.
- 6.- Ordoudi S.A. and Tsimidou M.Z. (2004). Saffron quality: effect of agricultural practices, processing and storage. R. Dris and S. M. Jain (eds.), *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops. Vol. 1, "Preharvest Practice"*, pp. 209–260.
- 7.- Zarghami, N. S. and Heinz D. E. (1971). The volatile constituents of saffron. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 4: 43–45.
- 8.- Sampathu, S. R., Shirashankar S. and Lewis Y. S. (1984). Saffron (*Crocus Sativus* L.) – Cultivation, Processing, Chemistry and Standardisation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20: 123–157.
- 9.- Iborra J., Castellar R., Canovas M. and Manjon A. (1992a). TLC preparative purification of Picrocrocin, HTCC and Crocin from Saffron. *Journal of Food Science* 57: 714–731.
- 10.- Iborra J., Castellar R., Canovas M. and Manjon A. (1992b). Picrocrocin hydrolysis by immobilised β -glucosidase. *Biotechnology Letters* 14: 475–480.

- 11.- Iborra J., Castellar R., Canovas M. and Manjon A. (FSTA, 1993, 11: B 130). Analysis of a packedbed reactor for hydrolysis of picrocrocin by immobilised β -glucosidase. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 780–784.
- 12.- Raina B.L., Agarwal S.G., Bhatia A.K. and Gaur G.S. (1996). Changes in pigments and volátiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. *Journal of Science and Food Agriculture* 71: 27–32.
- 13.- Rios J.L., Recio M.C., Giner R.M and Manez S. (1996). An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research* 10: 189–193.
- 14.- Himeno H. and Sano K. (1987). Synthesis of crocin, picrocrocin and safranal by saffron stigma-like structures proliferated *in vitro*. *Agricultural and Biological Chemistry* 51: 2395–2400.
- 15.- Normativa ISO 3632-2 (2011).
- 16.- Winterhalter P. and Straubinger M. (2000) Saffron–Renewed Interest In An Ancient Spice. *Food Rev. Int.*, 16(1), 39–59.
- 17.- Sjöberg A.M., Manninen S.J., Pinnioja S., Horkanen E. and Latva-Kala K. (1991). Irradiation of spices and its detection. *Food Reviews International* 7: 233–253.
- 18.- Padrón J.A., Fernández J., Suárez J., Pucheta L., Limia G., Carballosa L., Gandolff C., et col. (2001) Determinación del tiempo equivalente acumulado durante los ciclos de esterilización, por vapor saturado, en un fermentador empleado en la producción de vacunas. *VacciMonitor 1 Año 10 No. 2*.
- 19.- Cano Ruera S. (2006). Métodos de análisis microbiológico. Normas iso, une. <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi148anmic.pdf>
- 20.- Orfanou O. and Tsimidou M. (1996). Evaluation of the colouring strength of saffron spice by UVVis spectrometry. *Food Chemistry* 57: 463–469.